

João Filipe Gomes Martins

**ESTUDO DO EFEITO DE POLIOXOMETALATOS COM
PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2019

João Filipe Gomes Martins

**ESTUDO DO EFEITO DE POLIOXOMETALATOS COM
PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS**

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efectuado sob a orientação de:

Professor Doutor Aureliano Alves

Professora Doutora Leonor Faleiro



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2019

Estudo do Efeito de Polioxometalatos com Propriedades Antibacterianas

Declaração de autoria de trabalho

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

Faro, 30 de Setembro de 2019

Copyright© 2019 João Martins

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Após a redação da dissertação é necessário dar louvor aos que contribuíram para que tal acontecesse, desde aqueles que estiveram presentes para resolver o impensável, mas também àqueles que nada fizeram, mas deram a energia fundamental para persistir neste caminho até esta fase do percurso.

Aos primeiros, elogio a paciência ao flexibilizarem o caminho para que tudo acontecesse no tempo certo e fossem atingidos os objetivos definidos à priori. Neste grupo englobo, para além das equipas laboratoriais de ambos os laboratórios com que trabalhei e partilhei vivências necessárias à minha progressão, o Professor Doutor Aureliano Alves e a Professora Doutora Leonor Faleiro, os meus orientadores. Aqueles que inicialmente me "desorientaram" de forma a consciencializarem-me de que o caminho é feito por mim, claro que com os dois a ampararem esse caminho como "os muros" onde tantas vezes bati. E que caminho...! Sem eles era impossível a bagagem que levo deste ensino. Neste grupo não posso deixar de agradecer também ao professor Doutor Gil Fraqueza, tanto pela colaboração no laboratório, como a forma como encarou as centenas de dúvidas que lhe coloquei enquanto se realizaram os primeiros ensaios.

Ao segundo grupo, agradeço em especial à equipa com que trabalho diariamente e me ajudou a encaixar o horário necessário para a realização desta dissertação, mesmo depois de eu ter conhecimento que os recursos humanos do Hospital não me validariam o parecer de trabalhador-estudante por não existir um horário fixo de trabalho para apresentar.

Agradeço também à minha família, em especial à minha mãe, pai e irmão e aos meus amigos. Finalmente, quero agradecer à Ana, minha futura esposa que, embora mantivesse no pensamento, "troquei" por tantas horas confim à conclusão desta dissertação. Um pouco de tudo é necessário para a autorrealização.

Um bem-haja a todos!

RESUMO

A permanente ocorrência de multirresistências bacterianas, nomeadamente por bactérias resistentes a antibióticos de última geração, aumenta a necessidade de encontrar novos compostos antibacterianos. Os polioxometalatos (POMs) são aglomerados de oxometalatos de metais de transição, particularmente molibdénio (Mo), tungsténio (W) e vanádio (V) que apresentam atividade antibacteriana. Os POMs puros, híbridos e nanopartículas contendo POMs apresentam atividades antibacterianas cada vez mais específicas e promissoras e por isso têm sido considerados como potenciais fármacos do futuro no tratamento de infeções bacterianas. Embora os mecanismos de ação dos POMs não sejam totalmente conhecidos, as proteínas de membrana constituem potenciais alvos de ação. Na presente dissertação, analisou-se pela primeira vez o efeito de um polioxotungstato (POT) do tipo Preyssler ($[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{14-}$, abreviado de P_5W_{30}) na atividade da Ca^{2+} -ATPase, bem como no crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas, algumas das quais multirresistentes. Verificou-se que o P_5W_{30} inibe a atividade da Ca^{2+} -ATPase (IC_{50} 0,4 μM) sendo um dos mais potentes inibidores até agora referidos. O P_5W_{30} apresenta um tipo de inibição mista para esta ATPase. Os efeitos de P_5W_{30} contra bactérias Gram negativas e Gram positivas foram analisados verificando-se que afeta fortemente as Gram positivas. Adicionalmente, analisou-se ainda combinações do composto P_5W_{30} com os antibióticos cefoxitina, vancomicina e cloranfenicol contra a bactéria MRSA 16. Verificou-se um efeito sinérgico com o antibiótico cefoxitina. Observou-se ainda, pela primeira vez, um efeito sinérgico entre um POT e o antibiótico cloranfenicol ao reverter a resistência da bactéria MRSA 16 a este antibiótico.

Em conclusão, verificou-se que o composto P_5W_{30} inibe fortemente a Ca^{2+} -ATPase interagindo com a enzima em outro local para além do local ativo. O P_5W_{30} apresenta potencial antibacteriano e ação sinérgica com antibióticos contra bactérias multirresistentes. Sugere-se uma potencial aplicação deste polioxometalato como futuro agente no combate contra bactérias multirresistentes.

Palavras chave: polioxometalatos, Ca^{2+} -ATPase, antibacterianos, multirresistências.

ABSTRACT

The continued occurrence of bacterial multidrug resistance, increases the need to find new antibacterial compounds. Polyoxometalates (POMs) are metal oxide clusters of transition metals, particularly molybdenum (Mo), tungsten (W) and vanadium (V) that exhibit antibacterial activity. Pure, hybrid and nanoparticle POMs containing POMs have increasingly specific and promising antibacterial activities and have therefore been considered as potential future drugs in the treatment of bacterial infections. The POMs' mechanisms of action remain unclear, however, membrane proteins are potential targets. In the present dissertation, the effect of a Preyssler-type polyoxotungstate (POT) ($[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{-14}$) (abbreviated P_5W_{30}) on Ca^{2+} -ATPase activity as well as on the growth of collection and clinical multiresistant Gram positive and Gram negative bacteria was first analyzed. P_5W_{30} has been found to inhibit Ca^{2+} -ATPase activity (IC_{50} 0,4 μM), being one of the most potent inhibitors so far reported. P_5W_{30} has a mixed inhibition type for this ATPase. The effects of P_5W_{30} against various bacteria, was analyzed and was found more active against Gram positive bacteria. Furthermore, combinations of compound P_5W_{30} with the antibiotics cefoxitin, vancomycin and chloramphenicol against the bacterium MRSA 16 were also evaluated. A synergistic effect was observed with the antibiotic cefoxitin. A synergistic effect was also observed for the first time between a POT and chloramphenicol by reversing the resistance of the strain MRSA 16 to this antibiotic. In conclusion, it was found that the compound P_5W_{30} inhibits Ca^{2+} -ATPase by interacting with the enzyme at a site other than the active one. It also has individual antibacterial potential and synergistic action in combination with antibiotics against multidrug resistant bacteria. A potential application of this POT as a future agent against multidrug resistant bacteria is also suggested.

Keuywords: polioxometalates, Ca^{2+} -ATPase, antibacterial, multiresistant.

Abreviaturas

- FIC – Concentração fracionária inibitória
- HEK293 – Linha celular de células embrionárias de rim humano
- HIV – Vírus de imunodeficiência humana
- HT29 – Linha celular de adenocarcinoma do cólon humano
- IC₅₀ – Concentração que inibe 50% da atividade
- K_M – Constante de Michaelis-Menten
- LMCA – Ca²⁺-ATPase da *Listeria monocytogenes*
- MBC – Concentração mínima bactericida
- MIC – Concentração mínima inibitória
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
- NPP – Nucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterase
- NTPDase – Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- OD – Densidade ótica
- PBP – Proteína de ligação à penicilina
- PMCA – Ca²⁺-ATPase da membrana plasmática
- POM – Polioxometalato
- POMo – Polioxomolibdato
- POT – Polioxotungstato
- POV – Polioxovanadato
- RS – Retículo Sarcoplasmático
- SERCA – Ca²⁺-ATPase do retículo sarco(endo) plasmático
- V_{máx} – Velocidade máxima
- VRS – Vesículas do retículo sarcoplasmático
- VRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina

Índice

1.	Introdução	1
1.1	Bactérias e saúde pública	1
1.1.1	Bactérias multirresistentes: uma breve introdução	2
1.2	Homeostasia de cálcio em eucariontes e procariontes	6
1.3	Inibidores da atividade enzimática de Ca^{2+} -ATPases	9
1.4	Polioxometalatos como futuros antibacterianos	12
1.5	Mecanismos de ação de POMs em bactérias	16
1.5.1	Mecanismos de ação na combinação com antibióticos.....	18
1.5.2	Interação de POMs com proteínas membranares.....	20
1.6	Polioxotungstato P_5W_{30} : estrutura e efeitos biológicos	23
1.7	Objetivos	26
2.	Materiais e métodos	27
2.1	Equipamento	27
2.2	Composto para os estudos da Ca^{2+} -ATPase e compostos antibacterianos.....	27
2.3	Material biológico	27
2.4	Meios e condições de cultura	28
2.5	Isolamento da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático	29
2.6	Efeito de P_5W_{30} na hidrólise de ATP pela Ca^{2+} -ATPase	29
2.7	Determinação de suscetibilidade pelo método de difusão em agar	31
2.8	Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC)	32
2.9	Determinação da concentração fracionária inibitória (FIC) e índice FIC.....	33
3.	Resultados e Discussão	37
3.1	Estudo do efeito de P_5W_{30} na atividade ATPásica da Ca^{2+} -ATPase.....	37
3.2	Estudo do tipo de inibição na Ca^{2+} -ATPase pelo composto P_5W_{30}	39
3.3	Suscetibilidade bacteriana de P_5W_{30} pelo método de difusão em agar	42

3.4	Suscetibilidade bacteriana a P ₅ W ₃₀ pelo método de microdiluição	44
3.5	Determinação da Concentração Fracionária Inibitória (FIC) para o antibiótico cloranfenicol e o composto P ₅ W ₃₀	51
3.6	Inibição da Ca ²⁺ -ATPase e efeito antibacteriano	52
4.	Conclusões	53
4.1	Conclusões	53
4.2	Perspetivas Futuras	53
5.	Referências.....	55
6.	Anexo.....	67

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Cronograma da descoberta de três antibióticos aplicados na terapêutica e desenvolvimento de resistências associada	3
Figura 1.2 - Membrana de bactéria Gram negativa e de bactéria Gram positiva.....	5
Figura 1.3 - Esquema geral da homeostasia de Ca^{2+}	6
Figura 1.4 - Mecanismo de transporte de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase.	7
Figura 1.5 - Análise filogenética de nove Ca^{2+} -ATPases experimentais de procariotas e duas enzimas de origem eucarionte (SERCA e PMCA1)	8
Figura 1.6 - Cronograma da descoberta de POTs como antimicrobianos.....	13
Figura 1.7 - Análise dos estudos realizados sobre POMs com ação antibacteriana entre 2011 e 2018.....	14
Figura 1.8 - Possíveis mecanismos antibacterianos dos POMs	16
Figura 1.9 - Esquemática da estrutura de uma célula bacteriana e os alvos dos grupos de antibióticos utilizados na terapêutica	19
Figura 1.10 - Esquemática das possíveis interações entre POMs e proteínas	21
Figura 1.11 - Visão esquemática da ligação covalente entre cisteína do local de interação da proteína Ca^{2+} -ATPase com decavanadato	21
Figura 1.12 - Ilustração do mecanismo antibacteriano de POMs na formação de poros na membrana	23
Figura 1.13 - Composto Pope-Jeanin-Preyssler $[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{-14}$ (Clemente-Juan, Coronado, & Gaita-Ariño, 2012)	24
Figura 2.1 - Esquema do método de enzimas acopladas utilizado para medir a atividade da Ca^{2+} -ATPase	30
Figura 2.2 - Distribuição das concentrações do composto P_5W_{30} e controlo pelos poços da microplaca.	33
Figura 2.3 - Combinação das concentrações do composto Preyssler (P_5W_{30}) e do antibiótico cloranfenicol para determinação do valor de FIC pelo método “ <i>checkerboard</i> ”	35
Figura 3.1 - Inibição da atividade da Ca^{2+} -ATPase por P_5W_{30}	38
Figura 3.2 - Correlações de estrutura-atividade dos diferentes POTs para inibição da Ca^{2+} -ATPase.	39
Figura 3.3 - Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade da Ca^{2+} -ATPase de RS na ausência e na presença do composto P_5W_{30}	40

Figura 3.4 - Apresentação da Ca^{2+} -ATPase na conformação E_2 e o local de ligação sugerido do decavanadato (V_{10}).....	41
Figura 3.5 - Valores de $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ para a estirpe <i>S. aureus</i> ATCC 6538 na presença do composto P_5W_{30}	45
Figura 3.6 - Recuperação da viabilidade de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 após exposição a diferentes concentrações do composto P_5W_{30}	45
Figura 3.7 - Valores de $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ para a estirpe MRSA 16, na presença do antibiótico cefoxitina	49
Figura 3.8 - Valores de $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ observados para a estirpe MRSA 16 na presença da combinação do antibiótico cefoxitina e o composto P_5W_{30}	50

