



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Cefalosporinas e Carbapenemos no tratamento de infeções
provocadas por bactérias Gram-negativas**

Luísa Fernandes Guerreiro

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes
dos Santos Cristiano e da Professora Doutora Maria Leonor Faleiro

2018



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Cefalosporinas e Carbapenemos no tratamento de infeções
provocadas por bactérias Gram-negativas**

Luísa Fernandes Guerreiro

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes
dos Santos Cristiano e da Professora Doutora Maria Leonor Faleiro

2018

Cefalosporinas e Carbapenemos no tratamento de infeções provocadas por bactérias Gram-negativas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Faro, 28 de Setembro de 2018

Copyright© 2018 Luísa Guerreiro

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Desde cedo aprendi que não há sucesso sem sacrifício, sem trabalho, sem persistência. Para tal contribuíram os meus pais, a quem quero agradecer toda a educação, todos os ensinamentos, mas também todo o apoio para a concretização deste objetivo.

Quero agradecer também ao meu namorado, pela infinita paciência, por suportar as minhas ausências e por toda a força que me transmitiu.

Gostaria de agradecer também às minhas orientadoras, à Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano e à Professora Doutora Maria Leonor Faleiro por toda a atenção e por toda a ajuda prestada ao longo destes últimos meses. Foram de fato, uma ajuda bastante preciosa.

Um enorme agradecimento também a todos aqueles que caminharam ao meu lado ao longo dos últimos anos, aos meus colegas de curso, com quem partilhei momentos que irei guardar para sempre. Um especial obrigado à Ana Leirão, ao André Rodrigues, à Andreia Alves, ao Carlos Sousa, ao Nuno Mendes, à Patrícia Guerreiro, à Rita Palma e à Vanessa Viegas, que foram aqueles com quem partilhei mais de perto todos os bons e maus momentos ao longo do curso.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer também aos farmacêuticos dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Particular do Algarve-Unidade de Gambelas por toda a ajuda e paciência ao longo do estágio curricular em farmácia hospitalar. Um agradecimento também aos técnicos e farmacêuticos da Farmácia Félix Franco por toda a simpatia e por todos os ensinamentos que me transmitiram ao longo do estágio curricular em farmácia comunitária.

A todos, muito Obrigado!

Resumo

A presente dissertação pretende realçar a importância das cefalosporinas e carbapenemos no combate a infecções causadas por bactérias Gram-negativas, fazendo uma abordagem dos mecanismos de ação e das estratégias de otimização das moléculas, bem como da sua utilização terapêutica e espectro de atividade. São também abordados os diferentes mecanismos de desenvolvimento de resistência por parte de bactérias Gram-negativas face às β -lactamas.

A descoberta da cefalosporina C em 1940 e o posterior isolamento do seu núcleo ativo (ácido 7-aminocefalosporânico ou 7-ACA) foi o ponto de partida para o desenvolvimento de análogos semissintéticos com atividade antibacteriana superior. Surgiram então as cefalosporinas de primeira, segunda, terceira, quarta e quinta geração, apresentando maior eficácia contra bactérias Gram-negativas e estabilidade acrescida face às β -lactamases.

Os carbapenemos foram desenvolvidos a partir da tienamicina, isolada a partir de *S. cattleya* em 1976. Estes apresentam um espectro de ação bastante alargado. São ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e possuem também uma elevada resistência face às β -lactamases, sendo considerados como a última linha na terapêutica de infecções graves e causadas por bactérias multirresistentes.

É de grande importância o estudo dos mecanismos que geram resistência em cada uma das espécies bacterianas de modo a compreender de que forma podemos intervir para retardar o desenvolvimento de resistências, bem como quais as estratégias a utilizar no futuro de modo a prevenir as resistências bacterianas.

Nas últimas décadas, emergiu sobretudo o desenvolvimento de resistência por parte de bactérias Gram-negativas face a cefalosporinas e carbapenemos. Assim, urge o estudo dos processos que conduzem a resistências bacterianas de modo a encontrar caminhos que permitam contrariar o seu desenvolvimento e disponibilizar novas terapêuticas.

Palavras-chave: Antibióticos, Bactérias, Carbapenemos, Cefalosporinas, Resistências.

Abstract

The present dissertation highlights the relevance of cephalosporins and carbapenems as tools for the treatment of infections caused by Gram-negative microorganisms approaching the mechanisms of action and spectrum of activity as well as the strategies available for drug optimization. In addition, we highlight the different mechanisms of development of resistance by Gram-negative bacteria to β -lactam antibiotics.

The discovery of cephalosporin in 1940 and subsequent isolation of its active nucleus (7-aminocephalosporanic acid) was the starting point for the development of semisynthetic analogs with superior antibacterial activity. Then appeared the first, second, third, fourth and fifth generation cephalosporins showing a more pronounced action against Gram-negative bacteria and increased stability to β -lactamases.

Carbapenems were developed from thienamycin isolated from *S. cattleya* in 1976. These exhibit a broader spectrum of action against Gram-positive and Gram-negative bacteria and also have a good resistance to β -lactamases, being used to treat serious infections and infections caused by multiresistant bacteria.

The study of the mechanisms that lead to resistance in each species is very important in order to understand how can we act to inhibit the processes that lead to bacterial resistance and to develop strategies to circumvent the consequences of the bacterial resistance.

In the last decades, the resistance of Gram-negative bacteria to cephalosporins and carbapenems has been highlighted. Thus, we have to study and optimize those drugs in order to perceive the way that allows to counteract the development of bacterial resistance.

Keywords: Antibiotics, Bacteria, Carbapenems, Cephalosporins, Resistance.

Índice

1. Introdução	1
2. Metodologia	4
3. A Célula Bacteriana	5
4. Fármacos Antibacterianos	7
4.1. Penicilinas.....	11
4.1.1. Estrutura química e otimização das penicilinas	11
4.1.2. Mecanismo de ação, utilização terapêutica e espectro de atividade das penicilinas.....	12
4.1.3. Inibidores de β -lactamases	16
4.2. Cefalosporinas	18
4.2.1. Estrutura química e otimização das cefalosporinas.....	18
4.2.2. Mecanismo de ação das cefalosporinas	20
4.2.3. Cefalosporinas de primeira geração	22
4.2.4. Cefalosporinas de segunda geração	24
4.2.5. Cefalosporinas de terceira geração	26
4.2.6. Cefalosporinas de quarta geração	27
4.2.7. Cefalosporinas de quinta geração	28
4.2.8. Utilização terapêutica e espectro de atividade das cefalosporinas	29
4.3. Carbapenemos.....	30
4.3.1. Estrutura química e otimização dos carbapenemos.....	30
4.3.2. Mecanismo de ação dos carbapenemos	33
4.3.3. Utilização terapêutica e espectro de atividade dos carbapenemos	34
5. Desenvolvimento de resistência a fármacos antibacterianos	35
5.1. Mecanismos de desenvolvimento de resistência face às β -lactamas	40
5.1.1. Hidrólise do anel β -lactâmico pelas enzimas β -lactamases	40
5.1.2. Bombas de efluxo.....	46
5.1.3. Modificação do alvo intracelular do antibiótico	49
5.2. Mecanismos de desenvolvimento de resistência às β -lactamas por parte de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
5.3. Mecanismos de desenvolvimento de resistência às β -lactamas por bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i>	52
5.4. Mecanismos de geração de resistência às β -lactamas por parte de <i>Acinetobacter baumannii</i>	54

5.5. Estratégias que permitem minimizar o desenvolvimento de resistências face a cefalosporinas e carbapenemos.....	57
5.5.1. Utilização de bacteriófagos na terapêutica de infeções bacterianas	58
6. Conclusão	62
7. Referências Bibliográficas	63

Índice de Tabelas

Tabela 1. Mecanismos celulares de resistência bacteriana para cada classe de antibióticos.....	39
Tabela 2. Mecanismos de desenvolvimento de resistência por parte de cada espécie/família bacteriana analisada.....	56

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representação da estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA).....	2
Figura 3.1. Representação da estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas.....	6
Figura 3.2. Representação da estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.....	6
Figura 4.1. Representação dos alvos de ação das principais classes de fármacos antibacterianos.....	9
Figura 4.2. Representação da estrutura química do hidrocloreto de salvarsan.....	9
Figura 4.3. Representação da estrutura química da proflavina.....	10
Figura 4.4. Representação do metabolismo do prontossil.....	10
Figura 4.5. Representação da estrutura química genérica de uma penicilina.....	11
Figura 4.6. Representação da estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).....	12
Figura 4.7. Representação da formação da ligação cruzada das pontes peptídicas entre os componentes de peptidoglicano, N-acetil-glucosamina (NAG) e N-acetil-murâmico (NAM), durante o crescimento bacteriano e inibição pelas penicilinas.....	13
Figura 4.8. Representação da inibição da enzima transpeptidase pelas penicilinas.....	13
Figura 4.9. Representação da estrutura química da penicilina G (benzilpenicilina), penicilina V (fenoximetilpenicilina), flucloxacilina, ampicilina, amoxicilina e piperacilina.....	16
Figura 4.10. Representação da reação de destruição do anel β -lactâmico da penicilina pela β -lactamase.....	17

Figura 4.11. Representação da estrutura química do ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.....	18
Figura 4.12. Representação da estrutura química da cefalosporina C.....	19
Figura 4.13. Representação da estrutura química genérica das cefalosporinas.....	20
Figura 4.14. Representação do mecanismo de inibição da enzima transpeptidase pelas cefalosporinas.....	21
Figura 4.15. Representação do mecanismo de síntese do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) e dos análogos das cefalosporinas.....	22
Figura 4.16. Representação da estrutura química das cefalosporinas de primeira geração: cefalotina, cefaloridina, cefalexina e cefazolina.....	24
Figura 4.17. Representação da estrutura química da cefamicina C.....	25
Figura 4.18. Representação da estrutura química da cefoxitina.....	25
Figura 4.19. Representação da estrutura química da cefuroxima.....	26
Figura 4.20. Representação da estrutura química das cefalosporinas de terceira geração: ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona.....	27
Figura 4.21. Representação da estrutura química das cefalosporinas de quarta geração: cefepima e cefepiroma.....	28
Figura 4.22. Representação da estrutura química do pró-fármaco fosamil ceftarolina e do seu metabolito ativo ceftarolina.....	29
Figura 4.23. Comparação das estruturas químicas de penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos.....	30
Figura 4.24. Representação da estrutura química genérica dos carbapenemos.....	31
Figura 4.25. Representação das configurações S e R no carbono C-8 dos carbapenemos.....	31
Figura 4.26. Representação da configuração <i>trans</i> da ligação C-5-C-6 nos carbapenemos e da configuração <i>cis</i> da ligação correspondente nas penicilinas e cefalosporinas.....	32
Figura 4.27. Representação da estrutura química da tienamicina, imipenem, meropenem e ertapenem.....	33

Figura 4.28. Representação da inibição da enzima transpeptidase pelos carbapenemos.....	34
Figura 5.1. Representação dos mecanismos de transferência genética entre bactérias..	37
Figura 5.2. Representação da estrutura das diferentes classes de β -lactamases.....	42
Figura 5.3. Representação do ciclo catalítico das metalo- β -lactamases de classe B....	43
Figura 5.4. Representação das cinco diferentes classes de bombas de efluxo presentes nas membranas bacterianas bem como de exemplos de solutos bombeados para o meio exterior por cada uma das classes de bombas de efluxo.....	47
Figura 5.5. Representação esquemática de uma bomba de efluxo.....	48
Figura 5.6. Representação da morfologia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
Figura 5.7. Representação da morfologia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> observada através de microscopia eletrônica de varrimento.....	53
Figura 5.8. Coloração de Gram da bactéria <i>A. baumannii</i>	54

Lista de Abreviaturas

6-APA - Ácido 6-aminopenicilânico

7-ACA - Ácido 7-aminocefalosporânico

ABC - *ATP binding cassette* ou cassete de ligação ao ATP

AmpC - β -lactamase de classe C ou cefalosporinase

ATP - Adenosina trifosfato

CTX-M - Cefotaximase

DNA - *Deoxyribonucleic acid* ou Ácido desoxirribonucleico

ESBL - *Extended spectrum β -lactamase* ou β -lactamase de espectro alargado

EU/EEE - União Europeia/Espaço Económico Europeu

GES - *Guiana-extended-spectrum β -lactamase* ou β -lactamase de espectro alargado de Guiana

IACS - Infecções associadas aos cuidados de saúde

KPCs - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS - Lipopolissacarídeos

MATE - *Multidrug and toxin exclusion class* ou classe de exclusão de múltiplos fármacos e toxinas

MBLs - *Metallo- β -lactamases* ou Metallo- β -lactamases

MFS - *Major facilitator class* ou classe de facilitadores principais

NAG - N-acetil-glucosamina

NAM - N-acetil-murâmico

NDM-1 - *New Delhi metallo- β -lactamase* ou Nova Deli metalo- β -lactamase

OMS - Organização mundial de saúde

OXAs - Oxacilinases

PABA - *Para-aminobenzoic acid* ou ácido *para*-aminobenzóico

PBPs - *Penicilin binding proteins* ou proteínas de ligação à penicilina

RNA - Ácido ribonucleico

RND - *Resistance-nodulation-division class* ou classe de resistência-nodulação-divisão

rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico

SMR - *Small multidrug resistant class* ou pequena classe de resistência a múltiplos fármacos

1. Introdução

As doenças infecciosas são responsáveis pela morte de cerca de 14,9 milhões de pessoas, por ano, em todo o mundo, sendo as pneumonias e as infeções relacionadas com o trato respiratório inferior responsáveis por mais de 3 milhões de mortes.¹

O desenvolvimento de resistências por parte dos microrganismos bem como o decréscimo na síntese e desenvolvimento de novas classes de agentes antimicrobianos têm contribuído para a dificuldade de tratamento de infeções causadas por vários grupos bacterianos.²

O surgimento de bactérias resistentes a antibióticos representa um problema para a saúde pública que acarreta elevados custos socioeconómicos resultantes do aumento da mortalidade, da morbilidade e da utilização de cuidados de saúde.³

As previsões a nível internacional indicam que se não forem tomadas medidas no sentido de travar o desenvolvimento das resistências microbianas, morrerão na década de 2050, cerca de 390 000 pessoas por ano, na Europa e 10 milhões de pessoas por ano, em todo o mundo, devido às resistências aos fármacos antimicrobianos.⁴

As cefalosporinas e os carbapenemos são atualmente os antibióticos mais eficazes que estão disponíveis para o tratamento de infeções causadas por bactérias multirresistentes e são também a última linha de tratamento para infeções mais complicadas.⁵

As resistências bacterianas às cefalosporinas e carbapenemos são atualmente consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um grave problema de saúde pública pois algumas bactérias que anteriormente eram suscetíveis a estes antibióticos, nos dias de hoje deixaram de o ser.^{6,7}

Neste âmbito, a OMS publicou em 2017 uma lista da qual fazem parte as bactérias para as quais é prioritária a investigação. Os especialistas envolvidos agruparam os agentes patogénicos considerados de acordo com a sua espécie e o tipo de resistência desenvolvido, classificando os resultados obtidos em três níveis de prioridade: crítica, elevada e média. Segundo esta classificação, as bactérias que se encontram no grupo de prioridade crítica são *Acinetobacter baumannii* (resistente a carbapenemos), *Pseudomonas aeruginosa* (resistente a carbapenemos) e pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp, e *Morganella* spp. (resistentes a carbapenemos e a cefalosporinas de terceira geração).⁷

O presente trabalho focar-se-á essencialmente nas referidas classes de fármacos antibacterianos, cefalosporinas e carbapenemos, devido à sua relevância clínica e ao elevado risco de desenvolvimento de resistências por parte das bactérias anteriormente mencionadas.⁵

Após a descoberta da cefalosporina C na década de 40, verificou-se que esta apresentava um espectro de atividade superior ao da penicilina G, sendo ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Posteriormente, a obtenção do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), cuja estrutura química se encontra representada na **Figura 1.1.**, tornou possível o desenvolvimento de um grande número de derivados semissintéticos, uma vez que seria possível a preparação de derivados da molécula com diversidade estrutural nas posições C₃ e C₇, sendo assim mais fácil a otimização da atividade antibacteriana.⁶

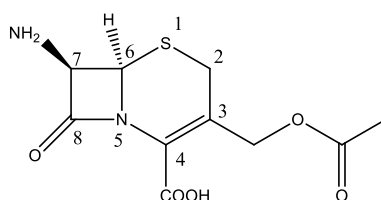


Figura 1.1. Representação da estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA).

Os carbapenemos descobertos na década de 70, constituem a classe de antibióticos com maior espectro de atividade de entre todos os antibióticos β -lactâmicos e apresentam uma boa estabilidade face às β -lactamases. São apenas utilizados no tratamento de infeções mais complicadas, sendo considerados como a última linha na terapêutica de infeções, de modo a preservar a sua ação antibacteriana contra as bactérias multirresistentes. Ao longo das últimas décadas foram introduzidas inúmeras alterações estruturais nas cefalosporinas e carbapenemos de modo a otimizar a sua farmacodinâmica e a relação com o seu alvo terapêutico.^{5,8,9}

A crescente eliminação de estirpes suscetíveis aos antibióticos e a consequente seleção natural das estirpes resistentes são processos biológicos de adaptação, utilizados por diversos microrganismos, incluindo as bactérias.²

De modo a evitar a emergente situação do desenvolvimento de resistências e a quebrar todo este ciclo vicioso, é premente a promoção do uso prudente e racional dos antibióticos, bem como o controlo da infeção, sobretudo prevenindo-a, de modo a evitar

o recurso à terapêutica antibiótica. Para que tal seja possível, será necessário garantir o correto funcionamento dos serviços de saúde, boas práticas profissionais, bem como a educação de cada cidadão para que se torne parte integrante do processo.²

Os profissionais de saúde, incluindo o farmacêutico, possuem também um papel de extrema relevância na prevenção da resistência a fármacos antimicrobianos, intervindo na promoção da saúde, na prevenção e controlo da infeção, evitando a incorreta ou desnecessária utilização de antibióticos, assegurando o cumprimento da prescrição (dose e duração do tratamento) e encaminhando para outros profissionais de saúde, caso seja necessário. O farmacêutico deve ainda garantir a implementação de medidas preventivas e de higiene em hospitais e colaborar com outros profissionais de saúde de modo a minimizar a transmissão de infeções, a utilização desnecessária de terapêutica antibacteriana e o conseqüente surgimento de resistências.¹⁰

2. Metodologia

Para a realização da presente dissertação realizou-se uma pesquisa bibliográfica e uma revisão sistemática de diversas fontes acerca da descoberta, mecanismo de ação, otimização e utilização dos antibióticos bem como do desenvolvimento de resistências por parte das bactérias Gram-negativas mencionadas. A recolha de informação foi realizada através da consulta de diferentes bases de dados *online* como por exemplo BioRxiv, NCBI-PubMed, RCAAP, entre outras. Os termos em inglês utilizados na pesquisa *online* foram: “antibiotics”, “ β -lactam antibiotics”, “cephalosporins”, “carbapenems”, “antibiotic resistance”, entre outros. A pesquisa estendeu-se ainda a livros na área da farmacologia e microbiologia. Para representação das estruturas químicas das moléculas estudadas foi utilizado o programa informático “ChemDraw”, versão 12.0.2.

3. A Célula Bacteriana

A descoberta das bactérias ocorreu por volta de 1670 após a invenção do microscópio por Leeuwenhoek. Os trabalhos experimentais de Pasteur vieram também demonstrar que determinadas estirpes de bactérias eram cruciais para a fermentação e que as bactérias se encontravam mais disseminadas do que inicialmente se pensava. Um dos primeiros defensores de que as doenças seriam causadas por microrganismos foi Joseph Lister, um cirurgião britânico que introduziu o ácido carbólico como agente antisséptico em cirurgias, o que aumentou bastante a taxa de sobrevivência pós cirúrgica.⁹

Durante a segunda metade do século XIX, cientistas como Koch passaram então a ser capazes de identificar os microrganismos que provocavam determinada doença. Foram também estudados métodos de vacinação e realizados estudos com o intuito de desenvolver agentes antimicrobianos. No entanto, aquele que ficou conhecido como o pai da quimioterapia (utilização de substâncias químicas para combater os microrganismos causadores da doença) foi Paul Ehrlich.⁹

As bactérias são seres vivos de estrutura relativamente simples. São organismos procariotas unicelulares, sem membrana nuclear, mitocôndria, complexo de Golgi ou retículo endoplasmático. Reproduzem-se de forma assexuada apresentando geralmente dimensões compreendidas entre 1 e 20 μm , mas podendo atingir cerca de 60 μm no caso das cianobactérias. Estes microrganismos podem apresentar forma esférica, espiralada ou forma de bastonete e podem apresentar-se como células isoladas ou em diferentes agrupamentos. A parede celular bacteriana apresenta uma estrutura e composição complexa, a qual é utilizada para a sua classificação, uma vez que de acordo com os seus elementos estruturais reage positiva ou negativamente à coloração de Gram. Deste modo, as bactérias são classificadas como Gram positivas ou Gram negativas.¹¹

A estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas, representada na **Figura 3.1.** tem uma espessura compreendida entre 15 e 50 nm e é composta por 50% de peptidoglicano, entre 40-45% de ácidos teicoicos (que conferem alguma polaridade e carga negativa à superfície celular da bactéria) e 5-10 % de proteínas e polissacáridos. O fato de a superfície celular apresentar um carácter fortemente polar influencia a penetração de moléculas ionizadas e favorece a entrada na célula de compostos com carga positiva. As bactérias Gram-positivas apresentam uma estrutura menos complexa que as bactérias Gram-negativas (**Figura 3.2.**).¹²

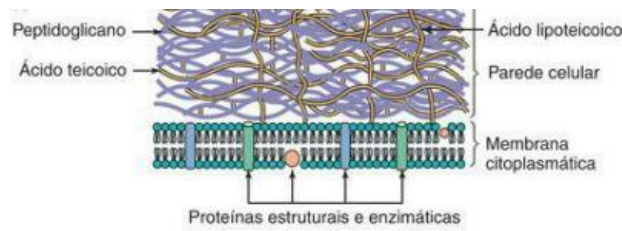


Figura 3.1. Representação da estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas. Adaptado de Murray P, Rosenthal K, Pfaller M.¹¹

As bactérias Gram-negativas apresentam uma estrutura mais complexa, contendo um espaço periplasmático entre as membranas externa e citoplasmática, uma camada de peptidoglicano mais fina com cerca de 2nm de espessura e uma membrana externa, que consiste numa bicamada lipídica contendo proteínas e na sua face interior contém também lipoproteínas ligadas à camada de peptidoglicano. Existem ainda proteínas transmembranares, chamadas de porinas, que formam canais de natureza hidrofílica através da membrana externa.¹² A estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas encontra-se representada na **Figura 3.2.**