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Valores de IC ₅₀ e aplicações terapêuticas de fármacos e compostos inorgânicos inibidores da Ca ²⁺ -ATPase.....	11
Tabela 1.2 - Efeitos antibacterianos com POTs, POVs e POMos puros, híbridos e em combinação (sinérgicos) citados na literatura nos últimos 6 anos (2014 – 2019).....	15
Tabela 1.3 - Estudos sobre aplicações biológicas de P ₅ W ₃₀ até á data publicados.	25
Tabela 2.1 - Lista de bactérias utilizadas no estudo.	28
Tabela 2.2 - Interpretação do valor de ΣFIC	34
Tabela 3.1 - Valores de K _M e V _{máx} da Ca ²⁺ -ATPase na ausência e na presença de P ₅ W ₃₀	40
Tabela 3.2 - Valores dos halos de inibição produzidos pelo composto P ₅ W ₃₀ nas bactérias testadas.	42
Tabela 3.3 - Valores da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC) do composto P ₅ W ₃₀	44
Tabela 3.4 - Valores MIC dos antibióticos para a bactéria MRSA 16.....	48
Tabela 3.5 - Valores MIC da combinação dos antibióticos vancomicina e cefoxitina com o composto P ₅ W ₃₀	49
Tabela 3.6 - Perfil da ação da combinação do composto P ₅ W ₃₀ com o antibiótico cloranfenicol contra a estirpe MRSA 16 obtido pelo método “ <i>checkerboard</i> ”.	51

1. Introdução

1.1 Bactérias e saúde pública

As infecções bacterianas são consideradas a principal razão do aumento do rácio de mortalidade, morbidade e custos de tratamento nos países desenvolvidos (Walker *et al.*, 2007; Salem *et al.*, 2015; DGS, 2018; D’Elia & Weinrauch, 2018). Para que ocorra infeção é necessário a exposição, aderência e invasão de um microrganismo nos tecidos ou fluidos de um organismo hospedeiro e gerar nele uma resposta imunológica (Institute of Medicine, 2011). É importante salientar que as bactérias existem há mais de 3 biliões de anos e evoluíram de forma a persistir e a se desenvolverem em diferentes habitats, aderir a outras células, criar relações simbióticas e produzir toxinas ou induzir outros mecanismos de defesa (Salton & Kim, 1996). Nesse sentido, a antibioterapia utilizada é limitada para um futuro próximo, obrigando a pesquisa de novas abordagens e de novos compostos no tratamento de infeções bacterianas (Boucher *et al.*, 2009). Foi estimado anteriormente que até 2017, na Europa, a nível hospitalar, um quarto das infeções teve como foco de infeção o aparelho respiratório, seguindo-se o local cirúrgico e as infeções urinárias com um quinto das infeções (ECDC, 2018). As infeções de origem bacteriana consideradas críticas, apontadas por ordem decrescente, são: a bactéria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Candida* spp., *Clostridium difficile*, *Enterobacter* spp., *Preotus* spp., *Acinetobacter* spp., entre outras (Suetens *et al.*, 2018). As causas de mortalidade estão diretamente associadas a sépsis – definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistémica na presença de uma infeção (LaRosa & Opal, 2008) - frequentemente associada a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella* spp., *E. coli* e *P. aeruginosa* (Opal *et al.*, 2003).

Adicionalmente, a elevada prevalência de infeções, quer na comunidade, quer associada aos cuidados de saúde, promovida por bactérias multirresistentes, continua a ser uma problemática presente, sem precedentes e sem solução aparente. Por esse motivo, em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou, pela primeira vez, três níveis de prioridade onde agrupa 12 famílias de bactérias que ameaçam a saúde humana pela falta de tratamentos eficazes.

1.1.1 Bactérias multirresistentes: uma breve introdução

A introdução do antibiótico penicilina G, nos anos 50, foi inicialmente reconhecida como uma “dádiva”. Na verdade, atualmente, a terapia antibiótica está associada ao aumento da esperança média de vida em cerca de 30 anos, quer pelo uso na infeção primária, quer profilaticamente como prevenção de infeções na prática da medicina moderna (Goss *et al.*, 2018). No entanto, a sua utilização massiva, revelou, logo após a descoberta do primeiro antibiótico, o cenário que encaramos até aos dias de hoje – o combate a bactérias multirresistentes. Na Figura 1.1, ilustra-se o exemplo de três antibióticos e o desenvolvimento de resistências bacterianas durante a segunda metade do século XIX. A primeira resistência à penicilina surge 15 anos após a sua descoberta ao serem isoladas estirpes de *S. aureus* portadores de plasmídeos com o gene *blaZ*, cuja expressão codifica penicilinasas, um tipo de enzimas agrupadas com o nome de β -lactamases que degradam os antibióticos (Matono *et al.*, 2018). Em 1959-1960, investigadores encontraram o antibiótico meticilina como solução. Contudo, durou cerca de um ano até serem encontradas estirpes resistentes a este antibiótico - *S. aureus* meticilina resistente, MRSA (do inglês, **M**ethicilin **R**esistant *S. aureus*). Foi verificado que esta resistência não estava associada à produção de enzimas como as β -lactamases, mas sim pela aquisição de proteínas de membrana (transpeptidases) com as quais o antibiótico tem baixa afinidade – proteína de ligação à penicilina, PBP (do inglês, **P**enicilin **B**inding **P**rotein), nomeadamente, a aquisição de PBP2A, em contraste com as suscetíveis a este antibiótico PBP2 a PBP4 (Fishovitz, Hermoso, Chang, & Mobashery, 2014). A PBP2A é codificada pelo gene *mecA*, sendo que recentemente foram observadas estirpes *S. aureus* portadores de um gene homólogo ao *mecA* com 69 % semelhança a nível de DNA e 63 % ao nível proteico, caracterizado como gene *mecC* (Ito *et al.*, 2012). O antibiótico vancomicina veio mais tarde ultrapassar este mecanismo de resistência, mas tal como se verificou anteriormente, esta solução foi por pouco tempo até serem isoladas novamente estirpes com resistência a este antibiótico – *S. aureus* resistentes à vancomicina, VRSA (do inglês, **V**ancomycin **R**esistant *S. aureus*).

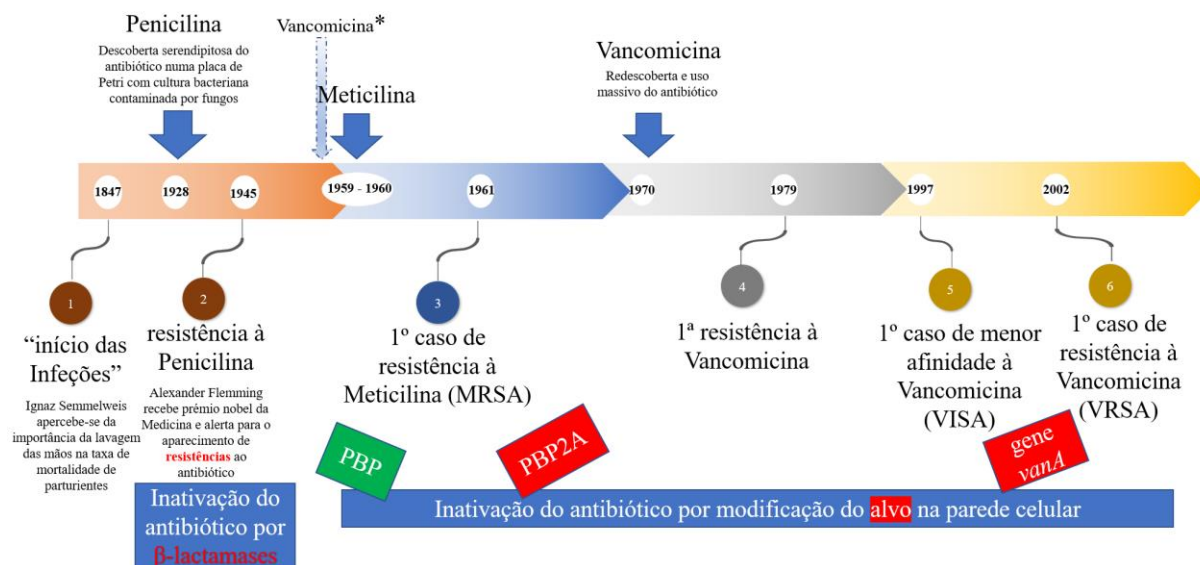


Figura 1.1 - Cronograma da descoberta de três antibióticos aplicados na terapêutica e desenvolvimento de resistências associada. VISA – Vancomycin Intermediate *S. aureus*; VRSA - Vancomycin Resistant *S. aureus*; *- Embora descoberta anos antes da meticilina, é após o aparecimento de MRSA que a vancomicina é usada massivamente.

As resistências bacterianas aos antibióticos podem ser inatas ou adquiridas. A resistência inata pode estar associada à ausência do alvo do antibiótico ou pela presença de barreiras à atividade do antibiótico. A resistência adquirida pode resultar da transferência horizontal de genes ou mutações no DNA (Bush *et al.*, 1989; Faleiro & Miguel, 2013; Durão, Balbontín, & Gordo, 2018). Cada estirpe é determinada como resistente de acordo com os valores de suscetibilidade que apresenta na sua resposta à exposição a cada antibiótico testado, sendo que a suscetibilidade pode ser avaliada pela concentração mínima inibitória, MIC (do inglês, **M**inimum **I**nhibitory **C**oncentration) ou através do halo de inibição que apresenta na exposição ao antibiótico (EUCAST, 2019). Os valores de suscetibilidade de cada bactéria, a cada antibiótico, são apresentados na tabela de “breakpoints” desenvolvida pelo Comité Europeu para o Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana, EUCAST (do inglês, **E**uropean **C**ommittee on **A**ntimicrobial **S**usceptibility **T**esting).

Até ao momento, os antibióticos e respetivo espectro de ação bacteriana (Gram positivo (+), Gram negativo (-), ou largo espectro (para ambos os tipos)) mais usados em terapia sistémica são: β -lactâmicos (espectro alargado), glicopéptidos (Gram +), macrólidos (maioria das Gram +), oxazolidinonas (Gram +), anfenicois (largo espectro), lincosaminas (Gram +), tetraciclina (largo espectro), aminoglicosídeos (largo espectro), fluoroquinolonas (largo espectro), nitroimidazoles (largo espectro), lipopeptidos (Gram +), polimixinas (Gram -) e

estreptograminas (Gram +) (Singh, Young, & Silver, 2017). Em Portugal, o consumo diário de antibióticos sistémicos é de 20,3 doses por 1000 habitantes (na Europa a média é de 21,8), sendo os β -lactâmicos seguido dos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas os mais prescritos (DGS, 2018; ECDC, 2018).

No entanto, é conhecida a má racionalização antibiótica global, grande parte em países sem restrições de prescrição, como o exemplo dos países árabes. Esta má racionalização, associada aos presentes movimentos migratórios, promove consequências drásticas, não só pela indução de novas resistências, mas também pela disseminação para outros países (Häsler *et al.*, 2018). Foram também encontrados antibióticos em concentrações diminutas no meio ambiente, nos rios e nos lagos, sendo também estes fatores potenciadores de resistências antimicrobianas (Singh *et al.*, 2017; Whiteley, Diggle, & Greenberg, 2017; Y. Zhang *et al.*, 2017; Durão *et al.*, 2018). Para além da conferência de resistências, a antibioterapia pode ainda induzir disbiose no organismo alvo ao eliminar o equilíbrio da microbiota pré-existente, potenciando outros problemas, tais como, má absorção de nutrientes no sistema gastrointestinal, disfunções metabólicas como a diabetes, entre outros (Belizário, Faintuch, & Garay-Malpartida, 2018; Relman & Lipsitch, 2018).

Todos estes fatores descritos acima contribuíram para a elaboração de um comunicado da OMS em 2017, onde se listam 3 níveis de prioridade para a investigação, descoberta e desenvolvimento de antibióticos para determinados agentes patogénicos multirresistentes (OMS, 2017). Algumas destas bactérias são abordadas no trabalho prático. As bactérias Gram negativas preenchem 75 % da lista da OMS, em parte por manterem a sua baixa permeabilidade pela parede celular e a presença de uma membrana externa, bem como, os sistemas de efluxo por proteínas membranares que, não só respondem às necessidades da célula, desde o equilíbrio eletrolítico à sinalização via perceção de quórum (Whiteley *et al.*, 2017), mas também promovem a eliminação dos compostos antibacterianos (Bassetti, Cernelutti, & Peghin, 2017; Singh *et al.*, 2017). Na Figura 1.2 ilustram-se as principais diferenças entre a membrana de uma bactéria Gram negativa e uma bactéria Gram positiva.