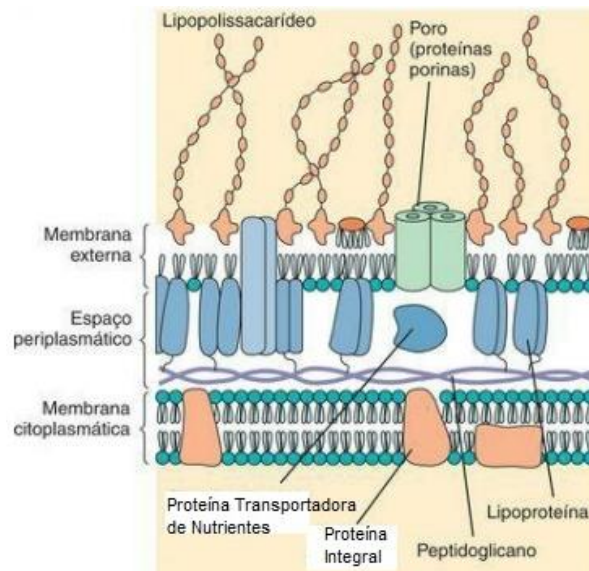


Figura 3.2. Representação da estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas. Adaptado de Murray P, Rosenthal K, Pfaller M.¹¹

A parede celular das bactérias Gram-negativas é estratificada e a sua membrana externa irá funcionar como barreira à entrada dos antibióticos na célula bacteriana, podendo ser este um mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos. Os fármacos antibacterianos terão então que permear a membrana externa da bactéria por difusão através dos canais de porina existentes à sua superfície e terão ainda que resistir à presença de enzimas que degradam os antibióticos (β -lactamases) e que se encontram presentes no periplasma da célula bacteriana.⁸

No corpo humano habitam naturalmente milhares de diferentes espécies bacterianas, algumas das quais vivendo de forma permanente no organismo humano. Existem também bactérias no ambiente que nos rodeia, incluindo no ar que respiramos, na água e nos alimentos que ingerimos embora grande parte destas bactérias não apresentem, em condições normais, risco de doença para o Homem. No entanto, existem determinadas bactérias, que poderão ameaçar a saúde humana, quer devido ao efeito tóxico dos metabolitos que produzem (toxinas), quer pela sua presença em tecidos ou órgãos que são normalmente estéreis, sendo necessário recorrer à utilização de fármacos antibacterianos.¹¹

4. Fármacos Antibacterianos

Existem diferentes tipos de agentes antimicrobianos, podendo os mesmos atuar sobre bactérias (fármacos antibacterianos ou antibióticos), vírus (fármacos antivirais) ou parasitas (fármacos antiparasitários). No entanto, ao longo deste trabalho iremos focar-nos apenas nos fármacos antibacterianos ou antibióticos. De referir contudo que alguns agentes antibióticos apresentam também atividade antiparasitária.¹³

A palavra “antibiótico” tem origem nas palavras gregas, *anti* (“contra”) e *bios* (“vida”), o que significa que os antibióticos são substâncias que atuam “contra a vida” dos organismos que combatem. São geralmente moléculas com baixo peso molecular que atuam seletivamente contra agentes bacterianos.¹³ Anteriormente à descoberta dos antibióticos, milhares de pessoas morriam devido a infeções causadas por bactérias tais como pneumonias ou infeções pós cirúrgicas.¹⁴

As substâncias antimicrobianas que têm como alvo proteínas microbianas podem ser consideradas como ligandos se atuam através de interações não covalentes com o seu alvo, geralmente em processos reversíveis, mas podem também reagir com grupos funcionais das proteínas alvo, inibindo-as irreversivelmente.¹⁵

As proteínas alvo nos agentes patogênicos são geralmente componentes essenciais de reações bioquímicas nos microrganismos e a interferência com estes processos fisiológicos resulta geralmente na sua destruição. Caso o agente antibacteriano em causa tenha como alvo terapêutico uma proteína que não é expressa por outras bactérias, então o fármaco apresentará seletividade apenas para o tipo de bactérias que expressa a referida proteína.¹⁵

Os processos bioquímicos vulgarmente inibidos incluem a síntese da parede celular bacteriana, a síntese da membrana celular e da subunidade ribossomal 30S e 50S, o metabolismo dos ácidos nucleicos, as funções das topoisomerasas e a síntese de folatos pelas bactérias.¹⁵

Existem distintas classes de substâncias antibacterianas utilizadas na terapêutica. Ao longo do último século foram estudadas e desenvolvidas novas substâncias químicas de origem natural e sintética que apresentam ação antibiótica. A abordagem aos antibióticos baseados na síntese química levou à descoberta de três classes moleculares distintas: as sulfonamidas (que atuam através do bloqueio de uma enzima chave na síntese de ácido fólico, que por sua vez é necessário para a biossíntese de DNA (do inglês *Deoxyribonucleic acid* ou Ácido desoxirribonucleico), por parte da bactéria); as fluoroquinolonas (que atuam bloqueando a replicação do DNA bacteriano) e as oxazolidinonas (funcionando como potentes bloqueadores da síntese proteica na bactéria).^{16,17,18}

Para além dos antibióticos que têm origem na síntese química, podem encontrar-se também antibióticos na natureza, sendo geralmente produzidos por fungos ou bactérias de modo a combater outros microrganismos que se apresentem como uma ameaça. A mais conhecida classe de antibióticos de origem natural são os antibióticos β -lactâmicos (incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactamas) mas para além destes existem ainda os aminoglicosídeos, macrólidos, tetraciclina, glicopéptidos, lipopéptidos e policetídeos.¹³

Os diferentes fármacos antibacterianos são capazes de distinguir entre a célula bacteriana e a célula eucariota (humana) e cada grupo de antibióticos possui um diferente alvo na célula bacteriana exercendo uma atividade bactericida ou bacteriostática (**Figura 4.1.**)⁸

Alguns antibióticos agem através da destabilização da parede celular (como por exemplo os antibióticos β -lactâmicos ou os glicopéptidos), outros atuam através da interferência

na síntese proteica (macrólidos, cloranfenicol, tetraciclina, linezolida e aminoglicosídeos), outros ainda através da danificação dos ácidos nucleicos (fluoroquinolonas e a rifampicina), inibindo determinadas vias metabólicas essenciais para a sobrevivência das bactérias (sulfonamidas) ou ainda através da destruição da membrana celular (polimixinas).⁸

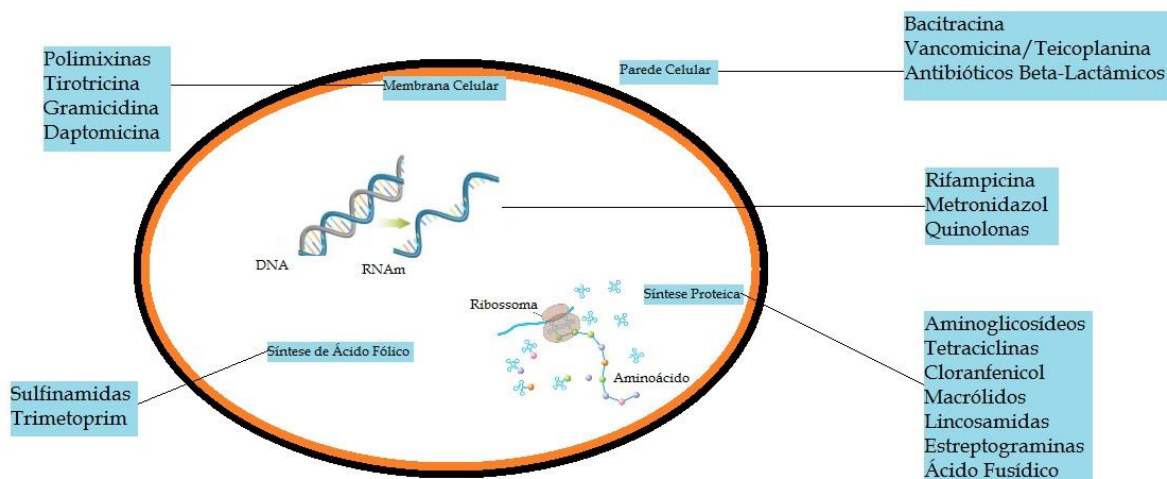


Figura 4.1. Representação dos alvos de ação das principais classes de fármacos antibacterianos.

Em 1910, Paul Ehrlich desenvolveu o primeiro fármaco antimicrobiano totalmente sintético, o salvarsan, cuja estrutura química se encontra representada na **Figura 4.2**. Verificou-se que este apresentava atividade contra o protozoário que provocava a doença do sono ou tripanossomíase (*Trypanosoma brucei*) e também contra a bactéria que causava a sífilis (*Treponema pallidum*). O salvarsan foi utilizado nos anos que se seguiram tendo sido substituído apenas em 1945, pela penicilina.⁹

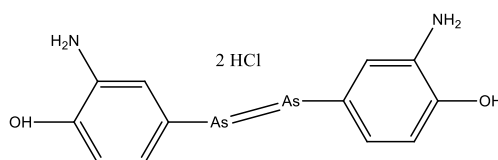


Figura 4.2. Representação da estrutura química do hidrocloreto de salvarsan.

4.1. Penicilinas

Ao estudar colónias de *Staphylococcus*, Fleming verificou que estas, quando rodeadas por colónias de outro tipo de microrganismos, se tornavam incolores, o que indicava que teriam sofrido lise. Após realização de novas culturas, verificou que a substância produzida no meio de cultura apresentava propriedades bactericidas relativamente ao género *Staphylococcus*.²¹

A penicilina G foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming em 1928. No entanto, esta não pôde ser utilizada de imediato na terapêutica antibacteriana, uma vez que apresentava múltiplos inconvenientes, como baixo rendimento, instabilidade e dificuldades relacionadas com o processo de purificação. Seguiram-se intensos estudos e desenvolvimentos no processo de produção da penicilina, levando à sua produção e distribuição em grande escala a partir de 1945.^{21,22}

4.1.1. Estrutura química e otimização das penicilinas

A estrutura química genérica das penicilinas encontra-se representada na **Figura 4.5**, e consiste num anel tiazolidina (anel de cinco membros) ligado a um anel β -lactâmico (anel de quatro membros), o qual se liga a uma cadeia lateral variável. Esta estrutura química característica confere atividade biológica às penicilinas e qualquer alteração na mesma, leva a uma diminuição do efeito antibacteriano. A cadeia lateral presente em cada penicilina determina o seu espectro de ação antibacteriano bem como as suas propriedades farmacológicas. A alteração da cadeia lateral na estrutura básica da penicilina permite a produção de diferentes tipos de penicilinas.¹⁵

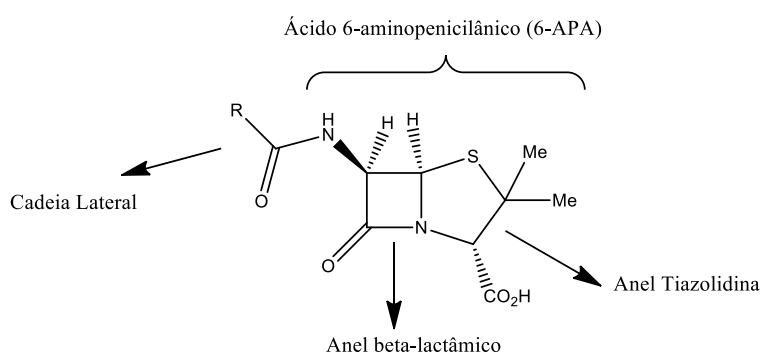


Figura 4.5. Representação da estrutura química genérica de uma penicilina.

A benzilpenicilina ou penicilina G é a única penicilina natural utilizada na prática clínica.¹⁵ Com a posterior descoberta de que a partir de culturas de *Penicillium chrysogenum* seria possível isolar o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), (cuja estrutura química se encontra representada na **Figura 4.6.**), iniciou-se o desenvolvimento de penicilinas semissintéticas. A partir desse momento passou a ser possível a alteração das cadeias laterais e consequente modelação da atividade antibacteriana e propriedades farmacológicas das penicilinas.¹⁵

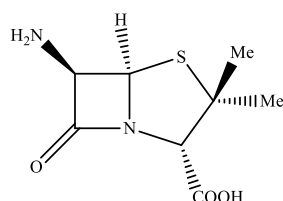


Figura 4.6. Representação da estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).

4.1.2. Mecanismo de ação, utilização terapêutica e espectro de atividade das penicilinas

As penicilinas inibem a formação da parede celular nas bactérias através da sua ligação covalente às enzimas transpeptidases, também designadas por proteínas de ligação à penicilina ou em inglês, *Penicillin Binding Proteins* (PBPs). Estas enzimas estão envolvidas na fase final da ligação cruzada (“*cross-linking*” ou reticulação) das pontes peptídicas entre os componentes de peptidoglicano, N-acetil-glucosamina (NAG) e ácido N-acetil-murâmico (NAM), durante o crescimento bacteriano (**Figura 4.7.**). Este modo de ação explica o fato de esta classe de antibióticos só atuar em células bacterianas em crescimento. Sabe-se que cada espécie bacteriana tem um conjunto específico de entre três a oito PBPs.⁹

A ligação do antibiótico às transpeptidases ocorre devido à semelhança estrutural entre os antibióticos β -lactâmicos e o dipéptido terminal D-Ala-D-Ala da cadeia de peptidoglicano em formação.⁹ Esta semelhança estrutural faz com que a enzima transpeptidase seja então acilada pelas penicilinas, o que afeta a sua atividade e impossibilita a síntese da parede celular bacteriana, tal como se verifica através da análise da **Figura 4.8.**²³

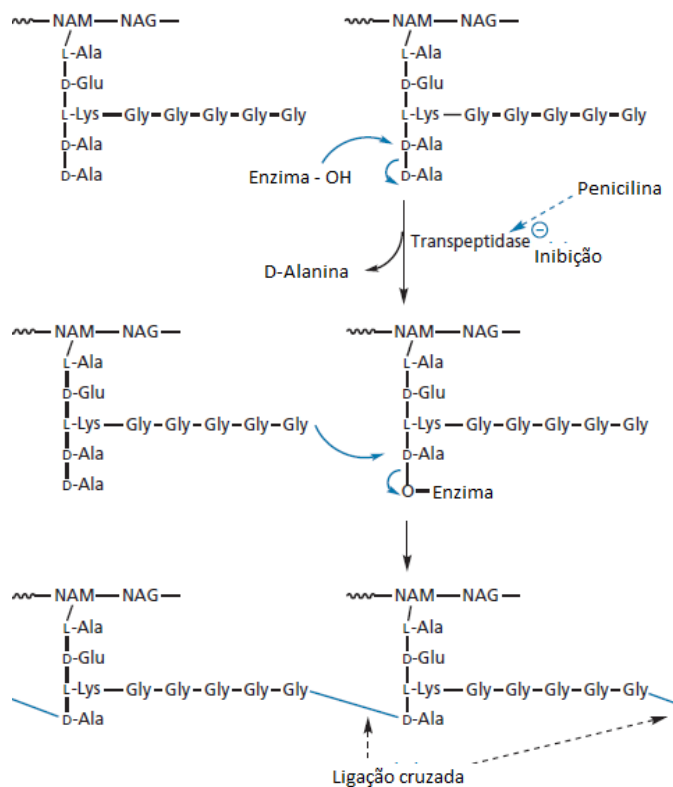
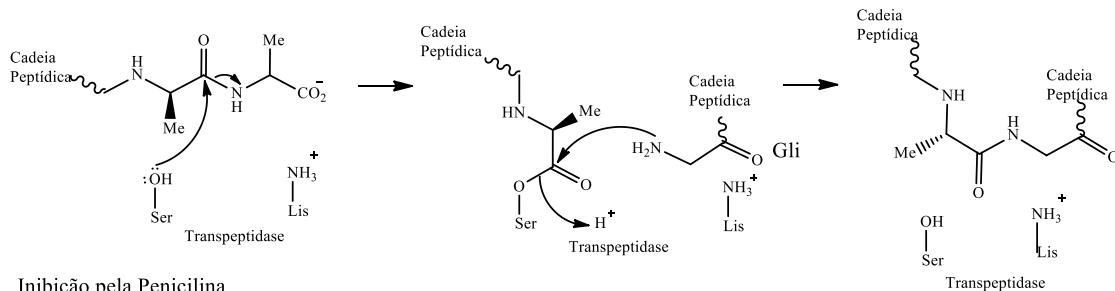


Figura 4.7. Representação da formação da ligação cruzada das pontes peptídicas entre os componentes de peptidoglicano, N-acetil-glucosamina (NAG) e N-acetil-murâmico (NAM), durante o crescimento bacteriano e inibição pelas penicilinas. Patrick GL.⁹

Cross-linking Normal



Inibição pela Penicilina

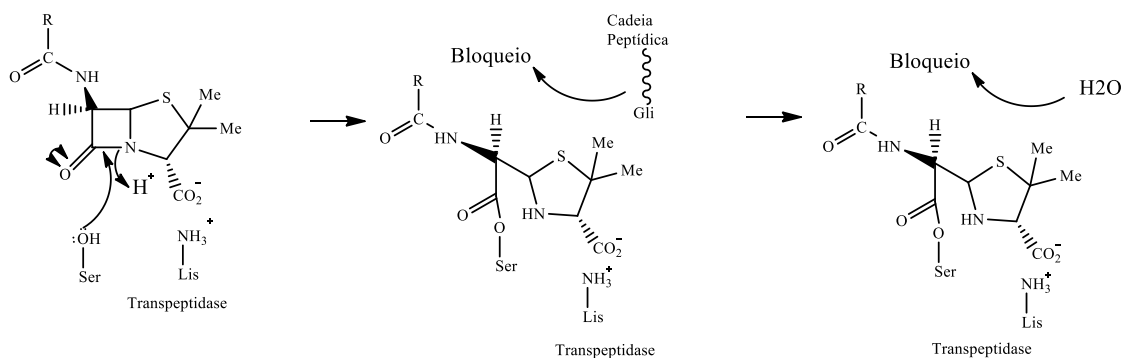


Figura 4.8. Representação da inibição da enzima transpeptidase pelas penicilinas.

A penicilina G (benzilpenicilina) (**Figura 4.9.**) e a sua congénere, penicilina V (fenoximetilpenicilina) (**Figura 4.9.**), foram as primeiras penicilinas com utilização clínica.¹² A penicilina V possui mais um átomo de oxigénio na cadeia lateral acilo, o que lhe confere alguma eletronegatividade quando comparada à penicilina G. Deste modo, reduz-se a densidade eletrónica no grupo carbonilo, tornando-o menos suscetível à hidrólise ácida. Assim, a penicilina V possui uma maior estabilidade face aos ácidos do que a penicilina G, o que permite a sua administração por via oral.⁹ A penicilina G é utilizada no tratamento de meningites bacterianas causadas por *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* e infeções da pele e tecidos moles provocadas por *S. pyogenes* ou *S. aureus*. A penicilina V aplica-se em casos de faringites provocadas por *S. pyogenes*.¹²

Existem outros análogos da penicilina que apresentam grupos substituintes eletrão-atratores no carbono α da cadeia lateral e que demonstram resistência à hidrólise ácida, como é o caso da flucloxacilina (**Figura 4.9.**), ampicilina (**Figura 4.9.**) e amoxicilina (**Figura 4.9.**).¹²

De forma a contornar a destruição das penicilinas pelas β -lactamases, introduziu-se um grupo substituinte volumoso na cadeia lateral das penicilinas, bloqueando assim o acesso da penicilina ao local ativo da β -lactamase. No entanto, o grupo substituinte não deve ser demasiado volumoso para que permita a reação da penicilina com a transpeptidase.¹²

No caso da flucloxacilina, a incorporação do anel isoxazolilo na cadeia lateral da penicilina conduz a compostos que podem ser administrados por via oral e que são estáveis face às β -lactamases. O anel isoxazolilo funciona como um grupo volumoso, impedindo a degradação da molécula pelas β -lactamases e como um grupo eletrão-atrator, conferindo estabilidade à molécula face aos ácidos.⁹ A flucloxacilina é utilizada na terapêutica de infeções dos ossos e articulações provocadas por *S. aureus* e em infeções da pele e tecidos moles provocadas por *S. pyogenes* ou *S. aureus*.¹²

Outro aspeto importante no desenvolvimento e otimização das penicilinas é o seu espetro de atividade antibacteriana. O espetro de atividade de cada penicilina depende da sua estrutura química, da sua capacidade para permear a membrana celular de bactérias Gram-negativas, da sua suscetibilidade face às β -lactamases, da sua afinidade específica pela enzima transpeptidase e da taxa à qual é bombeada para o exterior das células bacterianas.⁹

Assim, as penicilinas que apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são chamadas de penicilinas de largo espectro de ação e possuem geralmente na sua estrutura química um grupo α -hidrofílico que permite a sua passagem através dos canais de porina presentes nas membranas externas das bactérias Gram-negativas. São exemplos de penicilinas de largo espectro de ação a ampicilina e a amoxicilina que apresentam uma estrutura química muito semelhante, sendo resistentes à hidrólise ácida devido à presença do grupo amina, eletrão-atrator. No entanto, a ampicilina e a amoxicilina, não possuem grupos substituintes suficientemente volumosos para impedir a sua destruição pelas β -lactamases bacterianas. De modo a contornar este facto, são frequentemente administradas em associação com um inibidor das β -lactamases, o que impede a sua destruição.⁹ A ampicilina e a amoxicilina são utilizadas no tratamento de infeções das vias respiratórias superiores provocadas por *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, infeções do trato urinário causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *E. coli*, e meningites bacterianas causadas por *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*.¹⁵

A piperacilina (**Figura 4.9.**) pertence à mais recente classe de penicilinas de largo espectro de ação (ureidopenicilinas ou penicilinas de espectro expandido) e possui na sua estrutura química o grupo funcional ureia na posição α que lhe confere uma atividade semelhante à ampicilina face a bactérias Gram-positivas e uma boa atividade face a espécies anaeróbias e a *P. aeruginosa*. Requer administração por via parentérica, uma vez que é sensível à hidrólise ácida e é habitualmente administrada em conjunto com um inibidor das β -lactamases (tazobactam), de modo a evitar a sua degradação pelas mesmas.⁹ A piperacilina é utilizada na terapêutica de infeções complicadas causadas por *P. aeruginosa*, algumas estirpes de *Proteus* e espécies da família *Enterobacteriaceae*.¹⁵

Na **Figura 4.9.** encontram-se representadas as estruturas químicas da penicilina G (benzilpenicilina), penicilina V (fenoximetilpenicilina), flucloxacilina, ampicilina, amoxicilina e piperacilina.

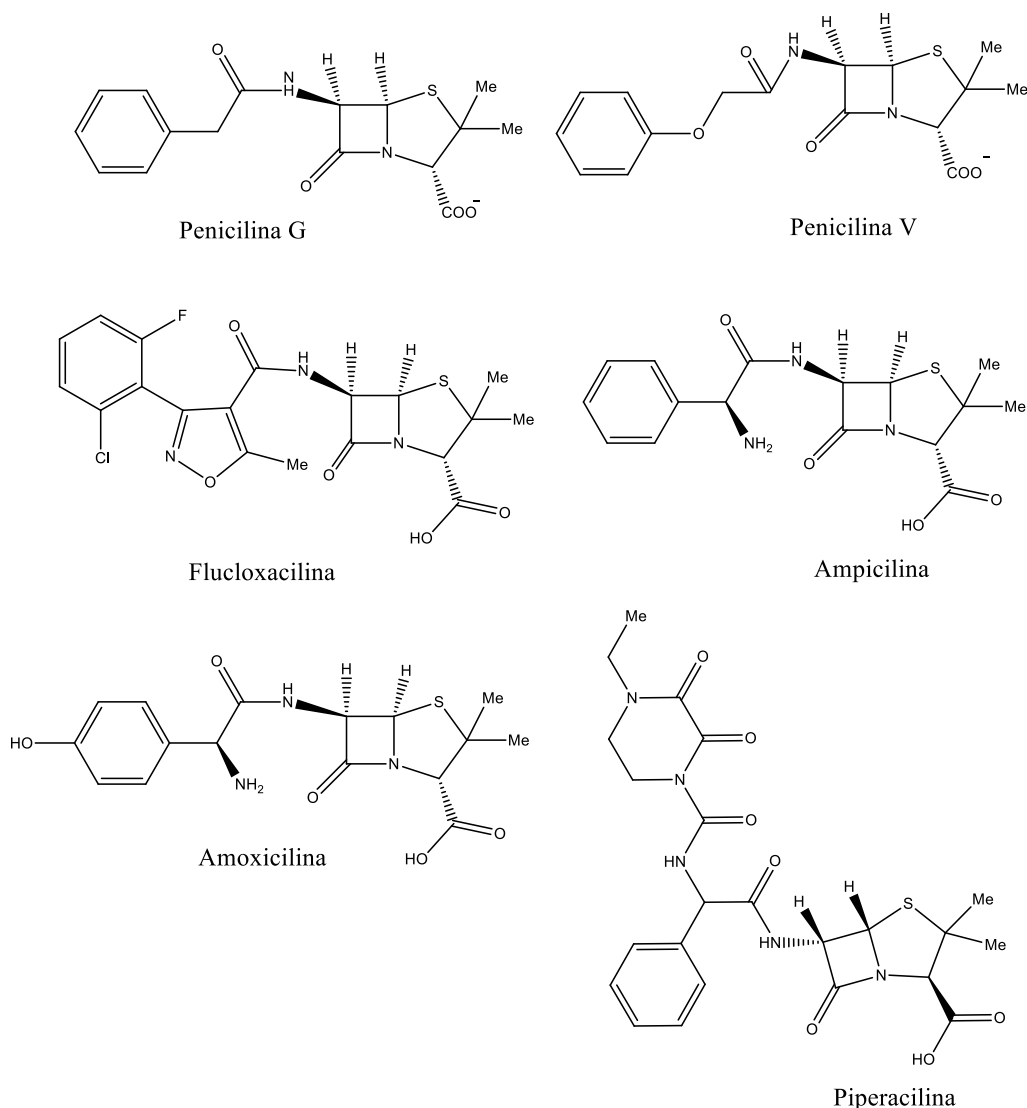


Figura 4.9. Representação da estrutura química da penicilina G (benzilpenicilina), penicilina V (fenoximetilpenicilina), flucloxacilina, ampicilina, amoxicilina e piperacilina.

4.1.3. Inibidores de β -lactamases

A presença de enzimas β -lactamases condiciona a eficácia dos antibióticos β -lactâmicos. A amoxicilina e a piperacilina são muitas vezes prescritas em associação com um inibidor de β -lactamases.¹²

As β -lactamases são enzimas de natureza muito próxima às transpeptidases, o que sugere que possam ter tido origem nas transpeptidases. Tal como as transpeptidases, também as β -lactamases possuem um resíduo de serina no seu local ativo que promove a abertura do anel β -lactâmico, tal como representado na **Figura 4.10.**, formando uma ligação éster com o antibiótico β -lactâmico e tornando-o inativo. Contrariamente às transpeptidases,

as β -lactamases são capazes de hidrolisar a ligação éster formada, libertando em seguida o fármaco após destruição do anel β -lactâmico.⁹

As β -lactamases podem encontrar-se codificadas nos cromossomas das bactérias ou podem ter origem em plasmídeos, o que permite a sua transferência entre diferentes espécies bacterianas.¹³

Algumas estirpes bacterianas Gram-positivas apresentam resistência aos antibióticos β -lactâmicos por libertarem β -lactamases, o que faz com que os antibióticos sejam interceptados e inativados antes mesmo de atingirem a membrana celular da bactéria. A maioria das bactérias Gram-negativas são produtoras de β -lactamases, o que as torna ainda mais resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. Neste caso, as β -lactamases libertadas pela bactéria ficam retidas no espaço periplasmático, fazendo com que os antibióticos absorvidos se deparem com uma elevada concentração de β -lactamases no interior do microrganismo, pelo que as bactérias Gram-negativas são, na sua quase totalidade, resistentes aos antibióticos β -lactâmicos.⁹

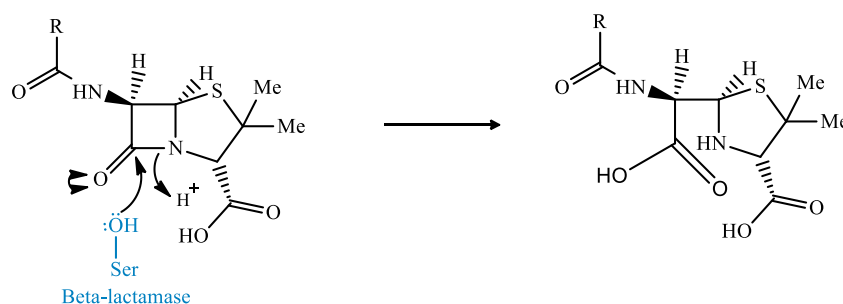


Figura 4.10. Representação da reação de destruição do anel β -lactâmico da penicilina pela β -lactamase.

No entanto, algumas moléculas são capazes de inibir as β -lactamases, impedindo a destruição e inativação dos antibióticos β -lactâmicos.¹⁵

Os inibidores de β -lactamases revelam uma maior atividade contra β -lactamases codificadas por plasmídeos (como é o caso das β -lactamases que hidrolisam a ceftazidima e cefotaxima), relativamente a β -lactamases de origem cromossômica que são induzidas em bastonetes Gram-negativos, como *Enterobacter*, *Acinetobacter* e *Citrobacter* pela terapêutica com cefalosporinas de segunda e terceira geração.¹⁵

Os inibidores de β -lactamases possuem uma fraca atividade antimicrobiana intrínseca, atuando sobretudo como inibidores “suicidas” das β -lactamases, uma vez que se ligam de

forma irreversível às mesmas, evitando a degradação dos fármacos antibacterianos. Alguns exemplos de inibidores das β -lactamases são o ácido clavulânico e as penicilinosulfonas sulbactam e tazobactam (**Figura 4.11.**)¹⁵

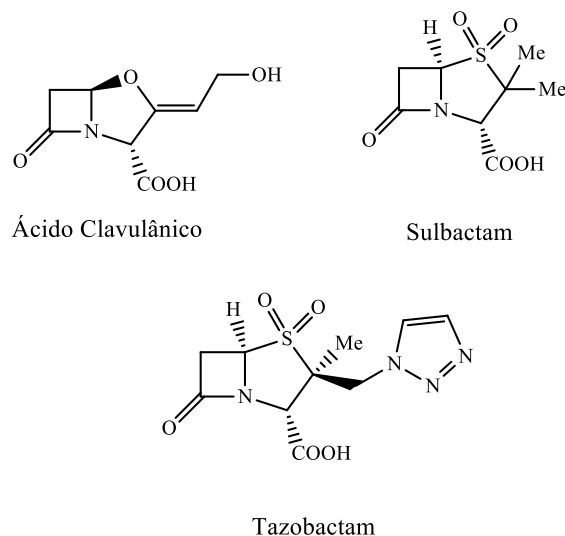


Figura 4.11. Representação da estrutura química do ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

Os inibidores das β -lactamases são geralmente administrados em conjunto com antibióticos β -lactâmicos como no caso da associação entre amoxicilina e ácido clavulânico e piperacilina e tazobactam.¹²

4.2. Cefalosporinas

4.2.1. Estrutura química e otimização das cefalosporinas

Apesar do sucesso terapêutico alcançado com a penicilina, esta não se apresentava ativa contra todas as estirpes bacterianas, persistindo a necessidade de desenvolver novos fármacos. Uma vez que a penicilina é um metabolito produzido por uma espécie de fungo e que apresenta toxicidade contra as bactérias, este poderia então ser o ponto de partida para a descoberta de novos fármacos antibacterianos. Deste modo, investigadores de todo o mundo focaram-se no estudo de culturas microbianas que levaram à posterior descoberta de novos fármacos nas décadas seguintes, nomeadamente a cefalosporina C.⁹ A primeira cefalosporina (cefalosporina C) foi isolada por volta de 1940 a partir do fungo *Cephalosporium acremonium* encontrado em águas residuais na ilha de Sardenha.⁹

O fungo foi então a primeira fonte de cefalosporinas, verificando-se a sua ação inibitória sobre o desenvolvimento de culturas de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente descobriu-se que as cefalosporinas exercem ação antibacteriana inibindo a síntese de parede celular das bactérias através de mecanismos semelhantes aos da penicilina.¹⁵

A estrutura da cefalosporina C (**Figura 4.12.**) apresenta semelhanças relativamente à estrutura das penicilinas, contendo um sistema bicíclico composto pelo anel β -lactâmico ligado a um anel dihidrotiazina de seis membros em vez de um anel tiazolidina.⁹

A cefalosporina C apresenta uma cadeia lateral que deriva do ácido D- α -aminoadípico e um anel diidrotiazina- β -lactâmico (ácido 7-aminocefalosporânico ou 7-ACA), a partir do qual foram produzidas as restantes cefalosporinas por alteração das cadeias laterais.¹⁵

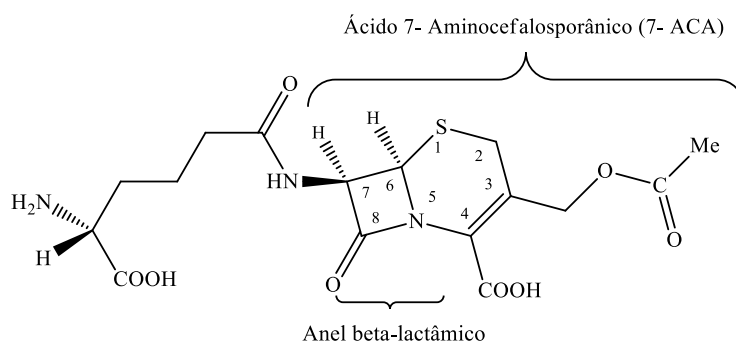


Figura 4.12. Representação da estrutura química da cefalosporina C.

A cefalosporina C apresenta apenas 1/1000 da atividade da penicilina G mas apresenta boa atividade sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Possui também outras vantagens relativamente à penicilina como uma maior resistência à hidrólise ácida bem como uma maior resistência à destruição por β -lactamases.⁹

Com o posterior isolamento do núcleo ativo da cefalosporina C (ácido 7-aminocefalosporânico) e com a introdução de substituintes com diversidade estrutural, produziram-se análogos semissintéticos da cefalosporina C com atividade antibacteriana superior.¹⁵

O estudo de moléculas análogas à cefalosporina C demonstrou a importância do anel β -lactâmico no sistema bicíclico, do grupo carboxilato ionizado na posição 4 e da cadeia lateral acilamino na posição 7. Deste modo, existe um número limitado de locais passíveis

de sofrer modificação, mas ainda assim existem mais possibilidades de modificação do que na estrutura molecular das penicilinas, que permite um número muito reduzido de alterações sem que se perca a sua atividade antibacteriana. Assim, e relativamente às cefalosporinas, podem introduzir-se variações na cadeia lateral 7-acilamino, na cadeia lateral 3-acetoximetilo e uma substituição extra no carbono 7 da estrutura molecular das cefalosporinas sem que haja perda de atividade antibacteriana.⁹

No entanto, existem algumas diferenças entre cefalosporinas e penicilinas, por exemplo em relação às suas cinéticas e às suas semividas.¹⁸

A estrutura química genérica das cefalosporinas encontra-se representada na **Figura 4.13**.

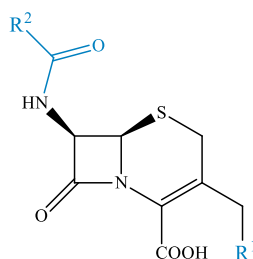


Figura 4.13. Representação da estrutura química genérica das cefalosporinas. As cadeias laterais variáveis encontram-se representadas a azul na imagem.

4.2.2. Mecanismo de ação das cefalosporinas

As cefalosporinas atuam tal como as penicilinas através da ligação irreversível às PBPs provocando a inibição da enzima transpeptidase que realiza o “*cross-linking*” entre cadeias peptídicas do peptidoglicano da parede celular bacteriana em formação. Desta forma é inibida a formação da parede celular na bactéria, levando à sua lise.⁸

A semelhança estrutural das cefalosporinas com o dipéptido terminal D-Ala-D-Ala da cadeia de peptidoglicano em formação faz com que a enzima transpeptidase seja acilada pelas cefalosporinas, o que impede a produção de parede celular bacteriana tal como representado na **Figura 4.14**.²³

Cross-linking Normal

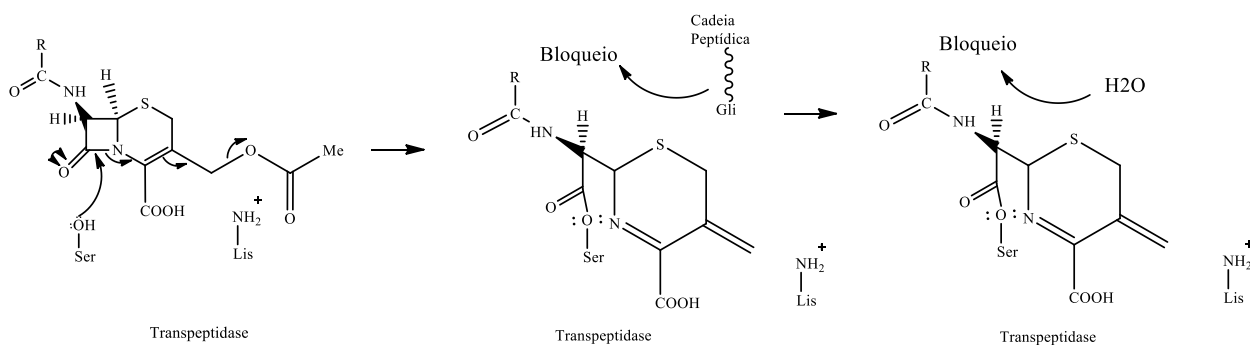
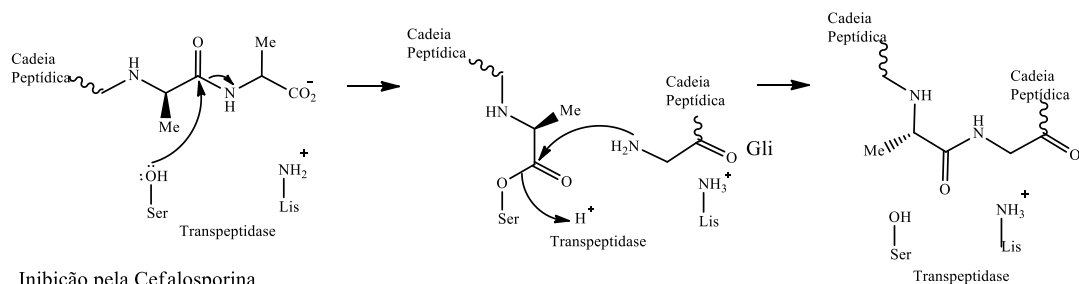


Figura 4.14. Representação do mecanismo de inibição da enzima transpeptidase pelas cefalosporinas.

O desenvolvimento de análogos da cefalosporina C com diferentes cadeias laterais na posição 7 revelou-se inicialmente uma tarefa complicada pois, ao contrário das penicilinas, não era possível a obtenção do ácido 7-aminocefalosporânico através de fermentação ou através de hidrólise enzimática da cefalosporina C, impedindo assim uma abordagem semissintética na produção de análogos da cefalosporina C.⁹

A única forma de obter o ácido 7-aminocefalosporânico a partir da cefalosporina C seria então através de uma hidrólise química, embora esta tarefa fosse aparentemente difícil pois implicaria a hidrólise de uma amida secundária na presença de um anel β -lactâmico, intrinsecamente muito reativo. Foi então desenvolvido um método (representado na **Figura 4.15.**) baseado na formação de um imino cloreto, sendo esta reação facilitada por envolver uma amida estabilizada por ressonância. A geometria do anel β -lactâmico evita que o átomo de azoto da lactama contribua com estabilização por ressonância, o que o torna estável nas condições de reação que permitem obter o imino cloreto a partir da amida acíclica. O imino cloreto formado pode então reagir com um álcool, dando origem a um imino éter, sendo este grupo mais suscetível de sofrer hidrólise do que o anel β -lactâmico. Ao adicionar um ácido torna-se possível obter o ácido 7-

aminocefalosporânico, que por sua vez poderá ser acilado dando origem a uma grande variedade de análogos.⁹

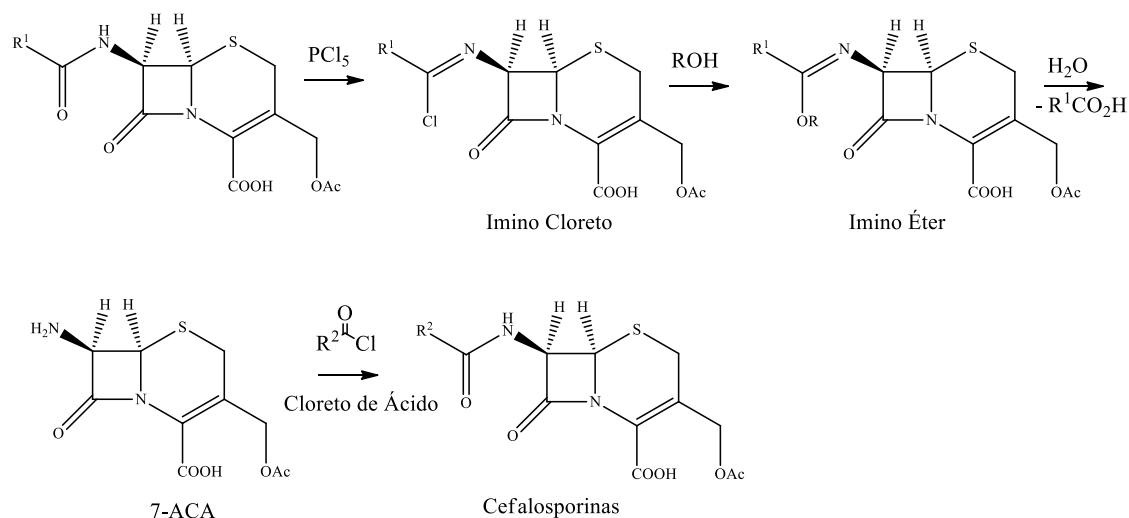


Figura 4.15. Representação do mecanismo de síntese do ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) e dos análogos das cefalosporinas.

As cefalosporinas podem ser agrupadas consoante o seu espectro antibacteriano em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira, quarta ou quinta geração.¹⁵

4.2.3. Cefalosporinas de primeira geração

As cefalosporinas de primeira geração são de origem sintética ou semissintética e são obtidas através da reação do ácido 7-aminocefalosporânico com um cloreto de ácido cujo grupo acilo se liga à amina primária do ácido 7-aminocefalosporânico. Assim, o grupo R² das cefalosporinas obtidas através deste método (**Figura 4.15.**) corresponde ao grupo acilo ligado ao cloreto de ácido que reage com o ácido 7-aminocefalosporânico.⁸

São exemplos de cefalosporinas de primeira geração a cefalotina, a cefaloridina, a cefalexina e a cefazolina (**Figura 4.16.**). De um modo geral, estas apresentam uma atividade inferior às penicilinas mas um espectro de ação mais alargado.⁹

A cefalotina e a cefaloridina foram as primeiras cefalosporinas utilizadas na terapêutica antibacteriana. Ambas apresentaram vantagens relativamente à penicilina, uma vez que possuíam um espectro de ação mais alargado, atuando sobre bactérias Gram-positivas produtoras de penicilinas (β -lactamases que degradam penicilinas) e também contra

bactérias Gram-negativas. Apresentavam no entanto algumas desvantagens relativamente às penicilinas, nomeadamente fraca atividade contra *Enterococcus faecalis* e *Haemophilus influenzae*.⁸

No entanto, tem-se verificado o desenvolvimento de resistências face às cefalosporinas, especialmente por parte de bactérias Gram-negativas, que apresentam β -lactamases mais efetivas do que as bactérias Gram-positivas. O facto de as cefalosporinas possuírem grupos substituintes volumosos, faz com estes protejam o anel β -lactâmico do ataque e destruição por parte das β -lactamases. Porém, a existência destes grupos volumosos pode dificultar a inibição da enzima transpeptidase por parte das cefalosporinas.⁹

Apesar de ter sido bastante utilizada na prática clínica, a cefalotina apresenta a desvantagem de possuir um grupo acetiloxi na posição 3 que é facilmente hidrolisado pelas esterases, dando origem a um álcool, menos ativo. O grupo acetiloxi é importante no mecanismo de inibição da transpeptidase e funciona como um bom grupo abandonante, enquanto que o álcool é um grupo abandonante muito mais fraco.⁹

A cefalotina é estável face às β -lactamases estafilocócicas, sendo no entanto muito suscetível às β -lactamases de bacilos Gram-negativos.⁸

De modo a contornar esta limitação, substituiu-se o éster (grupo acetiloxi) por um grupo mais estável e menos suscetível às esterases, o grupo piridínio, representado na **Figura 4.16.** a azul, originando assim a cefaloridina.⁹

A cefalexina possui um substituinte metilo na posição 3 que aumenta a sua hidrofobicidade, melhorando a sua absorção oral. Apesar do grupo metilo não ser um bom grupo abandonante e poder limitar a ação desta cefalosporina, a presença de um grupo hidrofílico amino no carbono α da cadeia lateral 7-alilamino ajuda a melhorar a sua atividade. A cefalexina é uma das poucas cefalosporinas que podem ser administradas por via oral.⁹ A cefazolina é utilizada sob a forma de sal sódico e é também administrada por via injetável. Apresenta menos estabilidade face a β -lactamases estafilocócicas mas boa estabilidade face a β -lactamases de bacilos gram-negativos, apresentando um espetro de ação semelhante ao da cefalotina.⁸

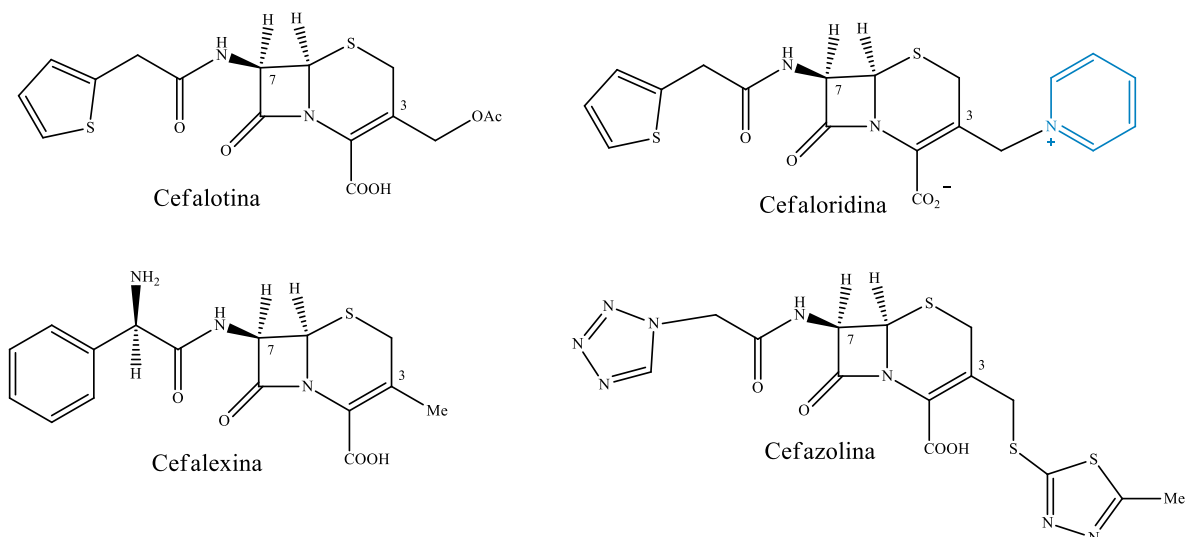


Figura 4.16. Representação da estrutura química das cefalosporinas de primeira geração: cefalotina, cefaloridina, cefalexina e cefazolina.