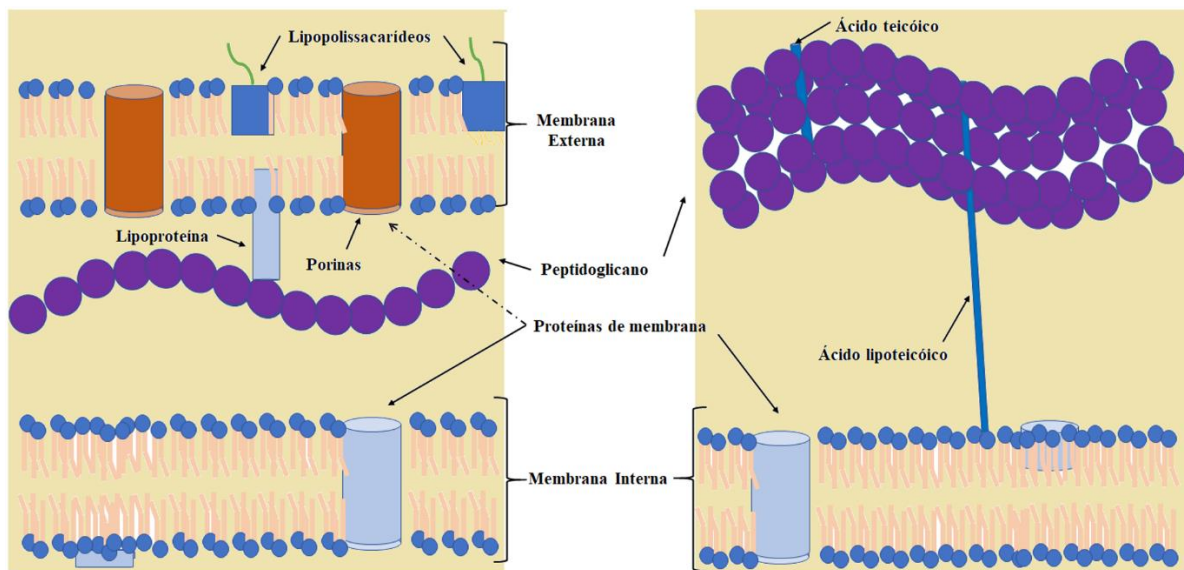


Figura 1.2 - Membrana de bactéria Gram negativa (lado esquerdo) e de bactéria Gram positiva (lado direito).

De encontro ao anteriormente exposto, torna-se urgente encontrar novas formas de tratamento e novos compostos para controlar o aumento de bactérias resistentes. Os programas de desenvolvimento de novos antibióticos em vigor parecem insuficientes para cobrir as necessidades nos próximos 20 anos (Boucher *et al.*, 2009). Neste sentido, novos compostos à base de metais, tais como os polioxometalatos (POMs), POMs híbridos e nanopartículas contendo POMs parecem constituir uma ferramenta alternativa para combater as multirresistências bacterianas. Embora extensivamente descritos na literatura e bem documentados, ainda é precoce o conhecimento dos mecanismos de ação antibacteriana dos POMs. O conhecimento do mecanismo de ação de cada um deles será muito importante para a eventual utilização direcionada e específica contra microrganismos patogênicos (Bijelic, Aureliano, & Rompel, 2018). Sabe-se, por exemplo, que a inibição de enzimas transportadoras de cálcio, ATPases do tipo P, e/ou a prevenção de processos de respiração em procariontes, parecem estar diretamente relacionadas com o potencial efeito de determinados POMs (Fukuda, Yamase, & Tajima, 1999; Rosch, Sublett, Gao, Wang, & Tuomanen, 2008; Yamase, 2013; Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018). Para além da biomembrana, diversos alvos e processos celulares e moleculares podem ser afetados (Bijelic *et al.*, 2018).

1.2 Homeostasia de cálcio em eucariontes e procariontes

O cálcio é um elemento essencial para o funcionamento de diversos processos intracelulares, sendo que o íon cálcio regula diferentes sistemas metabólicos, tais como fotossíntese, contração muscular, plasticidade sináptica e apoptose (Carafoli, 1982). O transporte de cálcio está implicado em atividades celulares, nomeadamente, divisão, desenvolvimento, motilidade, homeostase, resposta a stress, secreção, transporte, sinalização e interação com o hospedeiro (Domínguez, Guragain, & Patrauchan, 2015; Plattner & Verkhratsky, 2015, 2016). A sua regulação e fixação é crítica e necessária, pelo que a sinalização com gastos energéticos é fundamental (Domínguez *et al.*, 2015). Esta homeostasia é conseguida por canais, trocadores e bombas iónicas, os quais se encontram em membranas celulares e/ou em organelos sub-celulares, tais como o retículo sarcoplasmático, SR (do inglês, **S**arcoplasmic **R**eticulum), ou retículo endoplasmático, ER (do inglês, **E**ndoplasmic **R**eticulum), o complexo de Golgi, ou a mitocôndria (Figura 1.3).

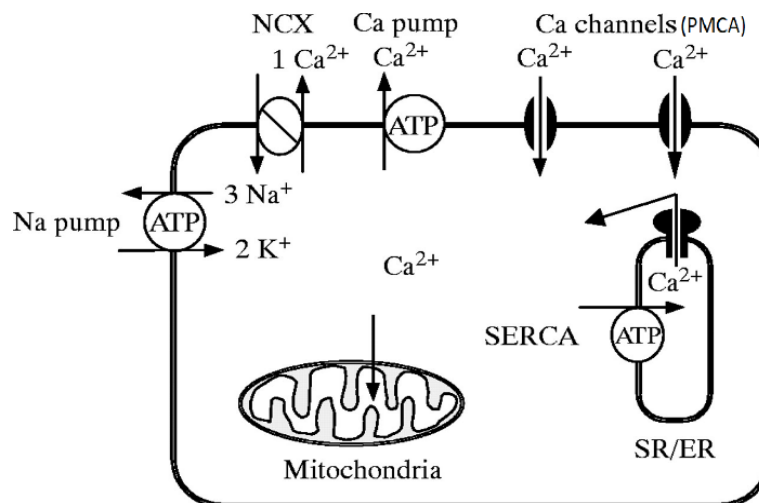


Figura 1.3 - Esquema geral da homeostasia de Ca^{2+} . O Ca^{2+} pode entrar via canais e em algumas situações por trocadores como $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). O Ca^{2+} pode ainda sair do SR/ER via canais de Ca^{2+} , incluindo recetores de rianodina e inositol (1,4,5)-trifosfato ou entrar para o SR pelas bombas de cálcio, tais como a Ca^{2+} -ATPase. Assim, o Ca^{2+} é removido do citosol pela Ca^{2+} -ATPase do SR/ER (SERCA), Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA), trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e o canal de cálcio na mitocôndria. Figura adaptada de (Wang, Lakatta, Cheng, & Zhou, 2002).

A Ca^{2+} -ATPase é uma das enzimas que contribui para o transporte deste íon, sendo que a Ca^{2+} -ATPase do retículo SR/ER, SERCA (do inglês **SR/ER** Ca^{2+} -ATPase), promove a acumulação de cálcio no lúmen e a Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática, PMCA (do inglês, **P**lasmatic **M**embrane Ca^{2+} -ATPase) mantêm a concentração citoplasmática de cálcio através do

transporte deste para o meio extracelular (Brandt & Vanaman, 1996). Nos eucariotas a Ca^{2+} -ATPase do SERCA, subfamília ATPase do tipo P, tem uma massa molecular relativa de 110 kDa (Toyoshima, Nakasako, Nomura, & Ogawa, 2000). As ATPases do tipo P diferem das demais ATPases tipo F_0F_1 (F-), vacuolar (-V) e transportadores dependentes de ATP (transportadores ABC (do inglês, **A**T**P** **B**inding **C**assette)), devido a formarem um estágio intermédio fosforilado durante o ciclo de transporte: estágio $\text{E}_2\text{-P}$ ou $\text{E}_1\text{-P}$ (Bublitz, Morth, & Nissen, 2011).

No entanto, as ATPases do tipo P, tais como as envolvidas na homeostase de cálcio, podem ainda ser transportadores específicos de outros íons, tais como H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ag^+ e Ag^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} e metais, como o exemplo do Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} (Rappas, Niwa, & Zhang, 2004). Estas ATPases têm por isso um papel fundamental na regulação de íons e/ou desintoxicação no caso de metais contaminantes. Este transporte é feito de acordo com o mecanismo E_1/E_2 (Figura 1.4), inicialmente proposto por de Meis e Vianna (1979). O mecanismo faz uso da energia libertada pela hidrólise de uma molécula de ATP (de Meis & Vianna, 1979; de Meis, 2001; Toyoshima & Mizutani, 2004). A ligação do Ca^{2+} na conformação E_1 encontra-se para a superfície externa da vesícula e tem uma afinidade alta ($K_a = 10^{-6}$ M a pH 7). Na forma E_2 a ligação do Ca^{2+} encontra-se virado para o lúmen e tem pouca afinidade para o Ca^{2+} ($K_a = 10^{-3}$ M a pH 7). A enzima na forma E_1 é fosforilada por ATP, mas não por P_i . Contrariamente, na conformação E_2 , esta é fosforilada por P_i , mas não por ATP (Figura 1.4).

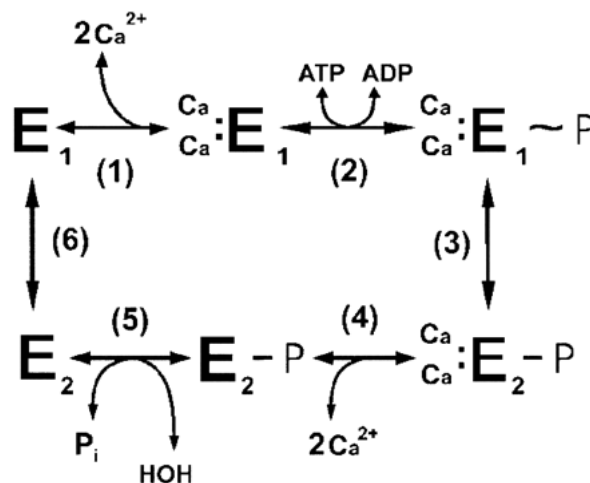


Figura 1.4 - Mecanismo de transporte de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase. A sequência inclui duas conformações distintas, E_1 e E_2 . Adaptado de de Meis e Vianna (1979).

Para além de serem observadas em eucariotes, proteínas homólogas ao SERCA são igualmente observadas em procariontes (Raeymaekers, Wuytack, Willems, Michiels, & Wuytack, 2002;

Faxén *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2015). Na Figura 1.5 pode observar-se uma árvore filogenética de ATPases do tipo P de procariotas e respetiva relação com as de eucariotas (Domínguez *et al.*, 2015), sendo que algumas das bactérias que contêm estas ATPases são abordadas no trabalho prático.

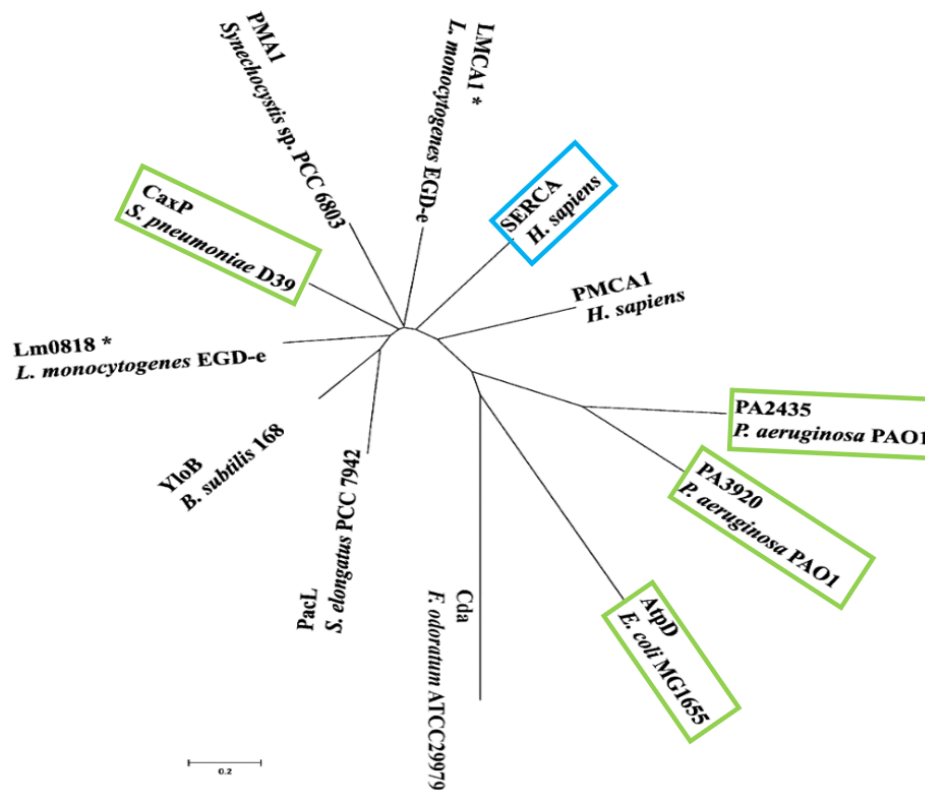


Figura 1.5 - Análise filogenética de dez Ca²⁺-ATPases experimentais de procariotas e duas enzimas de origem eucarionte (SERCA e PMCA1) a partir da base de dados *National Center for Biotechnology Information*, NCBI. *- representa as enzimas para as quais a estrutura por cristalografia é conhecida. A distância dos ramos indica a quantidade de mudança estimada que ocorreu entre nódulos. Adaptado de Domínguez *et al.*, (2015). Assinalado a cor verde encontram-se bactérias abordadas neste trabalho no estudo de atividade antibacteriana na presença do composto P₅W₃₀. Assinalado a cor azul encontra-se a homóloga à Ca²⁺-ATPase do RS de músculo-esquelético de coelho, com a qual se realizou a avaliação da função e interação do composto P₅W₃₀.

A proteína LMCA1 (do inglês, *Listeria monocytogenes* Ca²⁺-ATPase) da bactéria *Listeria monocytogenes*, embora homóloga a outras Ca²⁺-ATPases, tem apenas local de ligação para uma molécula de cálcio permutando com um hidrogénio aquando da ligação, ao invés de duas moléculas de cálcio e dois hidrogénios como a homóloga eucariota (Faxén *et al.*, 2011). A LMCA1 é importante na remoção de Ca²⁺ da bactéria quando em condições ambientais adversas, tais como a elevada concentração do ião e pH alcalino. Outro exemplo de Ca²⁺-

ATPase procariota é a CtpE, importante no crescimento e integridade do envelope celular em *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis* (Gupta, Shrivastava, & Sharma, 2017). Entre as Ca^{2+} -ATPases descritas, a CaxP em *S. pneumoniae* parece ter sido o primeiro transportador de cálcio descrito em bactérias. A sua função está associada não só à regulação iônica de Ca^{2+} a nível intracelular, mas também requisito para a conferência da patogenicidade desta estirpe (Rosch *et al.*, 2008). Esta bactéria, que apresenta a ATPase do tipo P homóloga às demais identificadas, é também alvo de estudo neste trabalho.

O aumento dos níveis de cálcio são normalmente observados em processos de defesa contra agentes infecciosos (Plattner & Verkhatsky, 2016), i.e., de forma à irradicação de um patógeno, o hospedeiro pode reforçar o cálcio intracelular numa tentativa de causar stress oxidativo para eliminação do invasor. A regulação dos níveis de cálcio intracelular é, como referido anteriormente, necessária em seres procariotas face às condições exigidas. Outros exemplos são observados em bactérias como *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *E. coli*, onde a modificação das concentrações de cálcio livre intracelular modulam centenas de genes em resposta aos níveis de cálcio extracelulares. Na bactéria *E. coli*, a regulação desse íão está envolvida no processo de divisão celular, morfologia e principalmente na formação do envelope celular (Domínguez *et al.*, 2015). A membrana externa e o espaço intermembranar (periplasma) parecem regular a passagem de cálcio formando um local de armazenamento e barreira e o consequente gradiente de concentração. Em certas estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de muco, a concentração de cálcio influencia a estrutura da matriz extracelular dos biofilmes criados (Sarkisova, Patrauchan, Berglund, Nivens, & Franklin, 2005). Nesta bactéria, o aumento da concentração de cálcio é também um fator de patogenicidade ao estar associado tanto ao aumento na produção de alginato, relacionado com a aderência inicial do biofilme, bem como à sua espessura a longo prazo (Orgad, Oren, Walker, & Herzberg, 2011).

1.3 Inibidores da atividade enzimática de Ca^{2+} -ATPases

O SR é composto por um conjunto de túbulos e cisternas que rodeiam miofibrilas do músculo estriado compostas por miosina e actina. Este é um sistema membranar intracelular, altamente especializado, que desempenha um papel fulcral no ciclo de contração e relaxamento muscular (Aubier & Viires, 1998). No SR encontram-se as SERCA numa concentração superior a 70 % de todo o conteúdo proteico, sendo deste modo um excelente modelo para estudar os efeitos de inibidores na Ca^{2+} -ATPase (Aureliano *et al.*, 2008).

Sabe-se que as membranas do SR podem ser isoladas sob a forma de vesículas do retículo sarcoplasmático (VRS) de forma estável e mantendo a sua orientação nativa, ou seja, catalisam o armazenamento de cálcio nas vesículas usando a energia da hidrólise de ATP (Mintz & Guillain, 1997). Uma vez possíveis de ser isoladas sob a forma de vesículas, o SR preenche as condições necessárias para utilização experimental *in vitro* como modelo para análise da relação estrutura-função, bem como a compreensão dos princípios de transporte do cátion (Fraqueza, 2013).

A interação entre POMs e bombas iônicas foi recentemente estudada *in vivo* (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018). Foi sugerido que polioxometalatos derivados de vanádio, como o decavanadato e outros POMs derivados de tungstênio (i.e., polioxotungstatos, POTs), apresentam efeitos inibidores na Ca^{2+} -ATPase, equiparados a compostos não inorgânicos presentemente em destaque na farmacologia por serem inibidores de referência destas enzimas. Na Tabela 1.1 são apresentadas diferentes classes de inibidores da Ca^{2+} -ATPase. Estes apresentam diferentes valores de IC_{50} compreendidos entre 0,01 μM e 325 μM . São ainda referidas as aplicações terapêuticas conhecidas para alguns desses compostos. É de notar que o valor mais baixo da Tabela 1.1 está referido para a tapsigargina, descrita recentemente por participar na irradicação do cancro da próstata, atuando como um pro-fármaco (Mahalingam *et al.*, 2017). Na classe dos curcuminoides, observamos a curcumina, cada vez mais conhecida pelos seus efeitos benéficos na saúde, em parte pelo seu efeito antibacteriano. A curcumina, apresenta um valor de IC_{50} na Ca^{2+} -ATPase entre 7 e 17 μM . Podemos ainda observar os valores de IC_{50} de diferentes compostos, orgânicos e inorgânicos de vanádio e tungstênio, onde se destaca o decavanadato e os diferentes polioxotungstatos (POTs), tais como P_2W_{15} , P_2W_{18} e Se_2W_{29} , que se apresentam como potentes inibidores da Ca^{2+} -ATPase.

Assim, foi sugerido pelos seus efeitos *in vitro* e *in vivo* que certos POTs são potentes inibidores desta enzima (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018) e que por esse motivo podem apresentar várias ações terapêuticas, sendo o efeito antibacteriano um deles (Bijelic *et al.*, 2018).

Para além da inibição da Ca^{2+} -ATPase eucarionte, na literatura é também descrita a inibição da Ca^{2+} -ATPase de seres procariontes, previamente referida na Figura 1.5. Como o ião vanadato é um inibidor característico de ATPases do tipo P, observou-se também inibidor da atividade de Ca^{2+} -ATPases em diferentes organismos procariontes, nomeadamente, a ATPase PMA1 da cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC6803, (IC_{50} =119 μM) (Geisler, Koenen, Richter, & Schumann, 1998), a ATPase expressa pelo gene *pacL* da alga *Synechococcus* sp. PCC7942 (250 μM) (Berkelman, Garret-Engele, & Hoffman, 1994) e ainda a enzima LMCA1 da bactéria *Listeria monocytogenes* (200 μM) (Faxén *et al.*, 2011).

Tabela 1.1 - Valores de IC₅₀ (µM) e aplicações terapêuticas de fármacos e compostos inorgânicos inibidores da Ca²⁺-ATPase.

Classe de Inibidores	Composto	IC ₅₀ (µM)	Aplicações terapêuticas	Referências
Tapsigargina	Tapsigargina	0,029 0,001 0,017	pró-fármaco para o cancro da próstata agente cardioprotetor	(Geng & Lotz, 1995; Johnson, Hsu, Lin, Song, & Chen, 2002; Moreno <i>et al.</i> , 2008; Sagara & Inesi, 1991)
Ácido Ciclopiazônico	Ácido Ciclopiazônico	0,2 1,0 – 3.0	ação cardioprotectora na isquemia do miocárdio	(Soler, Plenge-Tellechea, Fortea, & Fernandez-Belda, 1998) (Yard, Chiesi, & Ball, 1994)
Artemisinina	Artemisinina		anti malárico	(Eckstein-Ludwig <i>et al.</i> , 2003)
2,5-(t-butil)-dihidroxibenzeno	BHQ		antioxidante	(Logan-Smith, Lockyer, East, & Lee, 2001)
Lactonas Macroclínicas	Ciclosporina A Ivermectina Rapamicina	65 3,54 14,9 77	imunossupressor anti-helmíntico de largo espectro	(Ahern <i>et al.</i> , 1999; Jonathan G Bilmen, Wootton, & Michelangeli, 2002)
Curcuminoides	Curcumina	15,0 7-17,0	anti-tumoral, antioxidante, anti amiloide, anti-inflamatório, antibacteriano	(J G Bilmen, Khan, Javed, & Michelangeli, 2001; Gunes <i>et al.</i> , 2016; Logan-Smith <i>et al.</i> , 2001)
Clotrimazole	Clotrimazole		antifúngico	(Bartolommei <i>et al.</i> , 2006)
Cloropromazina	Cloropromazina		antipsicótico	(Bhattacharyya & Sen, 1999)
Cloroquina	Cloroquina(CLQ)		antimalárico	(Bhattacharyya & Sen, 1999)
Celecoxibe	Celecoxibe	35	anti-inflamatório	(Bartolommei <i>et al.</i> , 2006)
Halotano	Halotano		anestésico volátil	(Grösch, Maier, Schiffmann, & Geisslinger, 2006)
Pesticidas	Clordecone; Toxafeno		pesticida	(Kodavanti, Cameron, Yallapragada, & Desai, 1990)
Compostos de Vanádio	V ₁ V ₁₀ PDC-V(V) BMOV Vanadato (V1) HAIDA-V(IV)	50 15 26 40 80 325	propriedades insulino-miméticas (antidiabéticos)	(Aureliano <i>et al.</i> , 2008; Fraqueza, Ohlin, Casey, & Aureliano, 2012)
Compostos de Tungstênio	W1 – Tungstato de sódio P ₂ W ₁₅ P ₂ W ₁₈ Se ₂ W ₂₉	200 0,55 0,6 0,3	anti-tumoral? antibacteriano? Outros?	(Fraqueza <i>et al.</i> , 2012; Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)

-BHQ – Hidroxitolueno Butilado; PDC-V(V) – piridina-2,6dicarboxilato dioxovanadato(V); BMOV – bis(maltolato)oxovanadato(IV); HAIDA-V(IV) – bis(hydroxylamidoiminodiacetato)vanádio(IV)

1.4 Polioxometalatos como futuros antibacterianos

Para além de outras terapias antibacterianas recentes, tais como a descoberta da teixobactina numa bactéria Gram negativa (Ling *et al.*, 2015; Fiers, Craighead, & Singh, 2017), os novos compostos orgânicos, como o exemplo dos óxidos de metais, vêm atraindo interesse ao oferecerem mecanismos de ação diferentes dos habituais (Dizaj, Lotfipour, Barzegar-Jalali, Zarrintan, & Adibkia, 2014; Bijelic *et al.*, 2018; Farzana, Iqra, & Hunaiza, 2018).

Os POMs, são descritos como sendo aglomerados de óxido metálicos de metais de transição, tais como molibdénio (Mo), tungsténio (W), vanádio (V) e niobato (Nb) (Achim, Peters, Pope, & Gatteschi, 1998; Pope & Kortz, 2012). Foram descritas aplicações em áreas como catálise, ciência dos materiais, fotoquímica, eletroquímica e ainda na biomedicina, demonstrando atividade biológica *in vitro* e *in vivo* como antivirais, antibacterianos, antiprotozoários, antidiabéticos e anticancerígenos (Yamase, 2013; Bijelic *et al.*, 2018).