4.2.4. Cefalosporinas de segunda geração

Ao longo da década de 60 a evolução das cefalosporinas foi bastante lenta, o que conduziu ao desenvolvimento de resistências por parte dos bacilos Gram-negativos produtores de β -lactamases. Mais tarde, na década de 70, surgiram as cefalosporinas de segunda geração com atividade contra bacilos Gram-negativos produtores de β -lactamases, devido à presença de um grupo metoximino na posição 7, o que confere grande estabilidade face às β -lactamases e parece também conferir grande afinidade pelas PBPs de bactérias Gram-negativas. A presença do grupo metoxi na posição 7 do anel β -lactâmico confere, no entanto, uma menor afinidade para as PBPs de bactérias Gram-positivas, tornando as cefalosporinas de segunda geração menos ativas contra estafilococos e enterococos.⁸

Surgiram então dois grupos distintos de cefalosporinas de segunda geração: as cefamicinas, que contêm um substituinte metoxi na posição 7 (7- α -metoxi cefalosporinas); e as oximinocefalosporinas, que possuem um grupo iminometoxi na posição α da cadeia lateral.⁹

As cefamicinas derivam de uma substância chamada cefamicina C (**Figura 4.17.**), isolada a partir de culturas de *Streptomyces clavuligerus*, sendo esta a primeira β -lactama isolada a partir de uma fonte bacteriana. Através da modificação da cadeia lateral da cefamicina C obtém-se a cefoxitina (**Figura 4.18.**).⁹

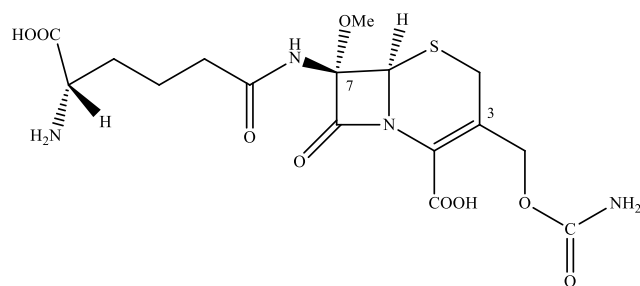


Figura 4.17. Representação da estrutura química da cefamicina C.

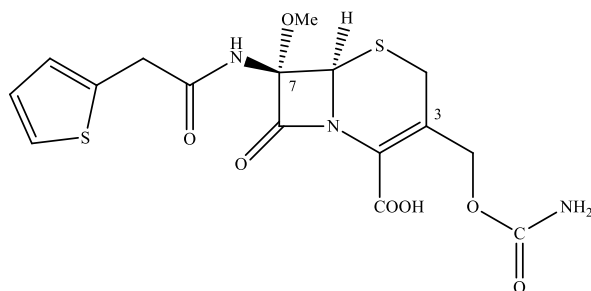


Figura 4.18. Representação da estrutura química da cefoxitina.

A cefoxitina apresenta um espectro de atividade mais alargado do que a maioria das cefalosporinas de primeira geração devido à resistência superior face às β -lactamases conseguida através do impedimento estérico proporcionado pelo grupo metoxi. Apresenta ainda uma boa persistência face às esterases, pois o grupo uretano na posição 3 confere maior estabilidade do que um éster, sendo assim menos suscetível à hidrólise pelas esterases, o que favorece a sua reação com a transpeptidase.⁹

As oximinocefalosporinas apresentam uma grande estabilidade face a β -lactamases produzidas por determinadas espécies (por exemplo, *Haemophilus influenzae*), devido à presença do grupo iminometoxi na posição α da cadeia lateral.⁹

A cefuroxima (**Figura 4.19.**) é um exemplo de uma oximinocefalosporina que, tal como a cefoxitina, apresenta uma resistência superior às β -lactamases e esterases. Todavia, contrariamente à cefoxitina, a cefuroxima mantém a atividade contra estreptococos e, embora em menor extensão, também contra estafilococos.⁹

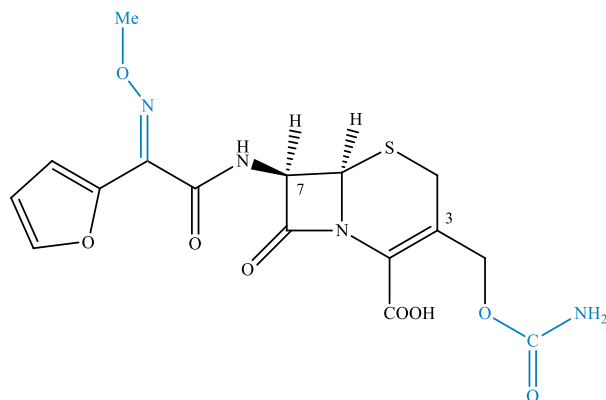


Figura 4.19. Representação da estrutura química da cefuroxima.

4.2.5. Cefalosporinas de terceira geração

No final da década de 70, começa a surgir uma terceira geração de cefalosporinas da qual fazem parte a ceftazidima, a cefotaxima e a ceftriaxona (**Figura 4.20.**).⁹

A substituição do anel furano presente na estrutura química das oximinocefalosporinas pelo anel aminotiazol melhora a penetração destas cefalosporinas através da membrana externa de bactérias Gram-negativas, podendo também aumentar a afinidade do fármaco pela transpeptidase bacteriana. Assim, as cefalosporinas de terceira geração possuem uma atividade acrescida sobre bactérias Gram-negativas, o que torna esta classe ativa contra bactérias que são resistentes a outras β -lactamas. Estas cefalosporinas possuem diferentes grupos substituintes na posição 3, o que lhes confere diferentes propriedades farmacocinéticas. Atualmente, a prescrição deste tipo de fármacos é limitada a casos de infecções mais complicadas que não respondem às β -lactamas mais comumente utilizadas na prática clínica.⁹

A ceftazidima é uma cefalosporina semissintética e pode ser classificada quimicamente como uma oximinocefalosporina. Possui uma elevada afinidade pelas PBPs de *P. aeruginosa* e outros bacilos Gram-negativos, sendo mais estável do que as anteriores cefalosporinas contra as β -lactamases plasmídicas e cefalosporinases (β -lactamases que degradam cefalosporinas).⁸

A cefotaxima é uma cefalosporina semissintética sendo um derivado metoximino do ácido 7-aminocefalosporânico. Apresenta na sua cadeia lateral aminotiazolilacetilo um grupo alfa-sin-metoximino, sendo o grupo aminotiazolilo responsável pelo aumento de

atividade contra *Enterobacteriaceae* e o grupo metoximino responsável por dificultar a hidrólise pelas β -lactamases através de um impedimento estéreo.⁸

A ceftriaxona é também uma oximinocefalosporina semissintética. O grupo metoximino na posição 7 confere estabilidade face às β -lactamases. O seu espectro de ação é semelhante ao da cefotaxima, apresentando boa atividade face a bactérias Gram-negativas e atividade moderada contra bactérias Gram-positivas.⁸

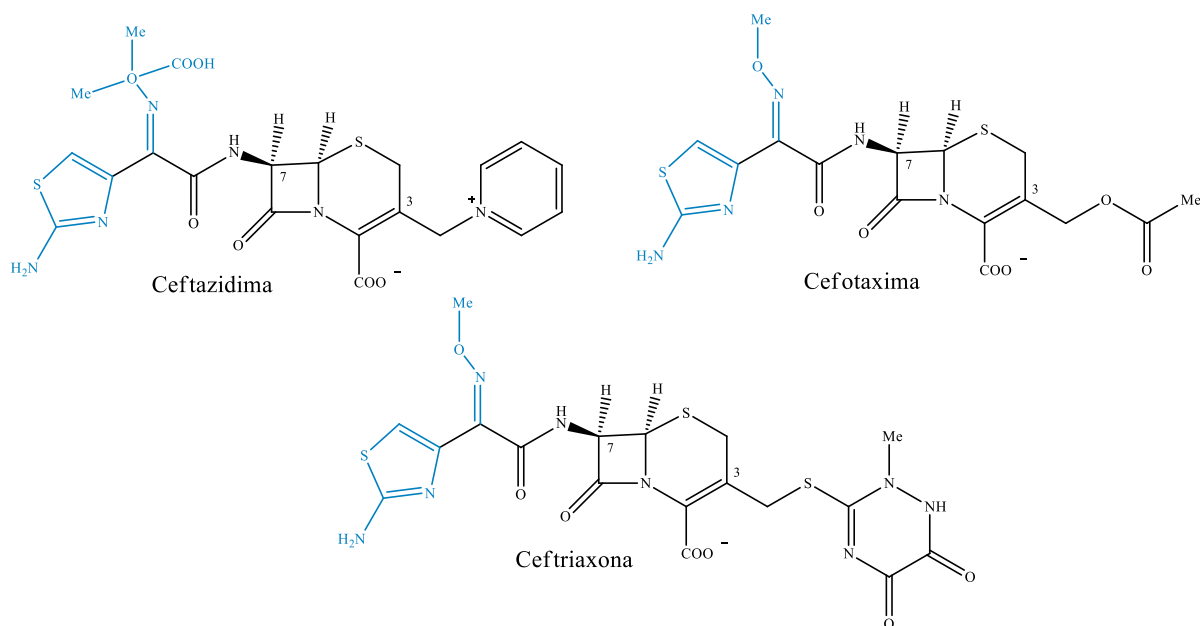


Figura 4.20. Representação da estrutura química das cefalosporinas de terceira geração: ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona.

4.2.6. Cefalosporinas de quarta geração

As cefalosporinas de quarta geração, a cefepima e cefepiroma (**Figura 4.21.**), são comparáveis às cefalosporinas de terceira geração, embora apresentem maior estabilidade face às β -lactamases devido à sua estrutura química. A presença de grupos ácidos nas cadeias introduzidas na posição 7 melhora a atividade contra *P. aeruginosa*. Possui também melhor atividade sobre *S. aureus* sensíveis à meticilina, *S. pneumoniae* e outros streptococos, embora possua atividade reduzida contra *E. faecalis*, *Bacteroides fragilis* e *Listeria monocytogenes*.⁸

São compostos “zwitteriônicos” (compostos que possuem carga positiva e carga negativa) que apresentam substituintes carregados positivamente na posição 3 e um grupo

carboxilato carregado negativamente na posição 4, o que facilita a penetração destas moléculas através dos canais de porina da membrana externa das bactérias Gram-negativas.^{9,8} A cefepima e cefepiroma possuem afinidade para as PBPs de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.⁸

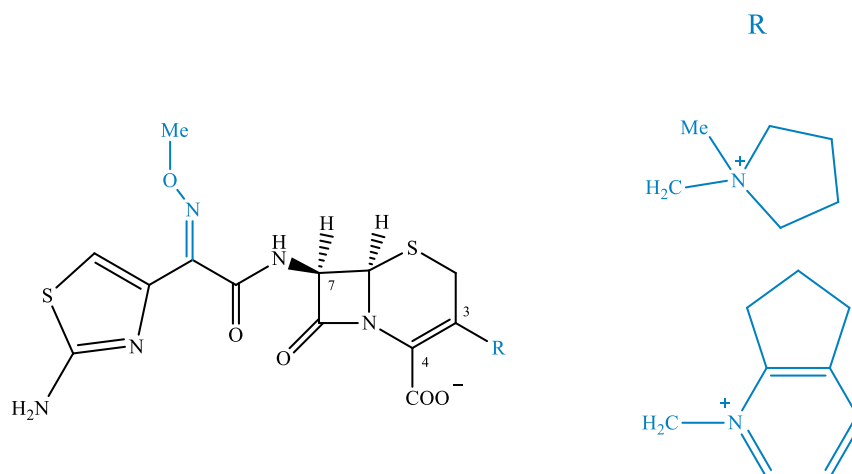


Figura 4.21. Representação da estrutura química das cefalosporinas de quarta geração: cefepima e cefepiroma.

4.2.7. Cefalosporinas de quinta geração

A ceftarolina é uma cefalosporina de quinta geração que possui atividade contra estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina e também contra estirpes de *S. pneumoniae* multirresistentes.⁹ A fosamil ceftarolina atua como pró-fármaco da ceftarolina, sendo convertida em ceftarolina (fármaco ativo) no plasma, através da ação das fosfatases, tal como se pode observar na **Figura 4.22.**²⁴

A presença do anel 1,3-tiazol na posição 3 do sistema bicíclico proporciona uma forte ligação da ceftarolina com as PBPs 1-4 e PBPs 2a de *S. aureus* resistentes à meticilina, o que justifica a sua atividade sobre esta espécie bacteriana.^{25,26} Por outro lado, a retenção do anel 1,2,4-tiadiazol facilita a penetração através da membrana de bactérias Gram-negativas, apresentando assim atividade face às bactérias da família *Enterobacteriaceae* e a outras bactérias Gram-negativas.²⁷

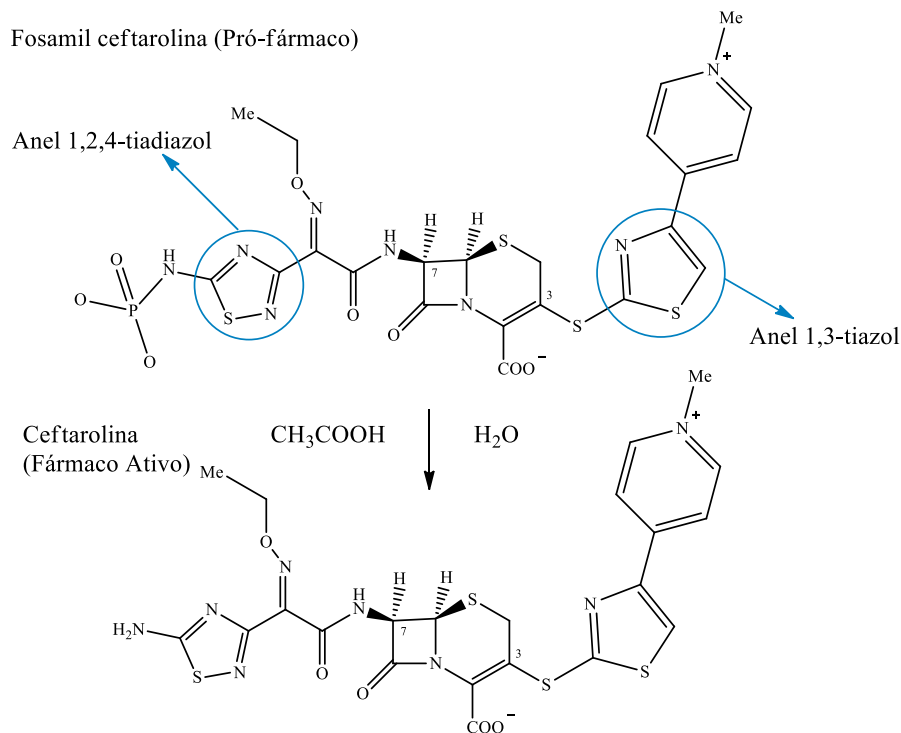


Figura 4.22. Representação da estrutura química do pró-fármaco fosamil ceftarolina e do seu metabolito ativo ceftarolina.

4.2.8. Utilização terapêutica e espectro de atividade das cefalosporinas

As cefalosporinas de primeira geração apresentam boa atividade contra bactérias Gram-positivas e atividade moderada contra bactérias Gram-negativas. São ainda ativas contra a maioria dos cocos gram-positivos à exceção dos enterococos, de *S. aureus* resistentes à meticilina e de *S. epidermidis*. Apresentam também uma boa atividade contra *Moraxella catarrhalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*.⁸

As cefalosporinas de segunda geração apresentam uma atividade ligeiramente superior contra bactérias Gram-negativas. A cefoxitina é também ativa contra *Bacteroides fragilis*.⁸

As cefalosporinas de terceira geração são, de uma forma geral, menos ativas do que as cefalosporinas de primeira geração contra cocos Gram-positivos mas apresentam maior atividade face a bactérias da família *Enterobacteriaceae*, incluindo estirpes produtoras de β -lactamases. A ceftazidima possui ainda atividade contra *P. aeruginosa* mas apresenta menor atividade do que outras cefalosporinas de terceira geração face a cocos Gram-positivos.⁸

As cefalosporinas de quarta geração apresentam um espectro muito alargado, em comparação com as cefalosporinas de terceira geração e maior estabilidade face à ação de β -lactamases mediadas por plasmídeos e de origem cromossômica. São geralmente utilizadas no tratamento de infeções causadas por bactérias Gram-positivas, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*.⁸

4.3. Carbapenemos

4.3.1. Estrutura química e otimização dos carbapenemos

Os carbapenemos são antibióticos β -lactâmicos que possuem na sua estrutura química o anel β -lactâmico associado a um anel de cinco membros. Diferem das penicilinas por possuírem o anel de cinco membros insaturado e um átomo de carbono em vez de um átomo de enxofre e, enquanto que os restantes antibióticos β -lactâmicos possuem um aminoacilo com configuração *cis* na cadeia lateral, os carbapenemos possuem um grupo hidroxietilo com configuração *trans*.^{15,8}

A **Figura 4.23.** compara as estruturas químicas de penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos.

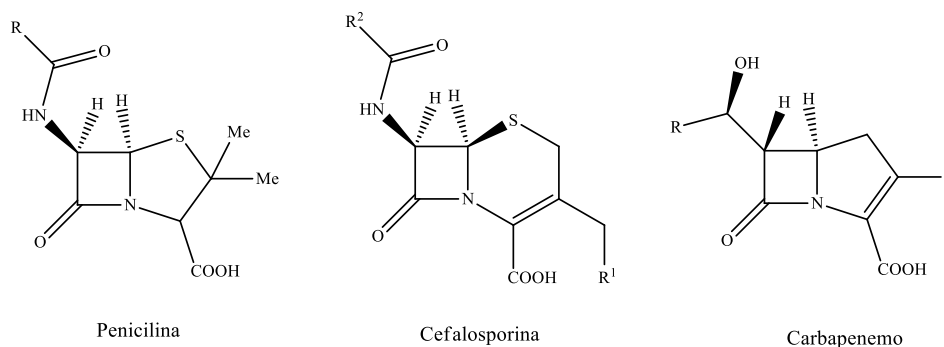


Figura 4.23. Comparação das estruturas químicas de penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos.

O átomo de carbono na posição C-1 parece desempenhar um papel fundamental no espectro de atividade e na estabilidade face às β -lactamases e a cadeia lateral R² hidroxietilo (**Figura 4.24.**) parece contribuir para a estabilidade face à hidrólise por parte das β -lactamases.²⁸

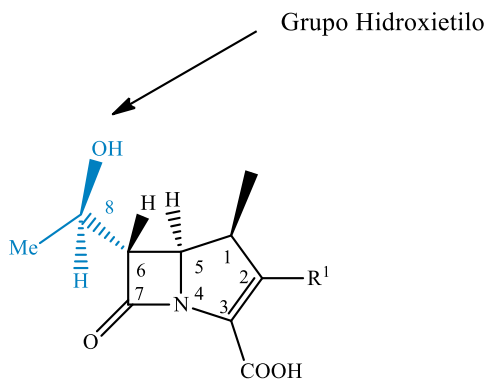


Figura 4.24. Representação da estrutura química genérica dos carbapenemos.

Os carbapenemos com uma configuração R no carbono C-8 (**Figura 4.25.**) são geralmente bastante potentes. A configuração *trans* do anel β -lactâmico em C-5 e C-6 (**Figura 4.26.**) contribui também para uma elevada estabilidade face às β -lactamases.²⁹ Tal como a tienamicina, os restantes carbapenemos possuem uma configuração R em C-8 e uma substituição C-5-C-6 *trans*. Os carbapenemos com o tioéter posicionado entre aminas cíclicas (meropenemo e ertapenemo) possuem um espectro antibacteriano alargado.³⁰

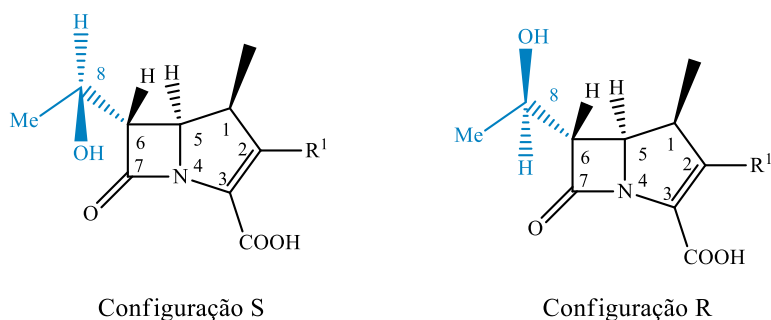


Figura 4.25. Representação das configurações S e R no carbono C-8 dos carbapenemos.