A investigação dos POMs na medicina iniciou-se nos anos 1970 quando casualmente se verificou que um composto de tungsténio inibiu o retrovírus promotor de leucemia e sarcoma (Chermann, Raynaud, Jasmin, & Mathé, 1970), justificado anos depois como sendo um efeito promovido por ácido silicotungsténico (SiW₁₂). Mais tarde foi sugerido, em parte, um dos seus mecanismos alvo: inativação da transcriptase reversa (Inouye *et al.*, 1993). Pelo mesmo princípio, o primeiro uso de um polioxometalato de tungsténio (POT) ocorre na área médica com o tungstoantimonato (SbW₂₁) em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (i.e., pela alta probabilidade de estes pacientes serem portadores do vírus de imunodeficiência humana, HIV (do inglês **H**uman **I**munodeficiency **V**irus)), verificando-se a não replicação do vírus (Rozenbaum *et al.*, 1985). Em 1993, também de forma serendipitosa, observou-se que um composto à base de fósforo e tungsténio, denominado pelos autores de “Factor T”, aumentava o efeito de antibióticos β-lactâmicos (efeito sinérgico) contra MRSA (Tajima, Nagasawa, & Tadano, 1993) – mais tarde o composto foi reconhecido como PW₁₁, o primeiro de 76 POMs a serem investigados na área da microbiologia pelo autor (Tajima, Nagasawa, Tanabe, Kusaba, & Tadano, 1996). A Figura 1.6 indica, de forma cronológica, a descoberta dos POTs como antimicrobianos.

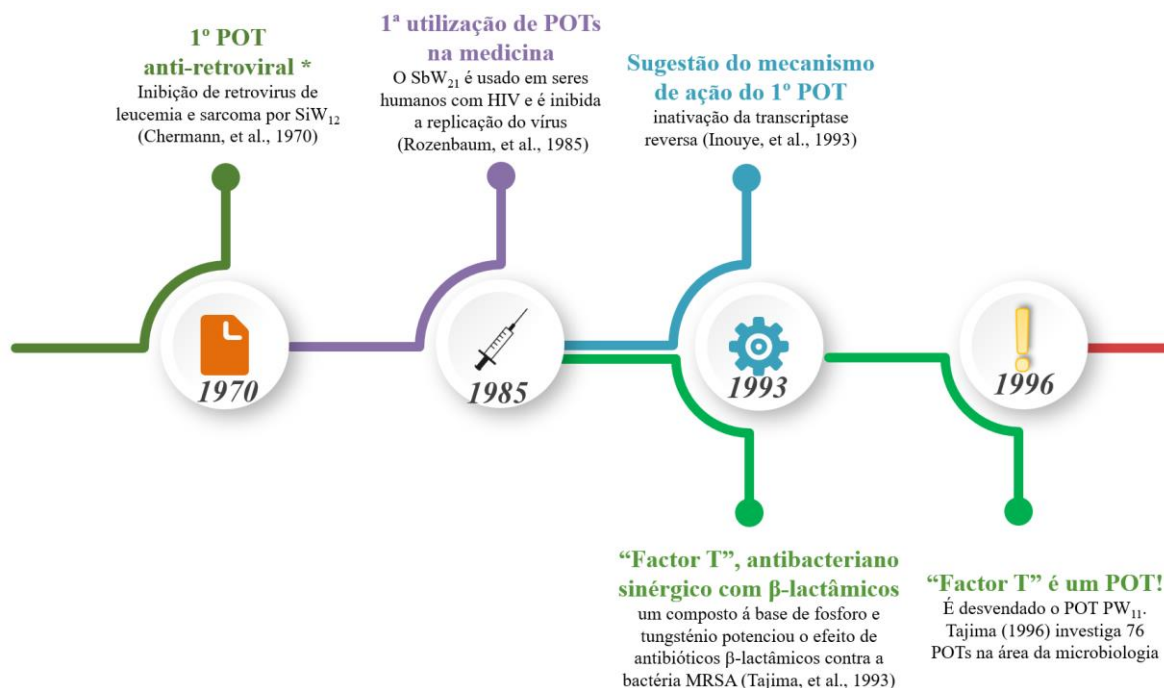


Figura 1.6 - Cronograma da descoberta de POTs como antimicrobianos. *- só mais tarde foi reconhecido como sendo um POT.

Atualmente podem sintetizar-se POMs por via sintética, desde híbridos orgânicos – inorgânicos, a nanocompostos com atividade biológica aumentada (Pradeep, Long, & Cronin, 2010; Bijelic & Rompel, 2018). Após uma pesquisa realizada em Novembro de 2018 na base de dados *Web of Science*, com as *keywords* “POMs” e “Bacteria”, foram encontrados 43 estudos, sendo 16 deles no âmbito da microbiologia (Figura 1.7). De 2011 a 2018 foram realizados 33 estudos, ou seja, 77 % desde 1994, evidenciando claramente o renascer na investigação destes compostos para o combate a multirresistências bacterianas.

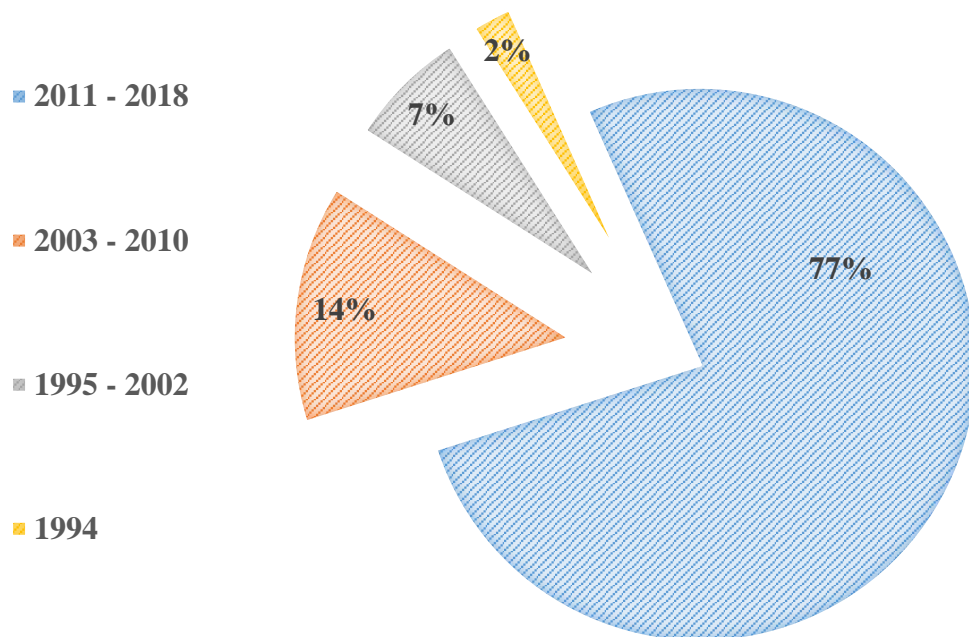


Figura 1.7 - Análise dos estudos realizados sobre POMs com ação antibacteriana através da base de dados *Web of Science* (consulta realizada em 16/10/2018). Como se verifica de forma evidente, em 8 anos, entre 2011 e 2018, foram publicados 77 % dos artigos na área.

Na literatura estão descritos efeitos antibacterianos, quer quando utilizados individualmente, quer sinérgicos quando combinados com outros antibacterianos (Tajima *et al.*, 1993; Yamase, Fukuda, & Tajima, 1996; Fukuda *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2006; Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018; Bijelic *et al.*, 2018). A sua relevância vem sendo demarcada em estudos de revisão (Yamase, 2013; Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018). Na Tabela 1.2 sumarizam-se as bactérias, Gram positivas e Gram negativas, com as quais se realizaram ensaios de suscetibilidade na exposição de diferentes POMs, híbridos ou não híbridos, com ou sem combinação com outros antibióticos, nos últimos 6 anos (2014 – 2019).

Tabela 1.2 - Efeitos antibacterianos testados com POTs, POVs e POMos puros, híbridos e combinados com antibióticos (sinérgicos) citados na literatura nos últimos 6 anos (2014 – 2019). Informação detalhada sobre os POMs pode ser visualizada na Tabela A1 (Anexo).

Polioxotungstatos (POTs)				
Puros		Híbridos		Sinérgicos
<i>Moraxella catarrhalis</i>	a)	<i>E. coli</i>	d), h), i)	MRSA [#] k)
<i>Escherichia coli</i>	a), b), c), d), e), f)	<i>P. aeruginosa</i>	i), j)	
<i>P. syringae</i> pv. <i>Glycinea</i>	e)	<i>S. aureus</i>	i), j)	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	g)			
<i>Salmonella enteritidis</i>	c)			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	b), c), f)			
ESBL ¹ <i>Klebsiella</i>	b)			
<i>Vibrio</i> sp. Gal12	f)			
<i>S. aureus</i>	a), b), c), g)			
MRSA	b), c)			
<i>Bacillus subtilis</i>	e), f)			
<i>Bacillus aquimaris</i>	e)			
<i>Paenibacillus</i> sp.	f)			
<i>Clavibacter michiganensis</i>	e), f)			
<i>Enterococcus faecalis</i>	a), b), g)			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	g)			
<i>Bacillus cereus</i>	c)			
<i>Salmonella typhimurium</i>	c)			
Polioxovanadatos (POVs)				
Puros		Híbridos		sinérgicos
<i>M. catarrhalis</i>	a)	<i>E. coli</i>	l)	MRSA [#] k)
<i>E. coli</i>	l), m)			
Polioxomolibdatos (POMos)				
Puros				
<i>M. catarrhalis</i>	a)			
<i>E. coli</i>	a)			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	a), g)			
<i>S. aureus</i>	a), g)			
<i>Enterococcus faecalis</i>	a), g)			

As bactérias sombreadas a laranja são Gram negativas, sem sombreado, Gram positivas. ¹- produtora de Beta-Lactamases de espectro alargado, do inglês Extended-spectrum beta-lactamase. [#]- testado em combinação com os antibióticos imipenem e amoxicilina. Para facilitar a leitura da tabela, as referências correspondem a letras: a) (Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018) ; b) (Grama *et al.*, 2014); c) (Balici *et al.*, 2016); d) (Li *et al.*, 2016); e) (Ayass *et al.*, 2016); f) (Yang *et al.*, 2015; Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, *et al.*, 2016; Yang, Lin, Bassil, *et al.*, 2016); g) (Gu *et al.*, 2018); h) (D. Y. Fu *et al.*, 2018); i) (Kubo *et al.*, 2017); j) (Liu *et al.*, 2014); k) (Farzana *et al.*, 2018); l) (Missina *et al.*, 2018); m) (Marques-da-Silva *et al.*, 2019).

1.5 Mecanismos de ação de POMs em bactérias

Os mecanismos de ação dos POMs não são totalmente compreendidos e é evidente que são ainda necessários mais estudos. Recentemente, foram referidos cerca de 10 mecanismos tendo em conta todos os estudos até agora realizados, tais como a inibição de ATPases de tipo P, indução de ROS, entre outros (Bijelic *et al.*, 2018). Com certeza existirão muitos mais. No entanto, um determinado POM pode ter vários alvos e vários mecanismos e muitas vezes não é possível definir qual o evento responsável pelo efeito observado que leva à inibição do crescimento ou mesmo à morte da célula bacteriana. Os efeitos antibacterianos, tal como o exemplo da indução de stress (i.e., graças ao seu poder de oxirredução), pode advir tanto do efeito direto, como decorrente da sua própria decomposição. Foi sugerido que, de facto, seja qual for o mecanismo envolvido na ação dos POMs, o conhecimento de qual destes efeitos precede o outro permanece por esclarecer (Bijelic *et al.*, 2018).

Como foi referido acima, são vários os alvos de ação dos POMs. Estes mecanismos podem ser agrupados em extracelulares, ligação membrana por proteínas/enzimas e interferência em processos como a respiração ou dinâmica do citoesqueleto (Figura 1.8).

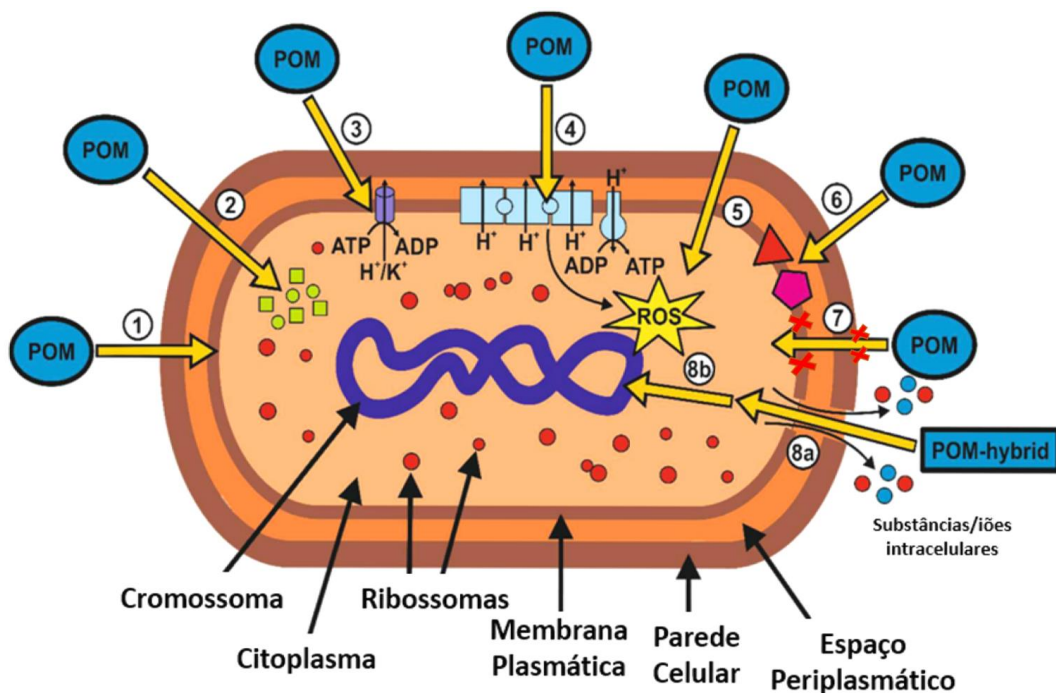


Figura 1.8 - Possíveis mecanismos antibacterianos dos POMs. 1-efeito na membrana; 2- efeito na transcrição/ tradução proteica (ex. a depressão da produção das PBP2A e β -lactamases (a verde); 3- efeito em bombas membranares (ex. ATPases tipo P); efeito na cadeia de respiração (4) e proteínas ancoradas à membrana (6); 5- Potenciadores de ROS; 7- Efeito no citoesqueleto e em mecanismos da divisão celular; 8a e 8b – disrupção celular direta quando encapsulados. Adaptado de Bijelic *et al.*, (2018).

Uma das primeiras questões que se coloca é de saber se o POM pode atravessar ou não a membrana externa das bactérias Gram negativas (Figura 1.8:1). No entanto as bactérias Gram positivas são destituídas desta membrana. Caso o POM não possa atravessar esta barreira muitos dos alvos podem ficar excluídos. No entanto, sabe-se que determinados POMs, para além de demonstrarem efeitos no crescimento de bactérias Gram positivas e de bactérias Gram negativas, foram já observados no espaço intermembranar, além do citoplasma, demonstrando um comportamento idêntico a certos antibióticos (Balici *et al.*, 2016). Assim, Inoue, *et al.*, (2005), sugerem que estes podem penetrar a camada de peptidoglicano e seguidamente a membrana citoplasmática bacteriana, possivelmente pela sua elevada afinidade com transportadores ou canais aí existentes. Adicionalmente, a desintegração, tanto da camada de peptidoglicano como da membrana, são consideradas por estes autores como os potenciais mecanismos de ação. Por apresentarem valores promissores na inibição da Ca^{2+} -ATPase, os POMs como decavanadato e essencialmente os POTs como Se_2W_{29} (Tabela 1.1) podem ter um efeito antibacteriano, atuando nestas bombas no espaço intermembranar (Figura 1.8:3). Os POMs parecem também associados à inibição de outras proteínas tais como sialil- e sulfo-transferases (Figura 1.8:6). Estas proteínas ancoradas à membrana estão associadas ao metabolismo de carboidratos da bactéria. Devido aos estados de oxidação dos metais de transição, foi sugerido que os POMs podem interferir na respiração celular bacteriana/ sistema de transferência de eletrões (Figura 1.8:4) que, ao promover a disfunção de oxirredução, oxidam transportadores de eletrões como NADH e conseqüentemente afetam a produção de ATP. O estudo de Fukuda *et al.*, (1999) sugere ainda que certos POTs podem ser reduzidos *in vivo*, comumente de tungsténio (VI) a (V), podendo essa redução desencadear produção de ROS que, embora descrita como sendo escassa, pode combinar-se com os restantes fatores gerando um efeito cumulativo (Figura 1.8:5). Adicionalmente, os POMs podem levar à oxidação direta de proteínas, lípidos e outros compostos bacterianos internos, bem como de antioxidantes como a glutathiona (GSH), levando à diminuição dos seus níveis intracelulares, contribuindo para a desregulação dos sistemas antioxidantes da célula. Embora nunca observados no citoplasma, processos tipo endocitose desencadeados após ligação com proteínas de superfície membranar sugerem-se também plausíveis, tal como o exemplo dos POTs competirem com macromoléculas polianónicas ou acetiladas (ex. da albumina modificada) na ligação aos recetores *scavenger* dos macrófagos (Ni *et al.*, 1996).

A investigação destes compostos como potenciais agentes antibacterianos passa também pela sua microencapsulação. Foi verificado que a encapsulação dos POMs confere bioestabilidade além de se observar um efeito sinérgico quando combinado com materiais também descritos

como antibacterianos (Goy, Britto, & Assis, 2009; Dufaud & Lefebvre, 2010; Fiorani *et al.*, 2014; D. Y. Fu *et al.*, 2018). O exemplo da encapsulação com quitosano ou por adsorção com prata, promove a decomposição da parede celular (Figura 1.8:8a), podendo os próprios materiais da encapsulação promover a ação antibacteriana ao interagirem com moléculas de DNA, provocando danos celulares irreparáveis (Figura 1.8:8b). Fu *et al.* (2018), observaram atividade antibacteriana de decatungstato e európio (EuW₁₀) encapsulados em capsídeo viral do vírus do papiloma humano, HPV (do inglês, **H**uman **P**apiloma **V**irus) contra *E. coli*. Os autores verificaram uma ação bacteriostática, em comparação com o composto sem encapsulação e em relação ao composto quando adsorvido na superfície da cápside (D. Y. Fu *et al.*, 2018).

Por outro lado, ao invés de encapsulados, a colocação dos POMs na aura superficial de nanopartículas de prata parece promover também aumento de dano físico da superfície da bactéria *E. coli* (i.e., promovidos por uma cápsula de tirosina, os POMs atuam como encapsuladores e redutores) (Daima *et al.*, 2014).

A utilização de POTs podem, por si só, ser os promotores da bioestabilidade e aumentar o espectro de ação de outros materiais, tal como foi verificado no efeito bacteriostático em *E. coli* por um polipéptido com parte hidrofóbica de azobenzeno e hidrofílica de lisina formando nanofibras em camadas β através da adição do POT HsiW numa razão de 3:1 (Li *et al.*, 2016).

1.5.1 Mecanismos de ação na combinação com antibióticos

As multirresistências bacterianas podem ser ultrapassadas pela utilização de determinados POMs puros que reverterem a suscetibilidade de bactérias MRSA a antibióticos β -lactâmicos quando utilizados concomitantemente (Yamase *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1999; Balici *et al.*, 2016; Bijelic *et al.*, 2018). Os efeitos como depressores de transcrição genética, o qual inviabilizam a tradução de enzimas que conferem resistência a bactérias (ex. dos genes *mecA* e *vanA* nas bactérias MRSA e VRSA, respetivamente), foram previamente observados, colocando estes compostos a atuar no citoplasma (Figura 1.8:2) (Yamase, 2005). Em conformidade com estes resultados, os mesmos autores observaram a diminuição da produção das diferentes PBP, desde PBP2 a 4 e em maior quantidade, PBP2A, responsável pela resistência a β -lactâmicos, (i.e., a PBP2A é a proteína produto da expressão genética do gene *mecA* que confere a resistência aos antibióticos β -lactâmicos por estes antibióticos terem menor afinidade a esta proteína). Por ser a PBP2A uma proteína com “turnover” rápido e pouca atividade enzimática, sugere-se, deste modo, ser mais facilmente afetada que as restantes proteínas de membrana (Yamase *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2006; Yamase,

2013). Existem várias hipóteses para explicar o sinergismo entre antibióticos β -lactâmicos e POMs, no entanto podem existir outros para além dos referidos. Na Figura 1.9, esquematizam-se os diferentes grupos de antibióticos e respetivos locais de atuação. Evidenciam-se ainda os estudos de combinações até ao momento realizadas entre antibióticos e POMs, sendo que as setas verdes indicam os antibióticos utilizados em combinação com o composto P₅W₃₀ neste trabalho.

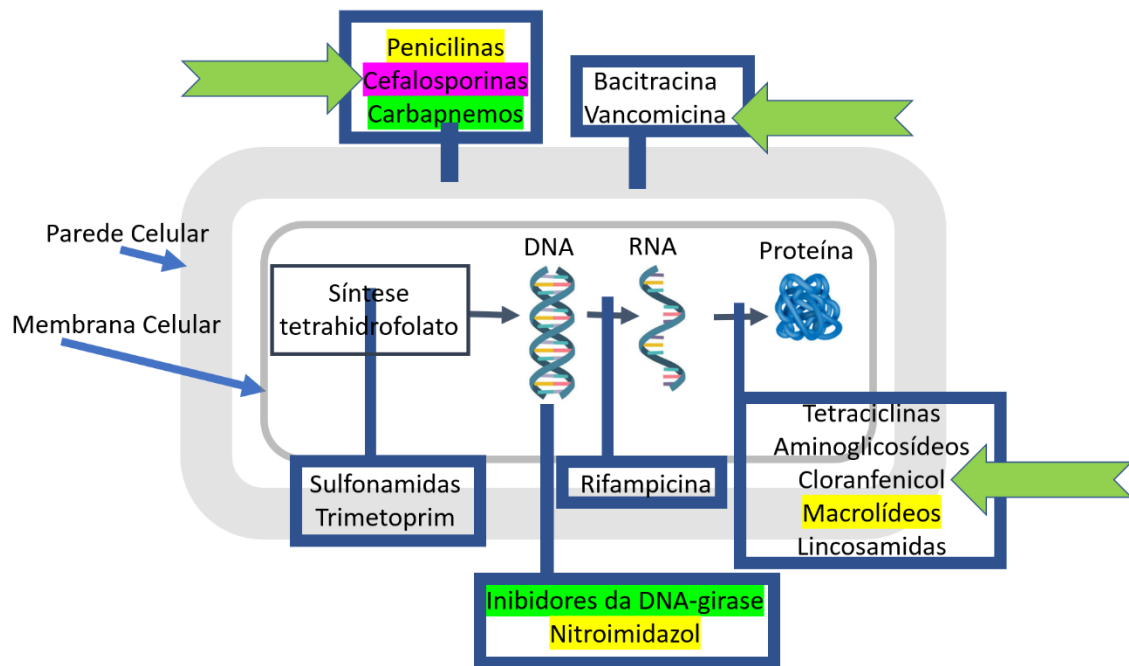


Figura 1.9 - Esquemática da estrutura de uma célula bacteriana e os alvos dos grupos de antibióticos utilizados na terapêutica. Os antibióticos em realce representam, até ao momento, aqueles que foram combinados em ensaios com POMs. Realce a amarelo (Fukuda *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2005, 2006); a verde (Farzana *et al.*, 2018); a rosa (Yamase *et al.*, 1996; Tajima, 2005). As setas verdes indicam os antibióticos utilizados em combinação com o composto P₅W₃₀ neste trabalho. É necessário salientar que, até ao momento, não foram testadas quaisquer combinações de antibióticos com este POT.

Devido ao seu carácter polianiónico, os POMs podem realizar interações electroestáticas com cargas positivas na superfície das proteínas e deste modo inibir enzimas sensíveis a interações com aniões (Tajima, 2005). A equipa liderada por Farzana, R. (2018) sugerem ainda interações com o DNA e conseqüente interferência com a síntese de mRNA e proteínas, resultando em efeitos bacteriostáticos e até bactericidas pela provável depressão na transcrição de mRNA ou tradução proteica. Para outros autores, tais como Gumerova, *et al.*, (2018), a atividade antibacteriana dos POMs pode depender da composição, forma e tamanho. Estes autores

sugeriram que POMs com tamanho médio (i.e., carga maior que -12 e o número de átomos de tungstênio inferior a 23), a atividade pode ser correlacionada com a carga total.