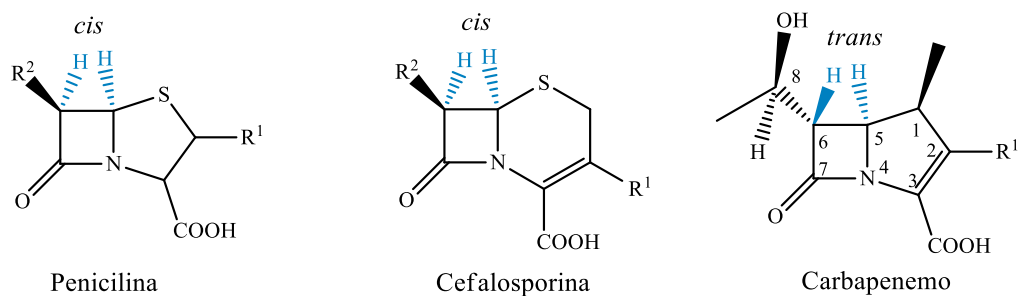


Figura 4.26. Representação da configuração *trans* da ligação C-5-C-6 nos carbapenemos e da configuração *cis* da ligação correspondente nas penicilinas e cefalosporinas.

A tienamicina, cuja estrutura química se encontra representada na **Figura 4.27.**, foi o primeiro carbapenemo a ser isolado a partir da bactéria *S. cattleya* em 1976. Apresenta um espectro de atividade bastante alargado, sendo ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* e apresenta também uma elevada resistência face às β -lactamases devido à presença da cadeia lateral hidroxietilo na sua estrutura química. Surpreendentemente, este carbapenemo não possui o átomo de enxofre nem a cadeia lateral aminoacilo, que se julgava até então serem essenciais para a atividade antibacteriana. Para além disso, a estereoquímica da cadeia lateral no substituinte 6 é oposta à estereoquímica usualmente encontrada nas penicilinas e cefalosporinas sendo este também um fator que irá contribuir para a resistência da molécula às β -lactamases.⁹ Devido à sua instabilidade química, a tienamicina nunca chegou a ser utilizada na terapêutica mas através da adição do grupo N-formidoílo na posição 2 viria a dar origem a outro carbapenemo, o imipenem.³¹

O imipenem, cuja estrutura química se encontra representada na **Figura 4.27.**, é um análogo da tienamicina frequentemente administrado em combinação com cilastatina, uma vez que o imipenem é eliminado por via renal e apresenta o inconveniente de ser rapidamente hidrolisado no rim, pela enzima dihidropeptidase I, originando um metabolito inativo com rutura do anel β -lactâmico. A cilastatina irá então inibir de forma competitiva a atividade da dihidropeptidase I, evitando a degradação do imipenem pela mesma.^{9,8}

O meropenem cuja estrutura química se encontra representada na **Figura 4.27.**, é também um análogo da tienamicina mas apresenta na posição 2 do anel anexo ao anel β -lactâmico um N-dimetil-carbamoil-tetrahidropirrolidilo, em vez de um N-formidoílo, o que lhe

confere maior estabilidade face à dihidropeptidase renal.^{9,8} Para além disso, o meropenem consegue penetrar com maior facilidade na membrana externa das bactérias Gram-negativas, sendo por isso ainda mais ativo do que o imipenem contra bactérias Gram-negativas.⁹

O ertapenem, cuja estrutura química se encontra representada na **Figura 4.27.**, possui uma estrutura química semelhante ao meropenem. O meropenem apresenta, no entanto, um grupo metilo extra no anel carbapenem, o que lhe confere uma maior estabilidade face à dihidropeptidase renal. Por outro lado, o ertapenem possui o benzoato que favorece a ligação às proteínas plasmáticas, prolongando o tempo de meia-vida do fármaco e reduzindo o número de administrações diárias necessárias.⁹

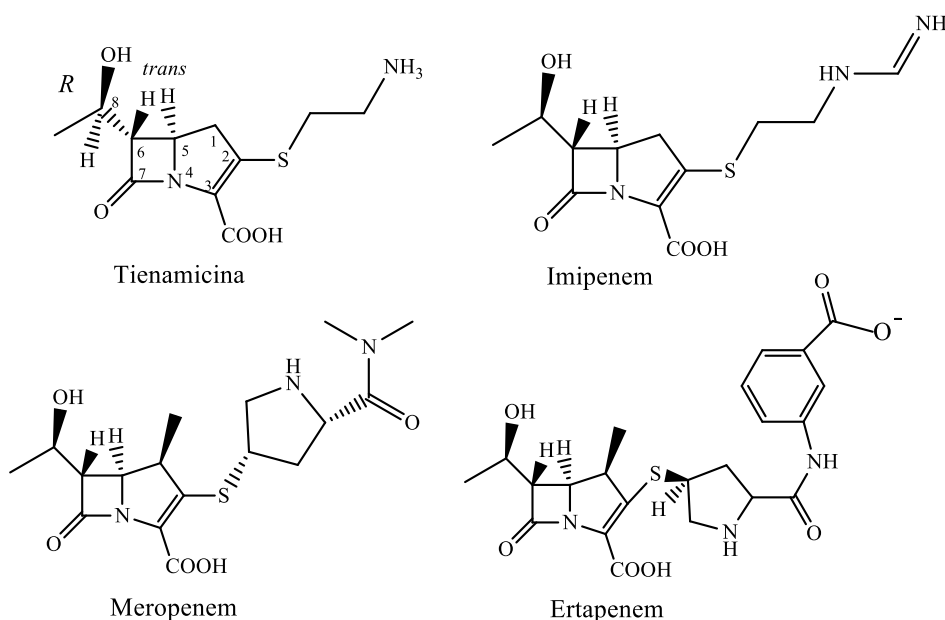


Figura 4.27. Representação da estrutura química da tienamicina, imipenem, meropenem e ertapenem.

4.3.2. Mecanismo de ação dos carbapenemos

Os carbapenemos atuam, tal como os restantes antibióticos β -lactâmicos através da inibição da reticulação da parede celular bacteriana. Esta classe de antibióticos constitui o grupo com maior espectro de atividade antibacteriana, de entre os antibióticos β -lactâmicos, atuando contra organismos Gram-negativos e Gram-positivos, aeróbios e anaeróbios.^{12,8} O seu amplo espectro de atividade é devido não só ao facto de os compostos serem “zwitteriônicos”, o que favorece a penetração através dos canais de porina das

células bacterianas, mas também devido à sua elevada estabilidade face à degradação pelas β -lactamases e à sua forte ligação às PBPs.⁸

Após atravessarem a parede celular bacteriana através dos canais de porina, os carbapenemos atravessam o espaço peri-plasmático e finalmente atuam através da acilação irreversível das PBPs.^{32,33} A ligação dos carbapenemos às PBPs inibe as transpeptidases, tal como representado na **Figura 4.28**. Um fator que justifica a elevada eficácia dos carbapenemos é a sua elevada afinidade para se ligarem a diferentes tipos de PBPs.³² Quando os carbapenemos se ligam às PBPs, é impedida a formação de parede celular bacteriana. Assim sendo, a estrutura de peptidoglicano ficará fragilizada e a célula bacteriana acabará por entrar em lise quando exposta a diferentes pressões osmóticas.³⁴

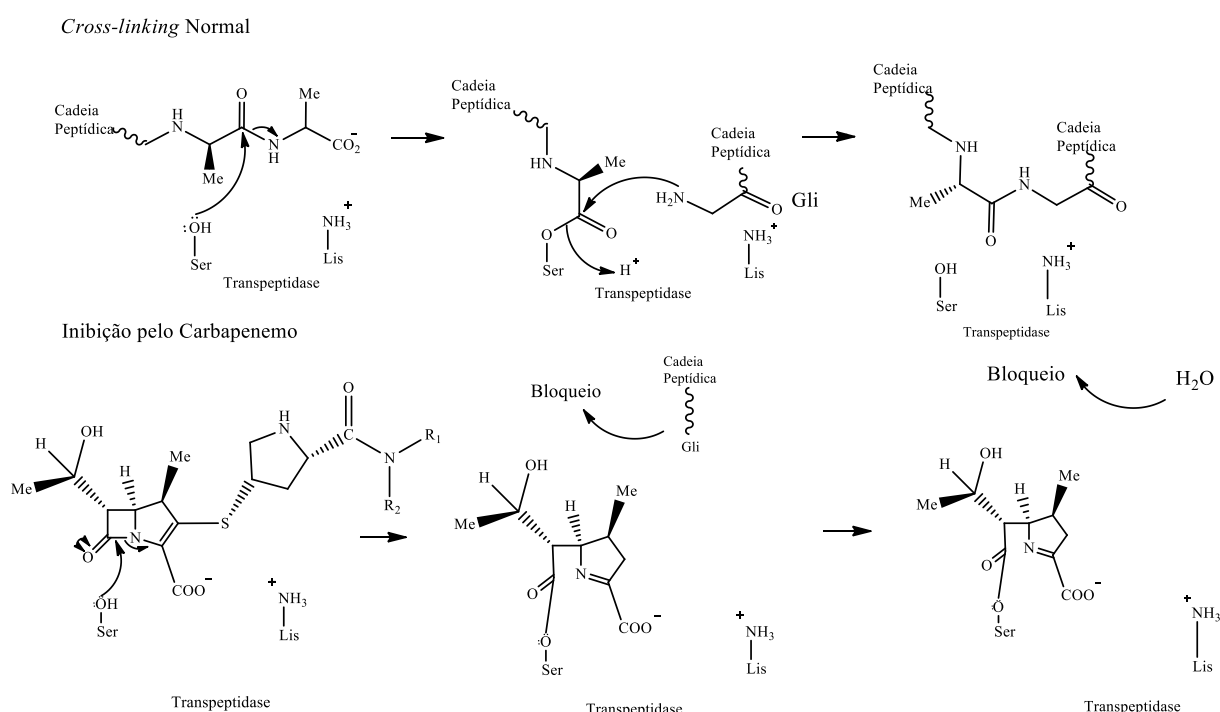


Figura 4.28. Representação da inibição da enzima transpeptidase pelos carbapenemos.

4.3.3. Utilização terapêutica e espectro de atividade dos carbapenemos

O imipenem apresenta atividade contra uma grande variedade de microrganismos aeróbios, anaeróbios, Gram-positivos e Gram-negativos.⁹

É utilizado no tratamento de uma grande variedade de infeções, como por exemplo infeções do trato urinário e vias respiratórias inferiores, infeções intra-abdominais ou ginecológicas, infeções da pele, tecidos moles, ossos e articulações. É utilizado também

no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias resistentes às cefalosporinas, incluindo *Citrobacter freundii* e *Enterobacter*.¹⁵

O imipenem é ativo contra estreptococos (incluindo *S. pneumoniae* resistente à penicilina), enterococos (exceto *E. faecium* e as estirpes resistentes à penicilina não produtoras de β -lactamases), estafilococos (incluindo estirpes produtoras de penicilinase), *L. monocytogenes* e microrganismos anaeróbios como *B. fragilis*. Possui uma excelente ação sobre bactérias da família *Enterobacteriaceae*, incluindo os organismos resistentes às cefalosporinas. No entanto, a maior parte das estirpes de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* desenvolveu resistência ao imipenem.^{35,36}

O meropenem é utilizado no tratamento de pneumonias, meningites, infecções abdominais e urinárias. Tal como o imipenem, o meropenem é ativo contra uma variedade de bactérias aeróbias, anaeróbias, Gram-positivas e Gram-negativas, sendo ligeiramente menos ativo do que o imipenem contra bactérias Gram-positivas e mais ativo contra bactérias Gram-negativas. O meropenem é ativo contra estirpes de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem mas apresenta menor atividade contra cocos Gram-positivos.^{9,37}

O ertapenem é utilizado no tratamento de infecções abdominais, infecções ginecológicas agudas, pneumonias adquiridas na comunidade, infecções da pele e tecidos moles relacionadas com o pé diabético e ainda na profilaxia associada à cirurgia colorretal. Difere do imipenem e do meropenem por possuir uma atividade inferior contra *P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter*. Possui, no entanto, uma interessante atividade contra bactérias Gram-positivas, *Enterobacteriaceae* e bactérias anaeróbias.³⁸

5. Desenvolvimento de resistência a fármacos antibacterianos

A resistência a um antibiótico ocorre quando uma bactéria é capaz de sobreviver e de se desenvolver na presença de uma concentração de fármaco que é usualmente suficiente para inibir o seu crescimento ou causar a sua morte.³⁹

As bactérias resistentes podem ser transmitidas a humanos e animais através de processos de disseminação pelo meio ambiente e até mesmo pelos alimentos, afetando as relações comerciais, viagens e migrações humanas.⁴⁰ Para o tratamento de infecções causadas por algumas bactérias, particularmente bactérias Gram-negativas, existe atualmente um número muito limitado de opções terapêuticas devido ao desenvolvimento de resistências por estas bactérias aos fármacos utilizados na prática clínica. Salienta-se a resistência desenvolvida pelas bactérias *A. baumannii* e *P. aeruginosa* a carbapenemos e pelas

bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*K. pneumonia*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp.) a carbapenemos e cefalosporinas de terceira geração.^{41,7}

O desenvolvimento de resistências aos fármacos por parte das bactérias é um processo natural que resulta da seleção exercida sobre as bactérias na presença dos antibióticos. O desenvolvimento de resistências a antibióticos tem ocorrido a um ritmo muito acelerado devido à utilização excessiva e inadequada destes fármacos.⁶

Os termos “suscetível” e “resistente” são habitualmente utilizados na prática clínica para inferir acerca do sucesso ou falha da terapêutica. As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes ao fármaco ou desenvolver essa resistência após a exposição ao mesmo, sendo esta chamada de resistência adquirida.³⁹

A resistência pode ser desenvolvida como resultado de uma mutação, ou através da transferência horizontal de genes que codificam para um determinado mecanismo gerador de resistência. A transferência de genes relacionados com a resistência a determinado fármaco pode ocorrer através de diferentes mecanismos tais como conjugação (transferência de genes transportados em plasmídeos, também designados por elementos genéticos móveis), transformação (transferência direta de DNA) ou transdução (transferência de DNA por bacteriófagos) tal como representado na **Figura 5.1**.³⁹

A conjugação ocorre através do contato direto entre duas bactérias. O plasmídeo transporta a informação genética da célula doadora para a célula recetora, o que pode resultar na aquisição de genes que codificam para resistência bacteriana nesta célula. A transformação envolve lise da célula bacteriana doadora, que liberta o seu DNA no meio extracelular e que posteriormente é assimilado por uma outra bactéria recetora. Os genes que codificam para a resistência bacteriana podem depois ser integrados no cromossoma ou no plasmídeo da célula recetora. Pode ainda ocorrer transdução, através da qual os genes são transferidos de uma bactéria para outra por bacteriófagos, podendo ser integrados no cromossoma da célula recetora.⁴²

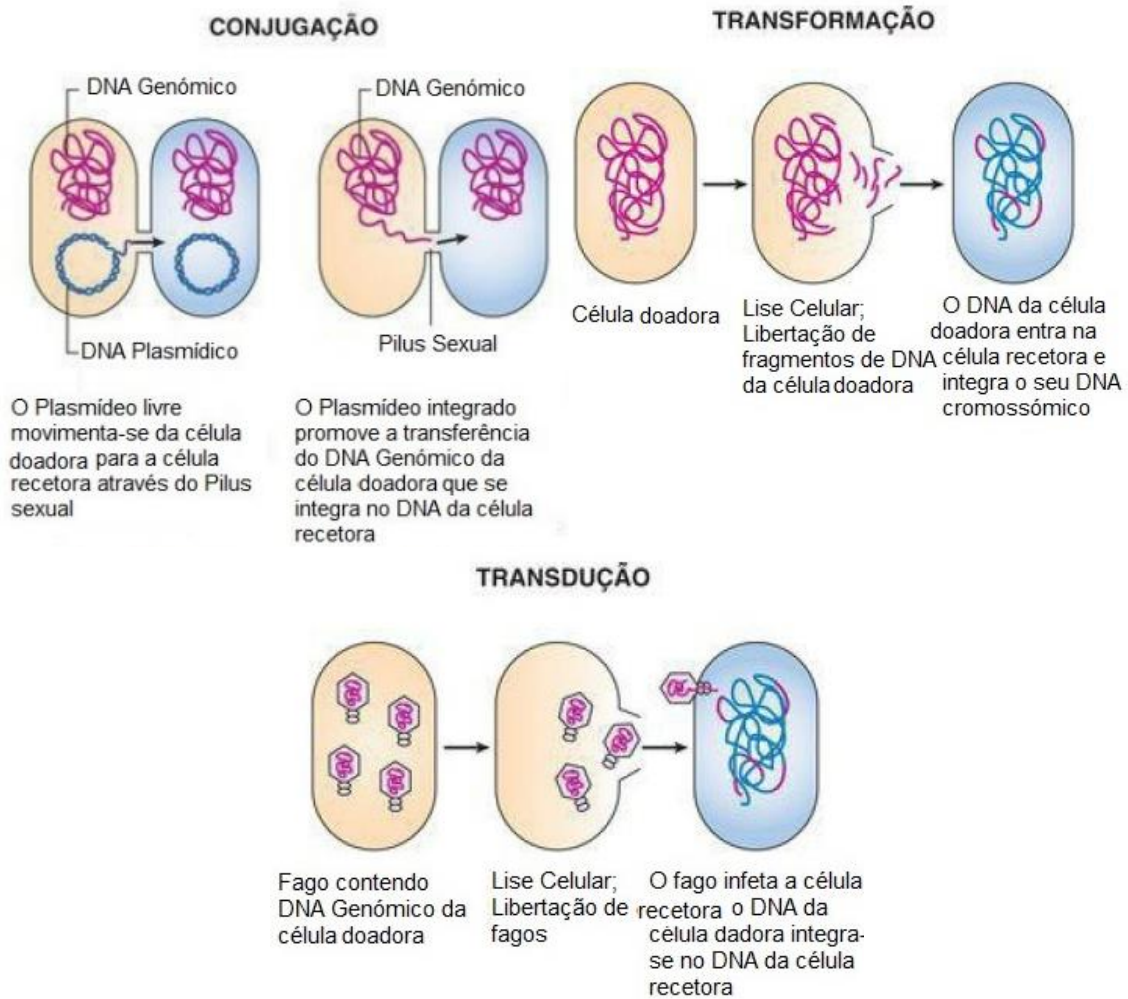


Figura 5.1. Representação dos mecanismos de transferência genética entre bactérias. Adaptado de Rosenthal KS, Tan MJ.⁴³

Como foi referido, a resistência a antibióticos pode ser intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca engloba todas as características da bactéria que possam limitar a ação dos fármacos antimicrobianos. Um exemplo de resistência intrínseca é a existência de uma membrana externa que apresente uma fraca permeabilidade, como acontece no grupo das Gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, bem como a existência de bombas de efluxo em muitas bactérias. A resistência adquirida, ocorre quando um microrganismo originalmente suscetível se torna resistente, através da incorporação de material genético (plasmídeos, transposões, integrões e DNA) ou como resultado de mutações.^{44,45}

Por fim, pode ocorrer resistência adaptativa, que consiste num aumento temporário da capacidade que uma bactéria apresenta para sobreviver face à presença de um antibiótico

devido a alterações na expressão génica. Muitas vezes esta resistência surge como resultado de uma exposição da bactéria a diferentes condições de *stress*, restrição de nutrientes, bem como a doses subterapêuticas de antibiótico.⁴⁶

Em contraste com os mecanismos de resistência intrínseca e adquirida, que são estáveis e podem ser transmitidos verticalmente às gerações seguintes, a resistência adaptativa tem uma natureza transitória e é geralmente reversível quando cessam as condições que a induziram. A fração de células que apresenta esta resistência adaptativa tem a designação de persistente.⁴⁶

Os principais mecanismos celulares de resistência bacteriana aos antibióticos são cinco, nomeadamente: i) inativação do antibiótico por enzimas, tal como as β -lactamases; ii) utilização de bombas de efluxo que permitem a saída forçada do antibiótico, impedindo a sua atividade; iii) modificações nos alvos celulares, inibindo a ligação/ação do antibiótico; iv) decréscimo da permeabilidade celular ou mesmo do número de transportadores, evitando que o antibiótico atinja o seu alvo e v) aumento da produção do alvo, permitindo ultrapassar os danos provocados pelo antibiótico.⁴⁶

Os principais mecanismos celulares de resistência bacteriana aos antibióticos encontram-se descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Mecanismos celulares de resistência bacteriana para cada classe de antibióticos.

Mecanismos celulares de resistência bacteriana aos antibióticos	Antibiótico	Referências
i) Inativação do antibiótico pelas β -lactamases	Penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração, carbapenemos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos	47,48,49
ii) Presença de bombas de efluxo nas membranas celulares das bactérias que permitem a saída forçada de antibiótico, impedindo que este atue	Cefalosporinas, carbapenemos, sulfonamidas, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol e tetraciclinas	50,51
iii) Modificação dos alvos celulares do antibiótico impedindo a sua ligação	Polimixinas, macrólidos e estreptograminas	8
iv) Diminuição da permeabilidade ou número de transportadores, evitando que o antibiótico atinja o seu alvo	Antibióticos β -lactâmicos e fluoroquinolonas	52
v) Maior produção do alvo do antibiótico permitindo minimizar os efeitos do mesmo	Aminoglicosídeos e estreptograminas	53

Todos os anos morrem cerca de vinte e cinco mil pessoas na União Europeia devido a infecções bacterianas adquiridas em ambiente hospitalar e provocadas por bactérias resistentes.⁵⁴ Além das consequências clínicas, a resistência bacteriana acarreta também consequências sociais. Todavia, o número de novos antibióticos lançados no mercado nas

últimas três décadas diminuiu significativamente e a indústria farmacêutica tem reduzido a investigação nesta área, sendo imperativo inverter esta situação.^{55,56}

Atualmente consideram-se como mais preocupantes as bactérias Gram-negativas resistentes, uma vez que as suas membranas externas são mais dificilmente penetráveis e possuem um maior número de bombas de efluxo, o que promove a seleção para resistências aos antibióticos. Atualmente, como foi referido acima, as espécies bacterianas Gram-negativas multirresistentes que suscitam maior preocupação são *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp.^{57,58}

5.1. Mecanismos de desenvolvimento de resistência face às β -lactamas

5.1.1. Hidrólise do anel β -lactâmico pelas enzimas β -lactamases

O núcleo β -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos constitui uma estrutura química bastante reativa. Enquanto que as lactamas incorporadas em anéis de cinco ou seis membros são geralmente mais estáveis, as moléculas que possuem um anel β -lactâmico de apenas quatro membros, formando ângulos de aproximadamente 90° entre os quatro átomos, apresentam uma maior tensão de anel.⁵⁹ Os grupos acilo posicionados numa estrutura química sob tensão são geralmente bons agentes acilantes, ou seja, reagem facilmente com espécies nucleófilicas, acilando-as. A libertação de tensão associada à destruição do anel β -lactâmico originando um produto acíclico é a força motriz da reação. Reações como a hidrólise, a alcoólise, a tio-alcoólise ou a aminólise do anel β -lactâmico são assim favorecidas.¹²

As propriedades antibacterianas dos antibióticos β -lactâmicos advêm da sua capacidade de acilar as transpeptidases bacterianas (PBPs) envolvidas no “*cross-linking*” dos peptidoglicanos da parede celular bacteriana. No entanto, as β -lactamases são enzimas também capazes de destruir o anel β -lactâmico dos antibióticos β -lactâmicos, inativando-os.¹²

Estima-se que as enzimas denominadas β -lactamases tenham surgido há cerca de 2 milhões de anos. Tal como as PBPs, as β -lactamases ligam-se às penicilinas, às cefalosporinas e aos carbapenemos através da reação com o grupo hidroxilo de um resíduo de serina do seu local ativo, que funciona como nucleófilo.⁶⁰ A diferença de reatividade entre PBPs e β -lactamases manifesta-se sobretudo através da cinética de desacilação. As β -lactamases evoluíram para acelerar o ataque pela molécula de água e decompor o intermediário formado, num único passo de desacilação, resultando na

libertação do ácido desativado e na regeneração do local ativo da lactamase, libertando-o para o próximo ciclo catalítico.⁶¹

O plasmídeo TEM-1 contém o gene que codifica a β -lactamase que consegue desacilar o intermediário formado a uma taxa de 2600 eventos por segundo, tornando-o num catalisador extremamente eficiente.⁶² Comparando esta taxa de desacilação com a meia vida de cerca de 90 minutos para o mesmo intermediário peniciloílo-O-Ser numa típica PBP, verifica-se uma diferença na taxa de desacilação de cerca de 2×10^7 , sendo a reação muito mais rápida quando realizada pela β -lactamase.⁶³

Muitas lactamases são catalisadores tão eficientes que sempre que uma lactama se difunde no seu local ativo, é destruída. A hidrólise possui uma eficiência de 100%, sendo as lactamases consideradas como perfeitas no que toca à sua cinética.⁶³

O fator determinante para a sobrevivência das bactérias na presença de penicilinas, cefalosporinas ou carbapenemos é de origem cinética, dependendo em particular do tempo de vida dos intermediários peniciloílo formados. Uma vida mais longa destes intermediários irá determinar a ação do antibiótico, enquanto um curto tempo de vida e uma rápida taxa de desacilação dos intermediários formados irá inevitavelmente favorecer a seleção para resistência aos antibióticos.⁶⁴

O principal alvo dos antibióticos β -lactâmicos são os domínios das PBPs que se encontram voltados para o exterior na membrana celular das bactérias. As PBPs encontram-se na membrana citoplasmática das bactérias.⁶⁴

Para que as β -lactamases possam destruir os antibióticos, devem ser excretadas do citoplasma da célula que as produz e/ou ancoradas à porção exterior da membrana citoplasmática para que possam intercetar as moléculas de antibiótico que penetram na célula antes que estas atinjam o seu alvo (as PBPs). De facto, nas bactérias Gram-negativas, as β -lactamases são codificadas por sequências N-terminal, o que permite o seu reconhecimento e posterior envio para o periplasma.⁶⁵

As β -lactamases são catalisadores de hidrólise muito eficazes e não surpreende que alguns tipos de β -lactamase estejam envolvidos na ocorrência de resistência de algumas bactérias aos antibióticos. Este processo ocorre não só na natureza mas também no organismo dos pacientes, em especial nos pacientes expostos a doses subterapêuticas de antibiótico que,

embora não sejam suficientes para destruir as bactérias, promovem a seleção para resistência.¹³

São atualmente conhecidas milhares de variantes das β -lactamases, agrupadas em diferentes classes (**Figura 5.2.**). As β -lactamases pertencentes às classes A, C e D apresentam uma estrutura semelhante, utilizando a serina do seu local ativo como nucleófilo e um intermediário peniciloílo que funciona como elo catalítico. A eficiência catalítica de cada classe de β -lactamases varia consoante a subclasse de lactamases sobre a qual atuam.^{66,67}

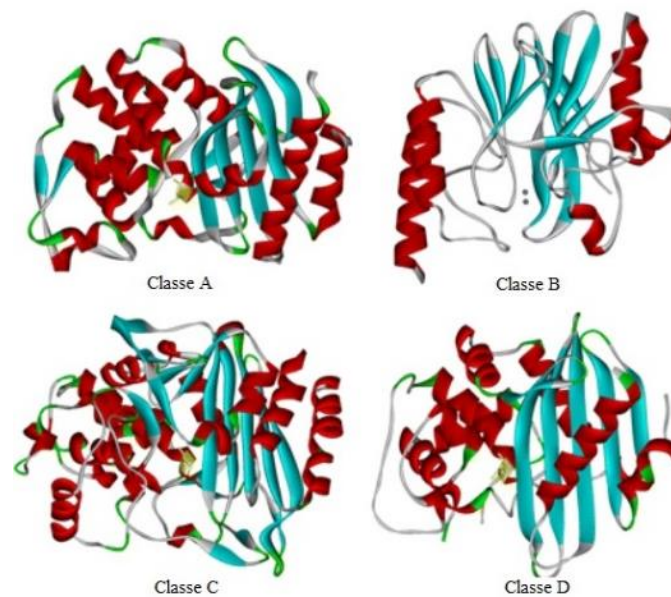


Figura 5.2. Representação da estrutura das diferentes classes de β -lactamases. Drawz SM, Bonomo RA.⁶⁸

As lactamases pertencentes à classe A (KPCs (*K. pneumoniae* Carbapenemases) e a maioria das ESBL (do inglês, *extended-spectrum β -lactamases* ou β -lactamases de espectro alargado)) foram inicialmente identificadas como penicilinasas. Existem ainda as lactamases de classe B (MBLs (Metallo- β -lactamases)), as enzimas de classe C também conhecidas por AmpC (cefalosporinas) e as lactamases de classe D (OXAs ou oxacilinases). Nas últimas décadas tem-se verificado que as lactamases das classes A e C se envolvem na hidrólise de diferentes antibióticos β -lactâmicos, pelo que passaram a ser consideradas como ESBL.^{66,67}

As β -lactamases de classe D (OXAs) foram inicialmente associadas à hidrólise da oxacilina e foi difícil analisá-las até se perceber que a carbamoilação de um resíduo de lisina do local ativo conduz à produção de uma subfamília da classe D com elevada atividade.⁶⁹

As lactamases de classe B utilizam um mecanismo distinto para realizar a hidrólise do anel β -lactâmico.⁷⁰ Contêm no seu local ativo um dímero de zinco em que os cátions metálicos se encontram coordenados a um grupo hidroxilo, obtido por desprotonação de uma molécula de água, sendo mais nucleofílico do que esta, permitindo atuar como substrato direto sem que se forme a acil-enzima. Neste mesmo local ativo, o grupo hidroxilo reage com o grupo carbonilo do anel β -lactâmico da β -lactama, gerando uma estrutura tetraédrica que conduz à formação do ácido penicilóico, desprovido de ação antibacteriana. O processo descrito encontra-se representado na **Figura 5.3**.^{71,72}

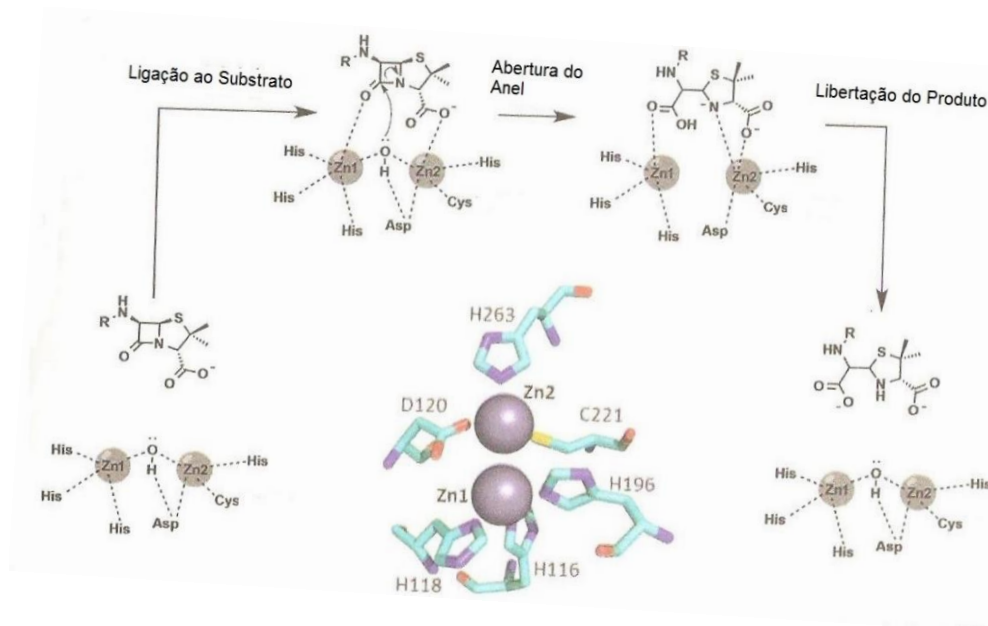


Figura 5.3. Representação do ciclo catalítico das metalo- β -lactamases de classe B. Adaptado de Walsh CT, Wencewicz TA.¹³

A reconstituição do anel β -lactâmico de quatro membros é energeticamente desfavorável e requer o consumo de ATP (adenosina trifosfato), pelo que não ocorre a regeneração do mesmo, sendo a abertura do anel β -lactâmico um processo irreversível. As penicilinosulfonas (sulbactam e tazobactam) e o clavulanato que inativam as β -lactamases das classes A, C e D através da reação com o grupo hidroxila do resíduo de serina do

local ativo não apresentam qualquer ação contra as metalo- β -lactamases (β -lactamases de classe B).⁷³

Foram detetadas inúmeras variantes de metalo- β -lactamases. Enquanto umas se encontram codificadas em cromossomas, outras foram incorporadas em plasmídeos sendo possível a sua transferência entre diferentes espécies bacterianas.⁷³

É provável que a evolução das β -lactamases a partir das transpeptidases tenha gerado cópias dos genes que codificam a enzima β -lactamase nos cromossomas. No entanto, com o passar do tempo essas mesmas cópias acabaram por ser incorporadas em integrões, transposões e plasmídeos, o que permitiu a sua mobilidade entre diferentes espécies bacterianas. A presença de genes que codificam as β -lactamases fornece um enorme estímulo para a sobrevivência de certas bactérias na presença de antibióticos.¹³

A β -lactamase TEM-1 foi isolada pela primeira vez em 1963, a partir de uma estirpe de *E. coli*. A β -lactamase produzida por esta estirpe tornou-se posteriormente amplamente difundida entre a família *Enterobacteriaceae* e as espécies *Neisseria* e *Haemophilus*.⁷⁴

A TEM-1 é produzida como uma pré-proteína de 286 resíduos de aminoácidos contendo uma sequência *N*-terminal de 23 resíduos que permite direcioná-la para o periplasma das bactérias Gram-negativas onde irá intercetar moléculas de antibiótico que se dirigem aos seus alvos. Como já foi mencionado, os alvos moleculares destes antibióticos são as PBPs que se encontram na membrana citoplasmática junto do peptidoglicano.⁷⁴

O péptido formado é posteriormente clivado por peptidases durante a deslocação da β -lactamase para o periplasma.⁶⁴ Dados de 2010 apontam para a existência de uma família com mais de 170 variantes de TEM, com 1 a 5 resíduos substituídos em comparação com a sequência da referência original.⁷⁴

Inicialmente a TEM-1 era ativa apenas contra penicilinas e cefalosporinas de primeira geração mas atualmente sabe-se que é capaz de hidrolisar cefamicinas e cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração, monobactamas e também alguns agentes inibidores das β -lactamases.⁷⁵

Atualmente, as variantes da TEM-1 são classificadas como ESBL. Existem outras variantes de β -lactamases incorporadas em plasmídeos, tal como a enzima SHV-1, que também se dissemina com grande facilidade entre as bactérias e causa resistência às β -

lactamas.⁷⁶ De entre as ESBL mais preocupantes, distingue-se ainda uma família que possui cerca de 40 variantes descritas, designada por CTX-M (cefotaximase).^{47,77,78}

As enzimas pertencentes a esta família possuem uma rápida ação catalítica, sendo capazes de realizar entre 2000 a 3000 ciclos catalíticos por segundo e por local ativo, hidrolisando a cefotaxima (CTX). As enzimas CTX-M apresentam bastantes semelhanças relativamente às β -lactamases cromossómicas encontradas nas espécies *Serratia*, *Klebsiella* e *Proteus*. Estas lactamases são capazes de degradar não só a cefotaxima, mas também a cefuroxima, a ceftriaxona e a ceftazidima, que representam as cefalosporinas de segunda e terceira geração utilizadas no tratamento de infeções complicadas causadas pelas bactérias Gram-negativas.⁴⁷

No entanto, as CTX-M não são ainda capazes de neutralizar carbapenemos e 7- α -metoxi cefalosporinas possivelmente devido à diferente orientação das junções dos anéis presentes nas estruturas químicas destes antibióticos, relativamente às penicilinas e às restantes cefalosporinas.⁴⁷

As β -lactamases capazes de hidrolisar carbapenemos foram detetadas em isolados clínicos e são lactamases das classes A ou D. A enzima representativa da classe A é a carbapenemase KPC-1 de *K. pneumoniae*.⁷⁹ Estas β -lactamases acabaram por se disseminar também nas estirpes de *Acinetobacter* e nas espécies da família *Enterobacteriaceae*. As carbapenemases KPC-1 são capazes de hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos de largo espectro, incluindo os carbapenemos. Desta forma, considera-se que atualmente nenhum antibiótico β -lactâmico será eficaz contra um agente patogénico portador do gene *kpc-1*, sendo que já foram encontradas doze variantes deste gene.^{80,48}

Uma segunda classe de lactamases capazes de neutralizar a ação dos carbapenemos é a família GES (do inglês *Guiana-extended-spectrum β -lactamase* ou β -lactamase de espectro alargado de Guiana), da qual já foram registadas 22 variantes. Carbapenemases de classe D, da subfamília OXA foram já documentadas em estirpes clínicas de *A. baumannii*.^{81,82}

Uma metalo- β -lactamase (β -lactamase de classe B) detetada pela primeira vez em Nova Deli (NDM-1 – Nova Deli metallo- β -lactamase) foi posteriormente disseminada para o Reino Unido e não existem atualmente antibióticos β -lactâmicos capazes de erradicar os agentes patogénicos que expressam o gene que codifica para a NDM-1.^{83,58}

5.1.2. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são de grande importância para os agentes patogênicos Gram-negativos e facilitam o desenvolvimento de resistência intrínseca aos fármacos antibacterianos.⁸⁴

As bactérias Gram-negativas são capazes de controlar a entrada de antibiótico e de outras pequenas moléculas fazendo variar o tamanho e o número de porinas presentes nas suas membranas externas. A variante de OprD (canal que permite a passagem de aminoácidos) de *Pseudomonas* é capaz de reduzir o número de poros presentes na sua membrana, apresentar porinas com poros mais estreitos ou mesmo uma membrana externa sem quaisquer poros. Todas estas estratégias permitem reduzir a quantidade de antibiótico que é absorvido pela bactéria, mesmo antes de as bombas de efluxo entrarem em ação.^{46,13,8}

Existem cinco classes de proteínas que evoluíram distintamente e que se inserem nas membranas bacterianas, funcionando como bombas de efluxo.^{85,86} As diferentes classes de bombas de efluxo são as MFS (do inglês *major facilitator class* ou classe de facilitadores principais), as RND (do inglês *resistance-nodulation-division* ou resistência-nodulação-divisão), as SMR (do inglês *small multidrug resistance class* ou pequena classe de resistência a múltiplos fármacos), as MATE (do inglês *multidrug and toxin exclusion* ou exclusão de múltiplos fármacos e toxinas) e as ABC (do inglês *ATP-binding cassette* ou cassete de ligação ao ATP). Muitas vezes, o transporte de ligandos/solutos através de uma membrana e contra um gradiente de concentração, requer energia. As primeiras quatro classes de bombas de efluxo referidas anteriormente utilizam como força motriz o fluxo de prótons na célula contra o gradiente de concentração.¹³

A distribuição assimétrica de prótons através das membranas celulares das bactérias é gerada pelo fluxo de prótons à medida que os elétrons fluem pelas cadeias respiratórias das membranas, criando assim uma diferença de potencial eletroquímico e o consequente gradiente de prótons. As bombas de efluxo da classe ABC utilizam um mecanismo distinto, recorrendo à hidrólise de ATP na face interna da membrana citoplasmática para impulsionar o influxo de nutrientes para a célula bem como o efluxo de metabolitos para o seu exterior. As cinco classes de bombas de efluxo presentes nas membranas bacterianas bem como exemplos dos solutos bombeados para o meio exterior por cada uma das classes de bombas de efluxo encontram-se representados na **Figura 5.4.**¹³

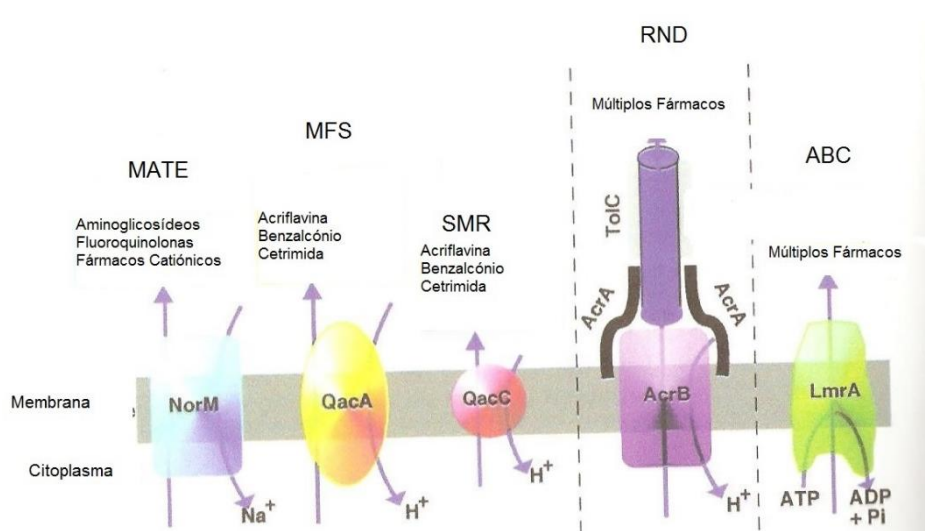


Figura 5.4. Representação das cinco diferentes classes de bombas de efluxo presentes nas membranas bacterianas bem como de exemplos de solutos bombeados para o meio exterior por cada uma das classes de bombas de efluxo. Adaptado de Walsh CT, Wencewicz TA.¹³

As bactérias Gram-negativas necessitam de bombas de efluxo que abranjam os três compartimentos celulares: a membrana externa, o espaço periplasmático e membrana interna ou citoplasmática.^{87,88} Deste modo, estas bactérias têm que fazer passar os antibióticos através de duas membranas (membrana externa e membrana interna) e possuem uma bomba de efluxo composta por um complexo de três proteínas que abrange a membrana externa, a membrana interna ou citoplasmática e o periplasma tal como representado na **Figura 5.5.**⁴⁶

O componente AcrB encontra-se na membrana interna e o componente TolC encontra-se na membrana externa. O terceiro componente, AcrA, encontra-se no periplasma e faz a ligação entre o componente AcrB e TolC.¹³

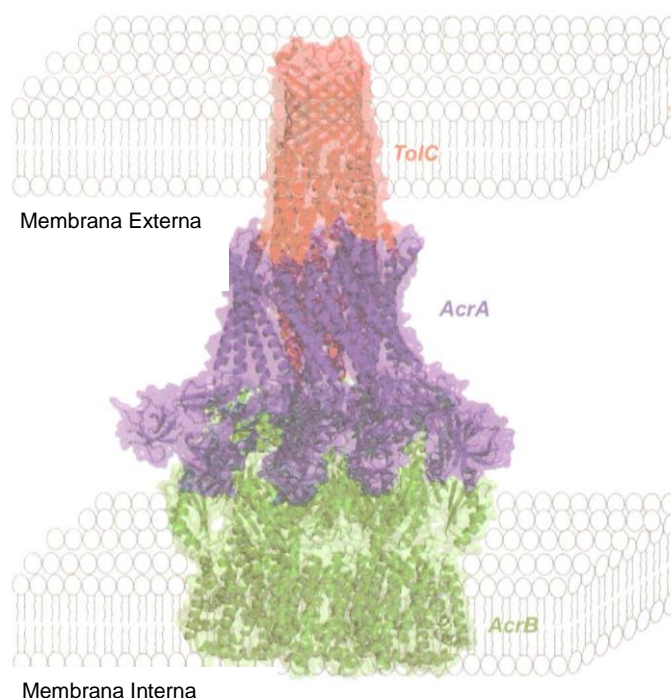


Figura 5.5. Representação esquemática de uma bomba de efluxo. Adaptado de Walsh CT, Wencewicz TA.¹³

As proteínas da classe RND são as que se encontram associadas à membrana citoplasmática, existindo também proteínas periplasmáticas que atuam como elementos de ligação às proteínas da membrana externa.⁸⁹ Estas são geralmente proteínas com estrutura terciária do tipo barril beta.^{88,89}

As bombas de efluxo do tipo RND podem ser classificadas em três subgrupos, consoante a sua especificidade para os respetivos substratos.⁹⁰ O primeiro subgrupo (CzcA e CnrA) é responsável pelo efluxo de metais pesados e o segundo subgrupo (NolFGH) encontra-se relacionado com a secreção de fatores de nodulação. O terceiro subgrupo (Acr, Mex, e Mtr) representa um conjunto de bombas de efluxo presentes em diferentes bactérias Gram-negativas e responsáveis pela excreção de múltiplos fármacos.^{91,92}