No presente trabalho, equaciona-se a hipótese de a capacidade antibacteriana poder ser também associada com a inibição da Ca^{2+} -ATPase. De facto, foi recentemente referido uma correlação inversa por Marques da Silva *et al.*, (2019) entre o efeito de inibição da atividade da Ca^{2+} -ATPase e o efeito antibacteriano na Gram negativa *E. coli* por POVs. Assim, o modo pelo qual os POMs podem interatuar com as proteínas é por isso importante para compreender o seu modo de ação específico.

1.5.2 Interação de POMs com proteínas membranares

Embora ainda não se conheça o mecanismo específico da ação que lhes confere o potencial efeito antimicrobiano, não se pode excluir que a sinergia entre diferentes mecanismos possa ser uma justificação para a sua atividade. De entre os mecanismos possíveis na interação dos POMs, as proteínas são sem dúvida um alvo a ter em consideração. Recentemente foram descritos vários estudos sobre o modo pelos quais os POMs podem interatuar com as proteínas (Arefian, Mirzaei, Eshtiagh-Hosseini, & Frontera, 2017; Bijelic & Rompel, 2015, 2018). A Figura 1.10 e Figura 1.11 exemplificam essas interações. Essencialmente são interações não covalentes, tais como electrostáticas (Figura 1.10:a), por exemplo observadas na interação de vários POMs com a albumina humana, sendo sugerido a interação com aminoácidos com carga positiva (lisina arginina e histidina) (G. Zhang *et al.*, 2007). Os POMs podem também interatuar com aminoácidos doadores de prótons através de pontes de hidrogénio (Figura 1.10:b,c), exemplo dos aminoácidos serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os POMs podem interatuar através de moléculas polares, exemplo da água, ou de catiões como Mg^{2+} como mediadores, ou indiretamente com aminoácidos de carga negativa, como o exemplo do ácido glutâmico e ácido aspártico (Figura 1.10:d). Alguns POMs foram ainda observados a interatuar através de interações van der Waals com regiões hidrofóbicas das proteínas, como os aminoácidos valina prolina e glicina (Figura 1.10:e) (Arefian *et al.*, 2017; Bijelic & Rompel, 2018). Sugere-se ainda interação covalente do ácido glutâmico e MO_6 (Figura 1.10:f).

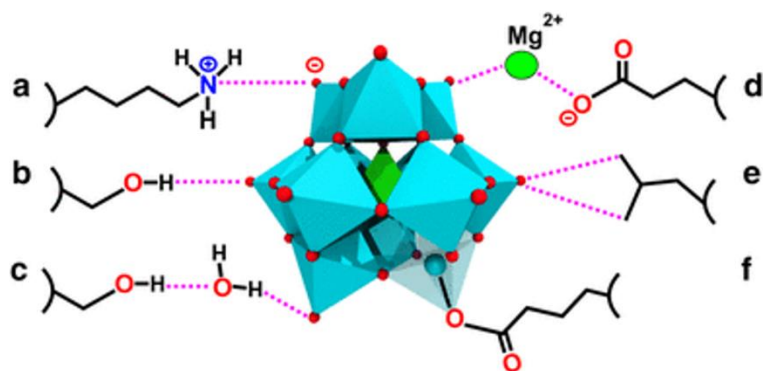


Figura 1.10 - Esquemática das possíveis interações entre POMs e proteínas. Adaptado de (Bijelic & Rompel, 2018).

Para além da ligação covalente anterior, sugerem-se outras por outros autores, por exemplo, com resíduos de cisteína, tal como foi sugerido com a interação de decavanadato com a Ca^{2+} -ATPase (Fraqueza *et al.*, 2012) e com G-actina (Figura 1.11) (Ramos, Moura, & Aureliano, 2012; Marques, Gianolio, Ramos, Batista de Carvalho, & Aureliano, 2017).

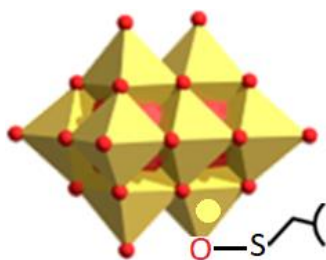


Figura 1.11 - Visão esquemática da ligação covalente entre cisteína do local de interação da proteína Ca^{2+} -ATPase com decavanadato (Fraqueza *et al.*, 2012) e da G-actina (Ramos *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2017).

Muitas das vezes, considera-se essencial a entrada do composto na célula para atuação intracelular, em vez da sua interação direta com a sua superfície. A bicamada lipídica pode ser o primeiro local de interação do POM com a célula, no entanto, foi sugerido que a eventual interação do POM com a bicamada pode levar à decomposição desta última, ou à alteração da sua estrutura (Jing, Hutin, Connor, Cronin, & Zhu, 2013; Sakamoto, Unoura, & Nabika, 2018). A interação inicial dos POMs aniônicos e a carga oposta da parede celular em bactérias, pode levar à disrupção desta e consequentemente à perda dos constituintes celulares, evidenciando a ação destes compostos na alteração do citoesqueleto e dos mecanismos da divisão celular bacteriana (Figura 1.8:7). A corroborar com esta hipótese, inicialmente, o grupo de Fukuda *et al.*, (1999) observou o aumento de diâmetro médio de 1 μm para 2 μm a 3 μm em estirpes

MRSA, justificado pelo aumento de material da parede celular após incubação com POTs; Inoue *et al.*, em 2005, descreveu alterações morfológicas em *H. pylori*, da forma inicial espirilada bacilar, para forma em “U” e cocóide; outros estudos defendem a mesma tese para a exposição de POTs híbridos em populações de *E. coli*, observando-se a alteração morfológica da forma bacilar típica para mais fina ou cocóide após 24 h de exposição (D. Y. Fu *et al.*, 2018). Embora a interação dos POMs com a membrana seja de natureza electroestática, são também sugeridas interações pela hidrofobicidade dos compostos (Kobayashi, Nakahara, Shibata, Unoura, & Nabika, 2017). A interação destes compostos com regiões catiónicas de monocamadas lipídicas ocorrem por interações eletrostáticas, já as regiões aniônicas, neutralizadas por contra catiões, são promovidas por interações hidrofóbicas. No entanto, Kobayashi *et al.*, (2017) verificaram que para ocorrer penetração de membranas celulares, as interações dominantes são dependentes da densidade de carga dos POMs apenas quando não existe condensação da camada lipídica. Quando existe condensação a penetração é governada pelas interações hidrofóbicas, sendo por isso facilitada a penetração de um POM com carga menor (ex. < 5).

Outros estudos também referem alterações na estrutura da membrana microbiana pela adsorção de POMs na camada lipídica (Jing *et al.*, 2013; Sakamoto *et al.*, 2018). A Figura 1.12 ilustra uma sugestão de mecanismo de atuação dos POMs na membrana pela sua adsorção. A sua acumulação, dependente da forma e carga dos POMs, promove desorção, ligações entre eles e re-adsorção repetitiva, levando a que estes POMs e lípidos se assemelhem a surfactantes encapsulados e por isso formem poros na membrana quando esse volume aumenta, i.e., devido às sucessivas ligações lípido-POM (Figura 1.12: 2, 3 e 4). Por sua vez, estes poros podem enclausurar os surfactantes encapsulados com a membrana e ao mesmo tempo funcionar como barreira de difusão, provocando a consequente diminuição do comprimento e coeficiente de difusão da membrana bacteriana (Figura 1.12:5) (Sakamoto *et al.*, 2018).

Mais uma vez, verifica-se o potencial dos POMs como antibacterianos ao serem biologicamente ativos e, neste último caso em particular, dirigidos à membrana bacteriana. Ao atuarem neste local revelam uma menor probabilidade de contribuir para o desenvolvimento de resistências, podendo, por esse motivo, substituir certos materiais utilizados na medicina.

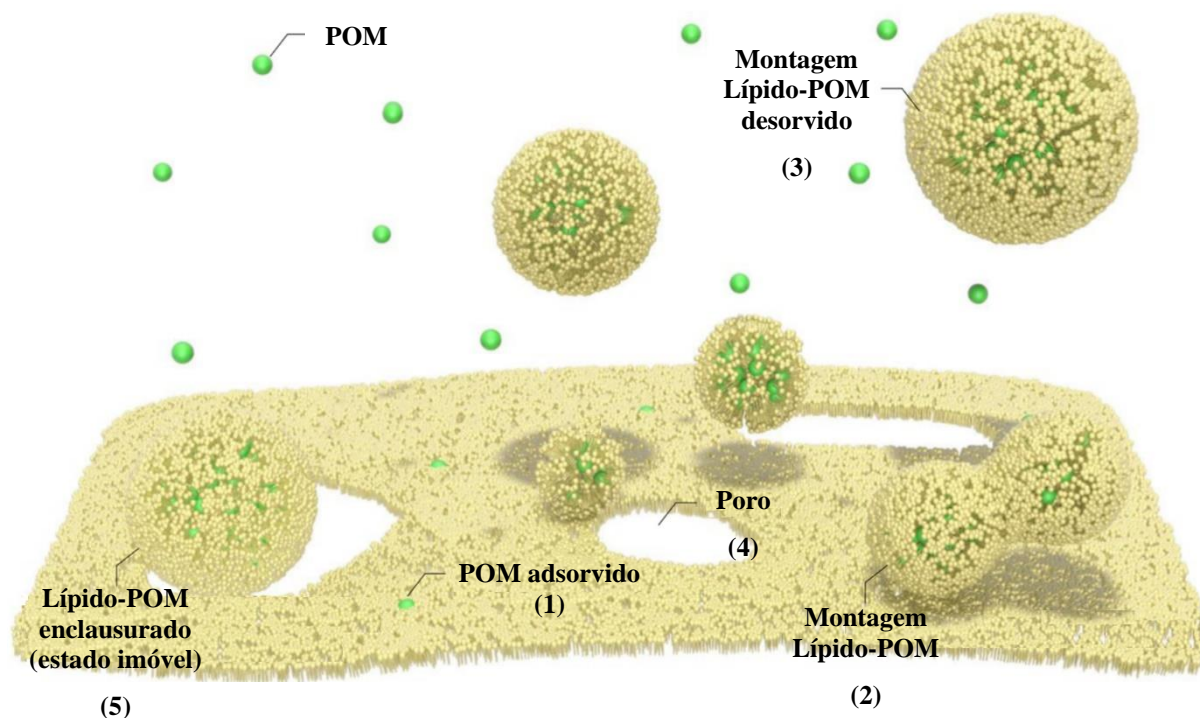


Figura 1.12 - Ilustração do mecanismo antibacteriano de POMs na formação de poros na membrana. O POM (a verde) é adsorvido na superfície da membrana lipídica (1), ocorre montagem lípido-POM por comportamentos de difusão, desorção e re-adsorção (2 e 3); o aumento de tamanho pela montagem lípido-POM deixa poros na membrana (4) que podem enclausurar outros aglomerados lípido-POM (5). Adaptado de Sakamoto *et al.*, (2018).

1.6 Polioxotungstato P_5W_{30} : estrutura e efeitos biológicos

O composto aniônico $[NaP_5W_{30}O_{110}]^{-14}$ (abreviado de P_5W_{30}), foi inicialmente caracterizado por Preyssler, em 1970. Mais tarde, Pope e Jeanin desvendaram a sua fórmula através de cristalografia de raio X (Alizadeh, Mohammed Harmalker, Jeannin, Frere, & Pope, 1985). O P_5W_{30} é um composto de estrutura grande, 14,8 Å, de forma circular tipo anel em forma de “donut” (Figura 1.13). Contém ainda um Na^+ na cavidade central. Esta cavidade é formada por cinco PW_6O_{22} , derivados do anião Keggin ($PW_{12}O_{40}$)⁻³, ao serem removidos dois sets de 3 WO_6 octaédricos nos cantos partilhados (Portilla-Zúñiga *et al.*, 2018). Contém ainda 5 grupos tetraédricos devido ao PO_4 , envolvidos pelos 30 grupos octaédricos WO_6 , 10 na cápsula e 20 na cintura, formando assim uma estrutura molecular em anel (Hayashi *et al.*, 2018).