As bombas de efluxo do tipo Acr, Mex e Mtr foram descritas em *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Neisseria spp*, respectivamente. São compostas por três proteínas diferentes e o constituinte principal da bomba de efluxo é uma proteína transmembranar situada na membrana citoplasmática.^{91,92} Este sistema possui também uma proteína associada à membrana externa que se encontra ligada à bomba de efluxo através de um terceiro componente, designado por proteína de ligação peri-plasmática ou proteína de fusão da

membrana.⁹³ O conjunto das três proteínas forma um canal que permite expulsar moléculas de antibiótico do citoplasma para o exterior da célula bacteriana.⁸⁴

Na pesquisa de compostos com atividade antibiótica, a taxa de sucesso contra as bactérias Gram-positivas pode ser entre cem a mil vezes superior ao obtido contra bactérias Gram-negativas tais como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Este facto pode dever-se a várias razões, entre elas a dificuldade dos antibióticos em atravessar as porinas existentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas. As bactérias que apresentam mutações nas bombas de efluxo tripartidas são dez a cem vezes mais sensíveis aos antibióticos, o que demonstra o papel dominante das bombas de efluxo transmembranares na resistência das bactérias Gram-negativas.¹³

De acordo com o seu papel crucial na importação de nutrientes e excreção de moléculas indesejadas ou metabolitos, alguns genes que codificam as bombas de efluxo são expressos constitutivamente, enquanto que outros são expressos apenas em resposta ao contacto com determinadas moléculas que representem perigo para a célula bacteriana.⁹⁴

5.1.3. Modificação do alvo intracelular do antibiótico

Outra estratégia adotada pelas bactérias é a modificação do alvo intracelular do fármaco antibacteriano. Deste modo, a estrutura alvo do antibiótico continua a ser funcional e a desempenhar o seu papel na célula, sendo, no entanto, menos sensível à ação do fármaco antibacteriano.¹³

As diferentes modificações dos alvos dos antibióticos podem ser analisadas de várias formas. Uma delas é pela natureza química do alvo: o peptidoglicano da parede celular bacteriana, o ácido teicoico, os lipopolissacarídeos (LPS), os fosfolípidos da membrana celular, rRNA (ácido ribonucleico ribossómico) ou proteínas com atividades enzimáticas específicas.¹³

Outra classificação possível baseia-se na resposta a classes específicas de antibióticos, como a redução da carga negativa nos LPS de modo a criar uma barreira eletrostática às polimixinas catiónicas ou a metilação de uma base específica no rRNA 23S de modo a diminuir a afinidade deste pelos macrólidos e estreptogramina B.¹³

Uma terceira classificação baseia-se numa comparação entre (i) mutações nos genes que codificam uma determinada proteína ou RNA alvo para determinados antibióticos com (ii) modificação enzimática após produção e (iii) alterações nos intervenientes

fundamentais de uma linha de montagem. Todos estes fatores entram em jogo em situações específicas de resistência bacteriana.¹³

Um exemplo específico é a presença de mutações nas PBPs que provocam uma redução na afinidade destas para os antibióticos β -lactâmicos, o que favorece o desenvolvimento de resistências por parte das bactérias a este tipo de fármacos.^{95,96}

5.2.Mecanismos de desenvolvimento de resistência às β -lactamas por parte de *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *P. aeruginosa*, cuja morfologia se encontra representada na **Figura 5.6.**, é um importante agente patogénico para o Homem e encontra-se entre as bactérias intrinsecamente mais resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. É um agente patogénico Gram-negativo, anaeróbio facultativo. Representa a causa mais comum de infeções pulmonares crónicas em pacientes com fibrose cística.⁹⁷ *P. aeruginosa* possui uma elevada tolerância ambiental, especialmente no que toca às exigências nutricionais e é conhecida por sobreviver em ambientes bastante diversificados.⁹⁸

Esta espécie bacteriana possui sideróforos (agentes quelantes de ferro) que atuam na captação de Fe^{3+} e pigmentos que lhe permitem escapar ao sistema imunitário. Estas bactérias possuem ainda uma grande propensão para formar biofilmes (células bacterianas aderentes a uma superfície), o que as torna mais resistentes aos antibióticos.^{99,100}



Figura 5.6. Representação da morfologia de *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* encontra-se representada a castanho na imagem. Fonte: Center for Disease Control and Prevention.¹⁰¹

Um dos principais objetivos na modificação estrutural do núcleo lactâmico das diferentes classes de penicilinas e cefalosporinas, ao longo dos últimos 40 anos, tem sido a retenção e/ou ganho de atividade anti-pseudomonas.¹³

A bactéria *P. aeruginosa* possui várias linhas de defesa, possibilitando a sua subsistência mesmo na presença de antibióticos β -lactâmicos. Em primeiro lugar, sendo agentes patogênicos Gram-negativos, apresentam uma membrana externa que funciona como barreira e um eficiente conjunto de bombas de efluxo. Para além disso, expressam uma enzima lactamase cromossômica do tipo C, conhecida por AmpC que é produzida de modo constitutivo em pequena quantidade mas pode aumentar em 1000 vezes a sua produção na presença de antibióticos β -lactâmicos. Para além disto, sabe-se que existem também lactamases codificadas em plasmídeos. Ao longo do tempo, cerca de 500 variantes desta lactamase evoluíram e possuem atualmente um espectro mais amplo, sendo classificadas como ESBL. As metalo- β -lactamases podem também surgir em estirpes de *Pseudomonas* spp, constituindo uma ameaça para penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactamas.¹³

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos ocorre também através de β -lactamases do tipo encontrado em *Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase (KPC).¹⁰² Para além disso, a bactéria *P. aeruginosa* possui também um sistema de bombas de efluxo.¹⁰³ *P. aeruginosa* possui uma expressão constitutiva e indutível de bombas de efluxo do tipo Mex-A, Mex-X, Mex-C e Mex-E que se unem entre si para formar os complexos MexAB, MexXY, MexCD e MexEF. Os complexos formados, por sua vez, podem acoplar-se a um dos três componentes TolC de *P. aeruginosa* (OprJ, OprM ou OprN) para formar quatro diferentes bombas de efluxo tripartidas: MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ ou MexEF-OprN.⁸⁶ As mutações que resultam na perda da porina OprD juntamente com a estimulação da bomba de efluxo MexEF-OprN resultam em resistência a carbapenemos.¹⁰³

O aumento da expressão da bomba de efluxo MexAB-OprM confere também resistência a sulfonamidas, antibióticos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol e tetraciclina. Contudo, existem ainda classes de antibióticos que continuam ativas contra *P. aeruginosa*, incluindo algumas fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e ampicilina), alguns antibióticos β -lactâmicos e polimixinas.¹⁰³

A resistência por parte de *P. aeruginosa* face a carbapenemos em combinação com a resistência a outros importantes grupos antimicrobianos era bastante comum em muitos países europeus em 2016. Esta bactéria é intrinsecamente resistente à maioria dos agentes antibacterianos e o facto de apresentar resistência combinada a múltiplos agentes dificulta

ainda mais o tratamento de infecções graves. Devido à elevada virulência e natureza omnipresente desta bactéria, esta apresenta-se como um agente patogénico bastante difícil de controlar em ambientes de saúde.⁵⁰

5.3. Mecanismos de desenvolvimento de resistência às β -lactamas por bactérias da família *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas e oportunistas. São bactérias bastante conhecidas por apresentarem resistência a antibióticos através de uma extensa variedade de ESBL e carbapenemas (β -lactamases que degradam carbapenemos), incluindo KPC, OXA e várias MBL.¹⁰⁴

A bactéria *E. coli* é um membro da família *Enterobacteriaceae* que, através da transferência horizontal de genes, tem desenvolvido um número muito significativo de resistências.⁴⁹

A resistência desenvolvida por *E. coli* é bastante preocupante pois esta bactéria é responsável pelas infecções mais comuns em humanos. Determinadas estirpes desenvolveram igualmente β -lactamases de largo espectro (ESBL), conferindo uma crescente resistência às cefalosporinas de terceira geração por toda a Europa.³ Apesar de ser pouco comum, tem-se detetado em vários continentes, a resistência em *E. coli* associada a uma nova metalo- β -lactamase (NDM-1) de *K. pneumoniae* que lhe confere uma ampla resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos incluindo carbapenemos.^{105,106,107,108}

Klebsiella pneumoniae, cuja morfologia se encontra representada na **Figura 5.7.**, é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbia facultativa e oportunista que pode provocar infecções do tipo nosocomial (infecções associadas aos cuidados de saúde (IACS)) ou adquiridas na comunidade. A infeção por *K. pneumoniae* adquirida na comunidade causa frequentemente pneumonia, existindo uma grande variedade de outras patologias que podem também ser causadas por esta espécie bacteriana. Apesar disso e de um modo geral, apenas cerca de 5% dos casos de pneumonia são provocados por *K. pneumoniae*. Esta espécie apresenta uma grande variedade de β -lactamases, em particular do tipo ESBL, KPC e NDM-1, sendo que as duas últimas têm sido responsáveis por múltiplas epidemias e são capazes de se disseminarem para diferentes espécies bacterianas.^{105,109,83}



Figura 5.7. Representação da morfologia de *Klebsiella pneumoniae* observada através de microscopia eletrônica de varrimento. Observam-se duas células de *Klebsiella pneumoniae* em interação com um neutrófilo humano. Fonte: Microbiology in pictures.¹¹⁰

A bactéria *K. pneumoniae* pode apresentar resistência face a múltiplas classes de antibióticos e essa resistência é frequentemente difundida através de plasmídeos. Esta bactéria possui uma β -lactamase de classe A codificada no cromossoma.⁵⁰

Os carbapenemos resistem frequentemente ao efeito das β -lactamases do tipo ESBL e aparentemente persistem como uma das poucas opções de tratamento face a infeções de maior gravidade. No entanto, a emergente resistência de *K. pneumoniae* face aos carbapenemos mediada por um conjunto de carbapenemases (KPC), apresenta-se como uma séria ameaça, pela conferência de resistência a todos os fármacos β -lactâmicos.⁵⁰

As atuais resistências face aos carbapenemos são bastante preocupantes pois os carbapenemos eram altamente resistentes face à maioria das β -lactamases, sendo utilizados como fármacos de última linha na terapêutica de infeções causadas por bactérias Gram-negativas.¹⁰² Genes que codificam a β -lactamase do tipo NDM-1 foram encontrados com alguma frequência em plasmídeos e desde a sua primeira identificação em 2007, têm-se difundido um pouco por todo o mundo.^{58,108}

As estirpes produtoras de β -lactamase do tipo NDM-1 apresentam geralmente um elevado grau de resistência, dispondo no entanto, de outros mecanismos de resistência, incluindo também β -lactamases do tipo ESBL.^{58,111} Embora as estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamase do tipo NDM-1 sejam relativamente raras, após a sua globalização e devido ao seu perfil de elevada resistência, devem ser extensamente monitorizadas.¹⁰⁸ Em 2016 na EU/EEE (União Europeia/Espaço Económico Europeu) mais de um terço (34,5%) dos isolados de *K. pneumoniae* apresentavam resistência a pelo

menos uma das classes de antimicrobianos sob vigilância (fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos). A maioria dos isolados bacterianos resistentes às cefalosporinas de terceira geração apresentaram β -lactamases do tipo ESBL. A resistência desenvolvida por *K. pneumoniae* continua problemática, especialmente em alguns países do Sul e Este do continente Europeu. Segundo os últimos dados referentes a 2016, a resistência combinada a várias classes de antibacterianos era bastante comum e a frequência de isolados produtores de ESBL era bastante elevada.⁵⁰

5.4. Mecanismos de geração de resistência às β -lactamas por parte de *Acinetobacter baumannii*

O desenvolvimento de resistências por parte de *Acinetobacter baumannii* (**Figura 5.8.**) aos fármacos antibacterianos é particularmente perigoso a longo prazo, devido à sua elevada resistência intrínseca e também à aquisição de DNA de outras bactérias, garantindo assim a rápida disseminação das resistências.^{99,112} Uma pesquisa realizada em diferentes países da Europa revelou que existe uma elevada taxa de resistência de *A. baumannii* face a Carbapenemos e Aminoglicosídeos.^{113,114}

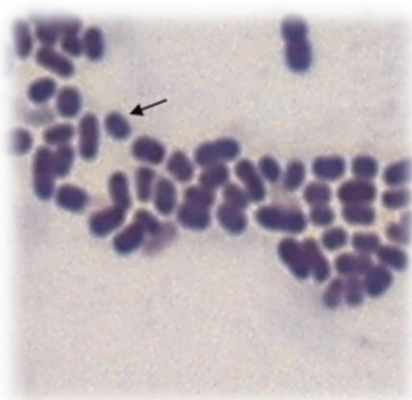


Figura 5.8. Coloração de Gram da bactéria *A. baumannii* representada na imagem a roxo. A seta indica uma célula individual de *A. baumannii*. Fonte: Howard *et al.*¹¹⁵

O género *Acinetobacter* consiste num grande número de espécies que podem ser divididas em dois diferentes complexos: o complexo *A. baumannii*, o grupo que inclui a maioria das espécies causadoras de doenças (*A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*) e o complexo *Acinetobacter não baumannii*, sendo este um grupo menos patogénico.⁵⁰

A espécie resistente mais comum do complexo *A. baumannii* é *A. baumannii*. Esta bactéria é conhecida pela sua elevada persistência ambiental e sofreu uma rápida disseminação durante a guerra do Iraque, tendo causado infecções graves em soldados feridos. A sua parede celular é particularmente espessa o que permite a sua proteção face a ambientes secos, elevadas temperaturas, variações de pH e situações de escassez nutricional, sendo capazes de sobreviver até 5 meses em objetos inanimados.^{116,117} A fraca penetração de substâncias através da membrana e a existência de bombas de efluxo faz de *A. baumannii* uma espécie altamente resistente a inúmeros antibióticos.¹¹⁶

A sobreprodução da bomba de efluxo AdeABC causa resistência às cefalosporinas, fluoroquinolonas e a algumas tetraciclinas.¹¹⁸ Para além disso, estima-se que 30% dos isolados de *A. baumannii* produzam um exopolissacárido que auxilia as células na formação de biofilmes, contribuindo também para a sua subsistência.¹¹⁹

Existem dois fatores fundamentais que sustentam o desenvolvimento de resistência por parte de *A. baumannii*. O primeiro fator é a existência das bombas de efluxo acima mencionadas que conferem resistência também a agentes desinfetantes à base de amónia. Outro fator facilitador do desenvolvimento de resistências é a presença de uma grande variedade de β -lactamases incluindo ESBL e carbapenemases (MBLs e OXAs).¹¹⁶

Estirpes de *A. baumannii* resistentes a múltiplos fármacos antibacterianos são já bastante comuns sendo que mais de 60% das estirpes que provocam IACS são resistentes a múltiplos antibióticos, incluindo carbapenemos.¹²⁰ Para além disso, esta resistência surgiu num período de tempo bastante curto com um aumento superior a 30% de estirpes resistentes a carbapenemos entre 1995 e 2004, o que coincide com um período de rápida disseminação de carbapenemases do tipo OXAs.¹²¹ Durante o mesmo período de tempo, a resistência a aminoglicosídeos, a quinolonas e à associação entre β -lactama/inibidor da β -lactamase piperacilina e tazobactam aumentou também de uma forma constante nesta bactéria.¹¹⁸ Na **Tabela 2.**, encontram-se resumidos os mecanismos de desenvolvimento de resistência por parte de cada espécie/família bacteriana analisada.

Tabela 2. Mecanismos de desenvolvimento de resistência por parte de cada espécie/família bacteriana analisada.

Espécie/Família bacteriana	Mecanismos de desenvolvimento de resistência	Referências
<i>P. aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Expressão de β-lactamase AmpC; • β-lactamases codificadas em plasmídeos; • Expressão de metalo-β-lactamases; • Expressão de β-lactamases do tipo <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC); • Mutações que resultam na perda da porina OprD; • Estimulação da bomba de efluxo MexEF-OprN; • Estimulação da bomba de efluxo MexAB-OprM. 	13,102,103
Família <i>Enterobacteriaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Expressão de β-lactamases de largo espectro (ESBL); • Expressão de β-lactamase do tipo KPC; • Expressão de β-lactamases do tipo OXAs; • Expressão de β-lactamases do tipo MBLs; • Expressão de uma nova metalo- β-lactamase (NDM-1) de <i>K. pneumoniae</i>. 	104,108
<i>K. pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Expressão de β-lactamases de largo espectro (ESBL); • Expressão de β-lactamase do tipo KPC; • Expressão de uma nova metalo- β-lactamase (NDM-1). 	83
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Expressão de β-lactamases de largo espectro (ESBL); • Expressão de β-lactamases do tipo MBLs; • Expressão de β-lactamases do tipo OXAs; • Estimulação da bomba de efluxo AdeABC; • Produção de um exopolissacárido que auxilia na formação de biofilmes. 	116,119

5.5. Estratégias que permitem minimizar o desenvolvimento de resistências face a cefalosporinas e carbapenemos

Os avanços médicos e científicos dos últimos anos dependem também da utilização de medicamentos anti-infecciosos. As consequências da resistência antimicrobiana são o aumento da morbidade, da mortalidade e a complicação das doenças. As consequências económicas incluem ainda a perda de produtividade (perda de rendimento, diminuição da produtividade do trabalhador) e o aumento dos custos relacionados com o diagnóstico e tratamento.⁵¹ As estratégias que permitem minimizar o desenvolvimento de resistências face a cefalosporinas e carbapenemos são: i) Utilização responsável dos antibióticos; ii) Educação da população acerca do uso responsável dos antibióticos; iii) Pesquisa/desenvolvimento de novos antibióticos e reutilização de antigos antibióticos aos quais se registou no passado resistência, mas atualmente as estirpes bacterianas são suscetíveis, bem como avaliar a utilização de possíveis combinações de antibióticos; iv) Utilização de probióticos como medida de prevenção face às infeções bacterianas e v) Utilização de bacteriófagos na terapêutica de infeções bacterianas.^{122,123,124,125}

Uma vigilância da resistência bacteriana e da utilização de antibacterianos é fundamental para orientar as decisões a tomar e avaliar as ações realizadas para promover o uso adequado dos antibióticos. A utilização racional e regulamentação do uso de antibióticos é necessária sendo imprescindível reduzir o consumo excessivo de agentes antibacterianos, havendo no entanto, grandes variações no grau de implementação deste tipo de intervenções nos sistemas de saúde dos diferentes países. Implementar um sistema que promova o uso adequado de antibióticos requer uma abordagem de todo o sistema cuja responsabilidade final recai sobre os governos de cada país. É, portanto necessário que exista uma regulamentação que garanta não só a qualidade dos antibióticos, mas também o controlo da prescrição e dispensa deste tipo de fármacos. Esta abordagem deverá envolver ativamente toda a população e os profissionais de saúde, sensibilizando e capacitando todas as partes envolvidas.⁵¹

Outro aspeto fundamental é a prevenção e controlo de infeções. É sabido que o ambiente hospitalar favorece o aparecimento e disseminação de microrganismos resistentes, motivo pelo qual devem ser implementadas medidas de prevenção e de controlo de infeção. Estas medidas exigem o envolvimento das estruturas organizacionais e dos recursos humanos envolvidos na implementação de diretrizes e protocolos. A OMS tem liderado e coordenado a criação e implementação de orientações acerca da prevenção e controlo de

infecções. Todavia, existem ainda diferenças consideráveis entre os diferentes países ou entre regiões do mesmo país, na forma como estas orientações são postas em prática. O próximo passo no sentido da implementação destas normas de forma mais uniforme nos diferentes países seria através da realização de um estudo de situação que ajude a definir o cenário no que toca à prevenção e controlo de infeções. Assim, desenvolver-se-iam estratégias adequadas e concertadas que poderiam conduzir a uma melhoria progressiva dos resultados alcançados nas diferentes regiões.⁵¹

O estudo e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos ocorre a um ritmo bastante lento e não acompanha as crescentes exigências geradas pela rápida evolução e disseminação da resistência bacteriana. Deste modo, é de extrema importância o estudo e desenvolvimento de estratégias e tecnologias inovadoras, que envolvam equipas multidisciplinares, incorporando as vertentes científica e financeira, de forma a reverter a escassez de novos antibióticos e outros produtos que permitam o combate à resistência antimicrobiana.⁵¹ Nos últimos anos tem vindo a estudar-se a possibilidade de se voltar a utilizar antigos antibióticos aos quais já se registou resistência bacteriana no passado, mas que atualmente são eficazes contra determinadas estirpes bacterianas. Outra opção em estudo é a possibilidade de combinar diferentes substâncias antibacterianas de modo a obter um efeito sinérgico no combate às bactérias causadoras de infeções.¹²³

A utilização de probióticos permite também a prevenção de infeções, reduzindo assim a necessidade de recorrer aos fármacos antibacterianos. Por fim, tem sido também estudada a utilização de bacteriófagos na terapêutica de infeções bacterianas.^{124,125}

5.5.1. Utilização de bacteriófagos na terapêutica de infeções bacterianas

A terapêutica com fagos utiliza vírus capazes de infetar bactérias (bacteriófagos) para tratar infeções bacterianas. A decadência registada na eficácia dos fármacos antibacterianos tem dado lugar a um crescente interesse acerca do potencial desta prática inovadora.¹²⁶

Os fagos são seres acelulares extremamente simples, embora bastante diversos. São constituídos por DNA ou RNA (ácido ribonucleico), localizado dentro de um capsídeo proteico com forma icosaédrica coberto por um envelope ou podem ser nus, contendo apenas o material genético envolto no capsídeo. Como parasitas bacterianos, são incapazes de se reproduzir de forma independente da célula bacteriana hospedeira e são incapazes de sobreviver sem a mesma. Os fagos ligam-se a recetores específicos na

superfície da célula bacteriana injetando o seu material genético na célula hospedeira e integrando-o no genoma da bactéria. A sua reprodução dá-se verticalmente da célula-mãe para célula-filha (ciclo lisogénico) até que o ciclo lítico (lise celular e libertação de fagos) seja iniciado ou podem apoderar-se da maquinaria de replicação da célula hospedeira de modo a produzir uma nova geração de fagos, o que conduz à lise da célula bacteriana. A existência de um certo número de fagos no interior da célula bacteriana, que pode variar entre apenas alguns até mais de 1000 fagos e dependendo também de fatores ambientais, faz com que as proteínas responsáveis pela lise se tornem ativas e hidrolisem a parede celular de peptidoglicano das bactérias. Por sua vez, a lise da célula bacteriana irá libertar uma determinada quantidade de fagos que irão infetar outras bactérias adjacentes e iniciar um novo ciclo lítico.^{127,128}

A maioria dos fagos são capazes de infetar apenas as bactérias que possuem um recetor complementar ao seu na sua superfície, o que de certa forma, determina o espetro de ação dos fagos.¹²⁹ As bactérias têm desenvolvido numerosos mecanismos para resistir à lise provocada pelos fagos mas, apesar disso, os fagos têm igualmente demonstrado uma grande variedade de mecanismos para reverter essa resistência.¹³⁰

Os fagos podem ocasionalmente transferir material genético, que se encontre adjacente ao local onde inseriram o seu genoma, de uma bactéria para outra, num fenómeno chamado de transdução já referido anteriormente. Desta forma, sabe-se que os fagos são responsáveis, em parte, pela transferência de genes entre bactérias.¹³¹ Apesar deste processo possibilitar a transferência de genes que confirmam resistência aos antibióticos entre diferentes bactérias, poderá também ser visto como uma oportunidade de utilizar os fagos na terapêutica através da transferência de genes que tornem as bactérias mais suscetíveis aos antibióticos.¹³² Os bacteriófagos são capazes de tratar ou prevenir doenças, restaurando, corrigindo ou modificando funções fisiológicas através de ações farmacológicas, imunológicas ou metabólicas. São capazes de restaurar as funções fisiológicas normais e a microbiota endémica natural, pois conseguem exercer controlo sobre os agentes patogénicos presentes. Noutras situações em que existem diferentes espécies bacterianas envolvidas, os bacteriófagos são capazes de atacar uma espécie em particular, excluindo-a, reequilibrando o ecossistema e agindo como agentes antibióticos. Por outro lado, os bacteriófagos são também capazes de estimular o sistema imunitário e possuem capacidade de suprimir a inflamação causada pela infeção bacteriana.¹³³

Existem ainda poucas evidências relativamente à melhor via para administração dos bacteriófagos. No entanto, a sua aplicação tópica e administração oral não parecem causar problemas. A forma de administração preferencial é, no entanto, a via intra-peritoneal ou intramuscular, sendo os bacteriófagos posteriormente libertados na corrente sanguínea de forma gradual. Desta forma, o sistema imunitário será muito menos estimulado a reagir face à presença dos bacteriófagos do que quando estes são injetados por exemplo, por via intravenosa. Uma outra forma de mascarar a presença dos bacteriófagos para que estes não sejam eliminados pelo sistema imunitário é revesti-los com outras moléculas à sua superfície, para que não sejam reconhecidos pelo sistema imunitário.¹³³

Devido à especificidade para determinado tipo de bactérias, este tipo de terapia apresenta um espectro de ação bastante limitado e irá afetar apenas uma espécie em específico, de entre todas as espécies possivelmente existentes no organismo humano. Assim, ao contrário dos fármacos antimicrobianos convencionais, apenas são destruídas as espécies alvo, mantendo o microbioma natural do hospedeiro e causando muito menos efeitos adversos.¹³⁴ Aspectos como a dose ideal, via de administração, frequência de administração e duração do tratamento necessitam ser ainda bem definidos antes de iniciar ensaios clínicos. A principal desvantagem da terapêutica recorrendo aos bacteriófagos é a necessidade de determinar qual o microrganismo causador da infeção. Existe então necessidade de recolha de uma amostra biológica e posterior isolamento e cultivo, de modo a identificar qual o agente causador da infeção para proceder à escolha do bacteriófago mais adequado a utilizar no combate à infeção. De forma a contornar este obstáculo é também possível administrar ao paciente uma mistura de fagos previamente preparada a partir de bactérias específicas. Por outro lado, quando nenhuma mistura de fagos se mostra ativa contra o agente patogénico em causa, será necessário utilizar fagos mais adequados e que podem ser encontrados no ambiente.¹²⁵

Outra desvantagem da terapia utilizando bacteriófagos está relacionada com a capacidade dos bacteriófagos em transferir informação genética de uma bactéria para outra. Ao transferir material genético para uma bactéria, pode transferir-se fatores de virulência ou determinantes patogénicas, conferindo uma maior patogenicidade e/ou resistência à bactéria.^{135,136,137}. Neste caso é preferível a utilização de fagos que não sejam capazes de empacotar DNA que pertença ao hospedeiro ou fagos que não utilizem DNA do hospedeiro para sintetizar o seu próprio DNA.¹³⁸

Face ao exposto e apesar das aparentes vantagens relacionadas com a utilização de bacteriófagos no tratamento de infecções causadas por bactérias, são necessários estudos adicionais de forma a assegurar a segurança deste tipo de terapêutica.¹³⁹

6. Conclusão

Face à crescente ameaça da resistência bacteriana e à escassez de novas alternativas que permitam contorná-la, é extremamente urgente a adoção de medidas que permitam travar o desenvolvimento de resistências.

Para tal, é necessário não só o envolvimento dos profissionais de saúde como médicos, enfermeiros e farmacêuticos, mas também da população em geral e até mesmo dos governantes. É de fulcral importância a adoção de medidas de carácter preventivo, evitando a propagação de infeções, mas também a educação/sensibilização da população para este tema, sendo de extrema importância o papel do farmacêutico neste âmbito. Em farmácia comunitária, a proximidade com a população permite-lhe racionalizar o uso dos antibióticos, fornecendo informações sobre a correta administração dos mesmos, garantindo o cumprimento da terapêutica prescrita e consciencializando para a necessidade de uma avaliação médica para posterior prescrição dos antibióticos mais adequados a cada quadro clínico. O farmacêutico pode ainda integrar comissões específicas em unidades hospitalares contribuindo para o desenvolvimento/implementação de medidas que ajudem a travar o desenvolvimento de resistências bacterianas. Num outro contexto, o farmacêutico pode ainda contribuir para o estudo dos mecanismos de desenvolvimento de resistências e investigação de novas alternativas ao uso dos antibióticos convencionais, que permitam contornar o desenvolvimento de resistência. Para tal, deve proceder-se ao estudo de substâncias de origem natural associado à busca de novos antibióticos com mecanismos de ação distintos dos que já existem. A chave para contornar o problema da resistência bacteriana parece estar na mudança. Tal como as bactérias mudam para se adaptar e resistir ao mecanismo de ação dos antibióticos, também o Homem terá que mudar a forma como combate a infeção por estas provocada. Para tal, será necessário o desenvolvimento de novos fármacos com distintos mecanismos de ação que permitam fazer frente ao desenvolvimento de resistências por parte das bactérias. De fato, nos últimos anos, tem sido desenvolvido um número bastante reduzido de novas moléculas que permitam contrariar as resistências geradas aos antibióticos utilizados, pelo que o investimento neste sentido deve ser reforçado.

7. Referências Bibliográficas

1. Morens D, Folkers GK, Fauci AS. The Challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004 Jul 8 ;430:242–9
2. Direção-Geral da Saúde. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos antimicrobianos 2017. Lisboa: Direção-Geral da Saúde; 2017.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. The bacterial challenge: time to react. Estocolmo: European Centre for Disease Prevention and Control; 2009.
4. Direção-Geral da Saúde. Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos antimicrobianos em números. Lisboa: Direção-Geral da Saúde; 2016.
5. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2017 [Acedido em 2018 Mai 5]. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/news/bacteria-antibiotics-needed/en/>
6. World Health Organization. Containing antimicrobial resistance. Genebra: World Health Organization; 2005.
7. World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. World Health Organization; 2017.
8. Sousa JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2ª edição. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa; 2006.
9. Patrick GL. An Introduction to Medicinal Chemistry. 5ª ed. Oxford: Oxford University Press; 2013.
10. International Pharmaceutical Federation. Fighting antimicrobial resistance - The contribution of pharmacists. Haia: International Pharmaceutical Federation; 2015.
11. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology. 6ª edição. Elsevier; 2009.
12. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale's Pharmacology. 8ª edição. Elsevier; 2016.
13. Walsh CT, Wencewicz TA. Antibiotics - Challenges, Mechanisms and Opportunities. 1ª edição. Washington: American Society for Microbiology; 2016.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Antibiotic resistance – where are we now?.[Internet] European Centre for Disease Prevention and Control; 2018 [Acedido em 2018 Jan 29]. Disponível em: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/en/get-involved/social-media-2018>
15. Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics. 12ª edição. Nova Iorque; 2011.
16. Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chemical Reviews*. 2006 Ago; 106 (8): 3468–3496.

17. Dougherty TJ, Pucci MJ, editores. Antibiotic Discovery and Development. Nova Iorque; 2012.
18. Walsh CT, Wencewicz TA. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *The Journal of Antibiotics*. 2014 Jan; 67(1):7–22.
19. Tréfouël J, Nitti F, Bovet D. Activité du p-amino-phénylsulfamide sur l'infection streptococcique expérimentale de la souris et du lapin. *CR Soc Biol*. 1935; 120: 756.
20. Scholar EM, Pratt WB, editores. The Antimicrobial Drugs. 2^a edição. Nova Iorque: Oxford University Press; 2000.
21. Fleming A. On the bacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*. 1929; 10: 226-236.
22. Bucci R, Galli P. Vincenzo Tiberio: a misunderstood researcher. *Italian Journal of Public Health*. 2011; 8: 404-406.
23. Lovering AL, de Castro LH, Lim D, Strynadka NC. Structural Insight into the Transglycosylation Step of Bacterial Cell-Wall Biosynthesis. *Science*. 2007 Mar 9; 315(5817): 1402–1405.
24. Food and Drug Administration. Highlights of prescribing information. Food and Drug Administration; 2015.
25. Drusano GL. Pharmacodynamics of ceftaroline fosamil for complicated skin and skin structure infection: rationale for improved anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Nov; 65: iv33–39.
26. Laudano JB. Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011 Fev 27; 66: iii11–18.
27. Mushtaq S, Warner M, Ge Y, Kaniga K, Livermore DM. *In vitro* activity of ceftaroline (PPI-0903M, T-91825) against bacteria with defined resistance mechanisms and phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60(2): 300-311.
28. Moellering, RC, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1989 Set 24; 24: 1-7.
29. Basker MJ, Boon RJ, Hunter PA. Comparative antibacterial properties *in vitro* of seven olivanic acid derivatives: MM 4550, MM 13902, MM 17880, MM 22380, MM 22381, MM 22382 and MM 22383. *The Journal of Antibiotics*. 1980 Set; 38(8): 878-884.
30. Sunagawa M, Matsumura H, Inoue T, Fukasawa M, Kato M. A novel carbapenem antibiotic, SM-7338 structure-activity relationships. *The Journal of Antibiotics*. 1990 Jun; 43(5): 519-532.

31. Bradley JS, Garau J, Lode H, Rolston KVI, Wilson SE, Quinn JP. Carbapenems in clinical practice: A guide to their use in serious infection. *Journal of Antimicrobial Agents*. 1999 Feb; 11: 93-100.
32. Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsuhachi M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: Binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *Escherichia coli*. *The Journal of Antibiotics*. 1984 Abr; 37: 394-400.
33. Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of Penicillins- A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1965 Out; 54(4): 1133-1141.
34. Van Dam V, Orlachs N, Breukink E. Specific Labeling of Peptidoglycan Precursors as a Tool for Bacterial Cell Wall Studies. *ChemBioChem Journal*. 2009 Feb 24; 10(4): 617–624.
35. Jones R, Kirby JT, Rhomberg PR. Comparative activity of meropenem in US medical centers (2007): initiating the 2nd decade of MYSTIC program surveillance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008 Jul; 61(2): 203-213.
36. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008 Ago; 21: 367–371.
37. Hilas O, Ezzo DC, Jodlowski T. Doripenem (Doribax), a new parenteral carbapenem. *Pharmacy and Therapeutics*. 2008; 33(3): 134–180.
38. Solomkin JS, Yellin AE, Rotstein OD, Christou NV, Dellinger EP, Tellado JM, *et al*. Ertapenem Versus Piperacillin/Tazobactam in the Treatment of Complicated Intraabdominal Infections: Results of a Double-Blind, Randomized Comparative Phase III Trial. *Annals of Surgery*. 2003; 237(2): 235-245.
39. Livermore DM. Can better prescribing turn the tide of resistance? *Nature Reviews Microbiology*. 2004 Jan 1; 2: 73-78.
40. World Health Organization. Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: World Health Organization; 2016.
41. Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009 Set 1; 64: i29–36.
42. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*. 2006 Jan; 4(1): 36–45.
43. Rosenthal KS, Tan MJ. Rapid review microbiology and immunology. 3ª edição. Filadélfia: Mosby/Elsevier; 2011.
44. Baquero F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resistance Updates*. 2001 Abr; 4(2): 93–105.
45. Fernández L, Breidenstein EBM, Hancock REW. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*. 2011 Feb; 14(1): 1–21.
46. Fernández L, Hancock REW. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012 Out; 25(4):661–681.

47. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 Jan; 48(1): 1–14.
48. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou M-FI, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and Enzymatic Comparative Analysis of the Novel KPC Variant KPC-5 and Its Evolutionary Variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Fev; 53(2): 557–562.
49. Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among *Enterobacteriaceae* from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008 Nov; 62: ii41–54.
50. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Estocolmo: European Centre for Disease Prevention and Control; 2017.
51. World Health Organization. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana - Opções de ação. Genebra: World Health Organization; 2012.
52. Johnson A. Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 Mai 23; 58(1): 231.
53. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2014 Dez 1; 13(1):42-51.
54. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Estocolmo: European Centre for Disease Prevention and Control; 2012.
55. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 Mai; 38(9): 1279-1286.
56. Walsh F. The multiple roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*. 2013; 4: 255.
57. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century - A Clinical Super-Challenge. *The New England Journal of Medicine*. 2009 Jan 29; 360(5): 439–443.
58. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, *et al*. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2010 Ago 11; 10(9): 597–602.
59. Sheehan JC. The enchanted ring : the untold story of penicillin. MIT Press; 1982.
60. Strynadka NCJ, Adachi H, Jensen SE, Johns K, Sielecki A, Betzel C, *et al*. Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature*. 1992 Out; 359: 700–705.

61. Fisher J, Belasco JG, Khosla S, Knowles JR. Beta-Lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate. Interaction of the *Escherichia coli* RTEM enzyme with cefoxitin. *Biochemistry*. 1980 Jun; 19(13): 2895–2901.
62. Cantu C, Huang W, Palzkill T. Cephalosporin substrate specificity determinants of TEM-1 beta-lactamase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997 Nov; 272(46): 29144–29150.
63. Bulychev A, Mobashery S. Class C Beta-Lactamases Operate at the Diffusion Limit for Turnover of Their Preferred Cephalosporin Substrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 Jul; 43(7): 1743–1746.
64. Knowles JR. Penicillin resistance: the chemistry of beta-lactamase inhibition. *Accounts of Chemical Research*. 1985 Apr; 18(4): 97–104.
65. Hanson ND, Sanders CC. Regulation of Inducible AmpC Beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Current Pharmaceutical Desing*. 1999 Nov; 5(11): 881-894.
66. Rupp ME, Fey PD. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Enterobacteriaceae* Considerations for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. *Drugs*. 2003; 63(4): 353-365.
67. Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M, Taramasso L, Giacobbe DR. Will new antimicrobials overcome resistance among Gram-negatives? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2011 Oct; 9(10): 909–22.
68. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010 Jan; 23(1): 160–201.
69. Maveyraud L, Golemi D, Kotra LP, Tranier S, Vakulenko S, Mobashery S, *et al.* Insights into class D beta-lactamases are revealed by the crystal structure of the OXA10 enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure*. 2000 Dec 1; 8(12): 1289–1298.
70. Galleni M, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frère JM. Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001 Mar; 45(3): 660–663.
71. Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère JM, Dideberg O. A Metallo- β -lactamase Enzyme in Action: Crystal Structures of the Monozinc Carbapenemase CphA and its Complex with Biapenem. *Journal of Molecular Biology*. 2005 Jan 28; 345(4): 785–795.
72. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013 Jan; 1277(1): 91–104.
73. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 Jan; 54(1):24–38.
74. Salverda MLM, Visser JAGM, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2010; 34(6): 1015–1036.

75. Poirel L, Mammeri H, Nordmann P. TEM-121, a Novel Complex Mutant of TEM-Type β -Lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 Dez; 48(12): 4528–4531.
76. Li M, Conklin BC, Taracila MA, Hutton RA, Skalweit MJ. Substitutions at Position 105 in SHV Family: Lactamases Decrease Catalytic Efficiency and Cause Inhibitor Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012 Nov; 56(11): 5678–5686.
77. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*. 2006 Out; 9(5): 466–475.
78. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*. 2012 Abr; 3(110): 110.
79. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sánchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel Carbapenem-Hydrolyzing-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. 2001 Abr; 45(4): 1151–1161.
80. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*. 2009 Abr; 9(4): 228–236.
81. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann PL. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 Mar; 44(3): 622–632.
82. Smith PA, Romesberg FE. Mechanism of Action of the Arylomycin Antibiotics and Effects of Signal Peptidase I Inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012 Jul; 56(10): 5054–5060.
83. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a New Metallo-beta-Lactamase Gene, bla NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Dez; 53(12): 5046–5054.
84. Nikaido H. Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1996 Out; 178(20): 5853–5859.
85. Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006 Abr; 19(2): 382–402.
86. Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2006 Ago; 4(8): 629–636.
87. Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 2009 Mai; 106(17): 7173–7178.
88. Hinchliffe P, Symmons MF, Hughes C, Koronakis V. Structure and Operation of Bacterial Tripartite Pumps. *Annual Review of Microbiology*. 2013 Set; 67(1): 221–242.

89. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, *et al.* Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. *Nature*. 2014 Mai; 509(7501): 512–515.
90. Saier MH, Paulsen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB Journal*. 1998 Mar; 12(3): 265–274.
91. Gotoh N, Kusumi T, Tsujimoto H, Wada T, Nishino T. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters*. 1999 Set; 458(1): 32–36.
92. Guan L, Ehrmann M, Yoneyama H, Nakae T. Membrane Topology of the Xenobiotic-exporting Subunit, MexB, of the MexA,B-OprM Extrusion Pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Abr; 274(15): 10517-10522.
93. Zgurskaya HI, Nikaido H. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *Journal of Molecular Biology*. 1999 Jan; 285(1): 409–420.
94. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of Bacterial Drug Export Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002 Dez; 66(4): 671–701.
95. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology and Biotechnology*. 2008 Jan; 46(1): 11-21.
96. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 2007 Mar; 128(6): 1037–1050.
97. Hart CA, Winstanley C. Persistent and Aggressive Bacteria in the Lungs of Cystic Fibrosis Children. *British Medical Bulletin*. 2002 Mar; 61(1): 81-96.
98. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*. 2014 Jul; 68(1): 1–12.
99. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003 Dez; 67(4): 593–656.
100. Fothergill JL, Winstanley C, James CE. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2012 Fev; 10(2): 219–235.
101. Centers for Disease Control and Prevention. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2013 [Acedido em 2018 Ago 15]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
102. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Current Opinion in Microbiology*. 2010 Out; 13(5): 558–564.
103. Livermore DM. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*. 2002 Mar; 34(5): 634–640.

104. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early Dissemination of NDM-1-and OXA-181-Producing *Enterobacteriaceae* in Indian Hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011; 55(3): 1274–1278.
105. Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. Emergence of Metallo-Lactamase NDM-1-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010 Nov; 54(11): 4914–4916.
106. Solé M, Pitart C, Roca I, Fàbrega A, Salvador P, Muñoz L, *et al.* First Description of an *Escherichia coli* Strain Producing NDM-1 Carbapenemase in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Set; 55(9): 4402–4404.
107. American Society for Microbiology. NDM-1-Producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Mar; 55(3): 1318-1319.
108. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011 Abr; 66(4): 689–692.
109. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile Beta-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007 Jul; 20(3): 440–458.
110. Microbiology in pictures. *Klebsiella pneumoniae* and neutrophyl micrograph [Internet]. Microbiology in pictures; 2015 [Acedido em 2018 Ago 15]. Disponível em: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/klebsiella-pneumoniae-photos/klebsiella-pneumoniae-micrograph.html>
111. Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Badal RE, Hsueh P-R, Paterson DL. Emergence of High Levels of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in the Asia-Pacific Region: Data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program, 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Ago; 53(1): 3280–3284.
112. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, *et al.* Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo-Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004 Nov; 42(11): 5094–5101.
113. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *EuroSurveillance*. 2008 Nov 20; 13(47).
114. Rodloff AC, Leclercq R, Debbia EA, Cantón R, Oppenheim BA, Dowzicky MJ. Comparative analysis of antimicrobial susceptibility among organisms from France, Germany, Italy, Spain and the UK as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008 Abr; 14(4): 307–314.
115. Howard A, O'donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. *Journal Virulence*. 2012 Mai; 3(3): 243–250.
116. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 Jun 1; 59(6): 1210–1215.

117. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 2006 Feb; 6(1): 130.
118. Gootz TD, Marra A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2008 Jul; 6(3): 309–325.
119. Joly-Guillou M-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005 Nov; 11(11): 868–873.
120. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, *et al*. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2013 Jan 2; 34(01): 1–14.
121. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* Infection. *The New England Journal of Medicine*. 2008 Mar 20; 358(12): 1271–1281.
122. Lee C-R, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. *Internacional Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013 Set; 10(9):4274-4305.
123. Tekin E, White C, Kang TM, Singh N, Cruz-Loya M, Damoiseaux R, *et al*. Prevalence and patterns of higher-order drug interactions in *Escherichia coli*. *npj Systems Biology and Applications*. 2018 Set; 4: 31.
124. Oudhuis GJ, Bergmans DCJJ, Verbon A. Probiotics for prevention of nosocomial infections: efficacy and adverse effects. *Current Opinion in Critical Care*. 2011 Out; 17(5): 487–492.
125. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre A-S, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Current Protein & Peptide Science*. 2012 Dez; 13(8): 699–722.
126. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 2017 Ago 6; 8(3): 162–173.
127. Delbruck M. The Growth of bacteriophage and lysis of the host. *The Journal of Gneral Phisiology*. 1940 Mai 20; 23(5): 643-660.
128. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004 Mai; 28(2): 127–181.
129. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*. 2010 Jan; 59(3): 145–155.
130. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2010 Mai 29; 8(5): 317–327.
131. Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brüssow H. Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*. 2003 Ago; 6(4): 417–424.

132. Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Abr 24; 106(12):4629–4634.
133. Verbeken G, Pirnay J-P, Lavigne R, Jennes S, De Vos D, Casteels M, *et al.* Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2014 Abr; 62(2): 117–129.
134. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brüssow H. In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages: Implications for Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 Jul; 48(7):2558–2569.
135. Brabban AD, Hite E, Callaway TR. Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2005; 2: 287-303.
136. O’Shea YA, Boyd EF. Mobilization of the *Vibrio* pathogenicity island between *Vibrio cholerae* isolates mediated by CP-T1 generalized transduction. *FEMS Microbiology Letters*. 2002 Set 10; 214(2): 153–157.
137. Maiques E, Ubeda C, Tormo MA, Ferrer MD, Lasa I, Penadés JR. Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *Journal of Bacteriology*. 2007 Ago; 189(15): 5608–5616.
138. Górski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Lobočka M, Fortuna W, *et al.* Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2009 Set; 10(8): 766–774.
139. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Journal Virulence*. 2014 Jan 1; 5(1): 226–235.