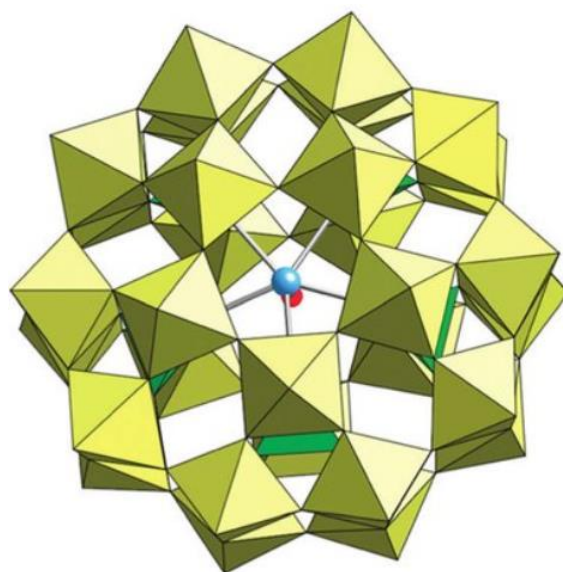


Figura 1.13 - Composto Pope-Jeanin-Preyssler $[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{14-}$ (Clemente-Juan, Coronado, & Gaita-Ariño, 2012). Observam-se os tungstatos (amarelo), fosfatos (verde), oxigênio (vermelho) e no centro o íon sódio (azul).

Na Tabela 1.3 destacam-se as evidências encontradas na literatura sobre este POT na biomedicina. Em 1993 foi referido que este POT podia hospedar íons lantanídeos. Atualmente, sabe-se que podem ser incluídos outros cátions, tais como: Ag^+ , K^+ , Ca^+ , Bi^{3+} , Y^{3+} , além de metais actinóides (Hayashi *et al.*, 2018). O P_5W_{30} é muito usado em catálises ácidas e em materiais funcionais para a formação de compostos orgânicos–inorgânicos e com aplicações biomédicas devido à sua estabilidade a pH fisiológico (Shah, Al-Oweini, Haider, Kortz, & Iqbal, 2014; G. Zhang *et al.*, 2007). Por exemplo, verificou-se que o P_5W_{30} é citotóxico *in vitro* acima de uma concentração de $3,6 \mu\text{M}$ após incubação durante 36 h com a linha celular humana HT29 (L. Fu *et al.*, 2015) e $2,5 \mu\text{M}$ durante 24 h nas linhas celulares A431 e HEK293 (Haider *et al.*, 2018). O composto Pope-Jeanin-Preyssler parece ainda interferir com enzimas associadas à membrana celular pelo que a sua investigação sugere-se promissora (Lee *et al.*, 2015).

Em estudos recentes publicados em 2018, com diferentes POTs, polioxovanadatos (POVs) e polioxomolibdatos (POMos), o Pope-Jeanin-Preyssler evidenciou-se como antibacteriano contra a bactéria *Moraxella catarrhalis* e três bactérias Gram positivas, *S. aureus*, *E. faecalis* (Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018) e *B. subtilis* (Haider *et al.*, 2018). No entanto, não foi observada atividade contra a bactéria Gram negativa *E. coli* (MIC > $256 \mu\text{g/ml}$). Na literatura apenas foi descrito uma ação eficaz do composto P_5W_{30} contra esta bactéria, quando sintetizado com um centro de prata em vez de sódio $[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{14-}$ (Haider *et al.*, 2018).

Os estudos recentes descritos acima sobre a atividade antibacteriana de vários POMs apresentam-se promissores e apontam para que os efeitos antibacterianos do composto P₅W₃₀, bem como a sua possível ação sinérgica (i.e., quando este composto é utilizado com antibióticos contra bactérias resistentes), sejam igualmente explorados. Por outro lado, foi previamente observado que os POTs inibem a Ca²⁺-ATPase com diferentes afinidades, no entanto, até ao momento, não foram estudados os efeitos do composto P₅W₃₀ na atividade desta enzima. Uma vez que a regulação do Ca²⁺ é fundamental no crescimento das populações bacterianas (Plattner & Verkhatsky, 2015; Rosch *et al.*, 2008), estudar o efeito na atividade de enzimas envolvidas na sua regulação pode sugerir um dos mecanismos prováveis de ação deste POM.

Tabela 1.3 - Estudos sobre aplicações biológicas de P₅W₃₀ até à data publicados.

Referência	Efeito
(G. Zhang <i>et al.</i> , 2007)	Ligação à proteína albumina humana com possível desintegração da mesma
(Shah <i>et al.</i> , 2014)	Estável a pH fisiológico
(L. Fu <i>et al.</i> , 2015)	Citotóxico contra a linha celular humana HT29 > 3,6 µM após incubação durante 36 h
(Lee <i>et al.</i> , 2015)	Forte inibidor de enzimas na membrana celular (NTPDase1-3 e NPP1)
(Hayashi <i>et al.</i> , 2018)	Pode albergar iões lantanídeos, Ag ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺ , Bi ³⁺ , Y ³⁺ e metais actinóides
(Haider <i>et al.</i> , 2018)	Citotóxico contra linhas celulares cancerígenas A431 e HEK293 a 2.5 µM
(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)	Antibacteriano contra as bactérias <i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 23246 ¹ e duas estirpes Gram positivas <i>S. aureus</i> ATCC29213 ² e <i>E. faecalis</i> ATCC29212
(Haider <i>et al.</i> , 2018)	Para a bactéria <i>B. subtilis</i> verificou-se inibição de crescimento na concentração de 1 mg/ml
(Haider <i>et al.</i> , 2018)	Para a bactéria <i>E. coli</i> verificou-se inibição de crescimento na concentração de 1 mg/ml quando P ₅ W ₃₀ foi sintetizado com um centro de Ag ⁺ em vez de Na ⁺

¹- MIC de 1 µg/ml; ²- MIC de 16 µg/ml; ³- MIC de 8 µg/ml.

1.7 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo estudar, *in vitro*, os efeitos do polioxotungstato P_5W_{30} na função da Ca^{2+} -ATPase. Adicionalmente, foi avaliado o efeito de P_5W_{30} em diferentes bactérias Gram positivas e Gram negativas, quer em isolados de coleção, quer em isolados clínicos multirresistentes.

Para alcançar estes objetivos foram definidas as seguintes etapas:

1. Determinar os efeitos do composto P_5W_{30} na atividade da Ca^{2+} -ATPase, usando-se o método de enzimas acopladas piruvato cinase/lactato desidrogenase;
2. Determinar o modo de inibição do composto P_5W_{30} na atividade da Ca^{2+} -ATPase;
3. Avaliar a atividade antibacteriana do composto P_5W_{30} pelo método de difusão em agar, contra bactérias de coleção como *E. coli* DSM 1077, *A. baumannii* DSM 3007, *S. aureus* ATCC 6538, *S. pneumoniae* D39 e contra os isolados clínicos multirresistentes *E. coli* I73194, *A. baumannii* I73775, *K. pneumoniae* 70923/4 e *P. aeruginosa* C46281;
4. Determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima bactericida (MBC) do composto P_5W_{30} , pelo método de microdiluições, em bactérias de coleção, nomeadamente *S. aureus* ATCC6538 e *S. pneumoniae* D39 e também em isolados clínicos multirresistentes, nomeadamente MRSA 15 e 16;
5. Verificar a concentração inibitória fracionária (FIC) do composto P_5W_{30} e do antibiótico cloranfenicol, em isolados clínicos da bactéria multirresistente MRSA 16.

2. Materiais e métodos

2.1 Equipamento

Balança analítica XS-410 (Fisher Scientific, USA); Leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan, Áustria); Microscópio ATC 2000 (Leica, Portugal); Incubadora BD 115L (Binder, Alemanha); Câmara de Fluxo Laminar Bio48 (Faster, Itália); Autoclave Uniclave 88 (AJC, Portugal); Agitador magnético com aquecimento ARE (VELP Scientifica, Itália); Vortex L46 (Labinco, Holanda); Jarra de anaerobiose 2.5L (Thermo Scientific, EUA); Congelador -80°C U725 (Innova New Brunswick Scientific, EUA); Espectrofotómetro UV2401-PC (Shimadzu, Japão).

2.2 Composto para os estudos da Ca²⁺-ATPase e compostos antibacterianos

O composto P₅W₃₀ foi sintetizado de acordo com o descrito anteriormente no estudo de Jeannin, *et al.*, (2007) e cedido pela Professora Annete Rompel, do Departamento de Biofísica e Química, da Universidade de Viena na Áustria. Para os estudos da Ca²⁺-ATPase foram preparadas soluções de 1 mM do composto [NaP₅W₃₀O₁₁₀]⁻¹⁴ (abreviado de P₅W₃₀), tendo em consideração a massa molecular de 8263,5. A solubilização do composto foi realizada em H₂O e posteriormente diluída 10x para a concentração final de 0,1 mM, tendo esta sido preparada imediatamente antes dos estudos a realizar e mantida em gelo. Para os estudos antibacterianos foram preparadas soluções de 4 mM do composto e posteriormente foi diluído em meio Mueller-Hinton de modo a obter as concentrações finais para incubação. Os antibióticos utilizados no presente estudo foram vancomicina, cloranfenicol (Sigma), eritromicina e cefoxitina (Hikma).

2.3 Material biológico

As bactérias testadas são indicadas na Tabela 2.1, sendo que se encontram em conservação a -80 °C em meio de cultura líquido suplementado com glicerol (25 %, v/v). A sua recuperação foi realizada em meio de cultura apropriado (ver secção 2.4).

Tabela 2.1 - Lista de bactérias utilizadas no estudo.

Bactéria	Origem e características	Fonte, Referência
<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 3007	Urina	Coleção Alemã de Microrganismos
<i>Acinetobacter baumannii</i> I73775	Urina, multirresistente	Lab Microbiologia, CBMR, UAlg
<i>Escherichia coli</i> DSM 1077	K12 <i>galR arg nad.</i>	Coleção Alemã de Microrganismos
<i>Escherichia coli</i> I73194	Urina, multirresistente	Lab Microbiologia, CBMR, UAlg
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 70923/4	Urina, multirresistente	Lab Microbiologia, CBMR, UAlg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C46281	Urina, multirresistente	Lab Microbiologia, CBMR, UAlg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Ferida	Coleção de Culturas Tipo Americana
<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39	Clínica	UL, RU
<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente 15 (MRSA15)	Clínica	Lab Microbiologia, CBMR, UAlg
<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente 16 (MRSA16)	Clínica	Lab Microbiologia, CBMR, UAlg

CBMR, UAlg: *Centre of Biomedical Research*, Universidade do Algarve, UL, RU: *University of Leicester*, Reino Unido

2.4 Meios e condições de cultura

Os reagentes para preparar os meios, os substratos, bem como as enzimas do método acoplado utilizadas, foram adquiridos através do Centro da Ciência e do Mar, CCMar (Universidade do Algarve), da empresa SIGMA-Aldrich (Portugal).

Os meios de cultura utilizados nos ensaios de microbiologia foram infusão de cérebro e coração, BHI (do inglês, Brain Heart infusion) (Biokar Diagnostics), Mueller-Hinton, MH (Biokar Diagnostics) (Oxoid, RU). Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Na preparação dos meios de cultura sólidos foi adicionado 1,5 % (p/v) de agar (Biokar Diagnostics). A recuperação das bactérias foi realizada em meio MH, exceto a bactéria *S. pneumoniae* D39, para a qual foi utilizado o meio MH suplementado com 5 % de sangue de carneiro (Oxoid). A incubação decorreu a 37 ± 1 °C durante 24 h. A cultura de *S. pneumoniae* D39 foi realizada em condições de microaerofilia com recurso a uma jarra de anaerobiose (Thermo Scientific).

2.5 Isolamento da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático

As VRS, foram isoladas de tecido músculo-esquelético fresco de coelho, através da técnica de centrifugação diferencial. Após a obtenção das VRS, é adicionado sacarose 2 M num volume de 1:1 de modo a preservar a amostra, evitando a danificação da estrutura das VRS inerente ao processo de congelação posterior. O armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é precedido de imersão em azoto líquido de modo a prevenir a formação de cristais de gelo que podem deteriorar as membranas de RS (Aureliano, 1996; Fraqueza, 2013). Nas VRS, cerca de 70 % de todo o conteúdo proteico é constituído pela Ca^{2+} -ATPase, tal como analisado por SDS-PAGE, constituindo por isso um excelente modelo para o estudo dos efeitos de inibidores desta enzima (Aureliano *et al.*, 2008).

2.6 Efeito de P_5W_{30} na hidrólise de ATP pela Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático

Neste trabalho, foi utilizado o método analítico por leitura espectrofotométrica contínua com recurso a um espectrofotómetro UV/VIS (Shimadzu). Este método permite medir, durante um determinado período de tempo, o valor da absorvência a um determinado comprimento de onda ao longo da reação enzimática. Tendo em conta que muitos substratos absorvem na zona do visível ou do ultravioleta, a variação na absorvência no decorrer do ensaio é utilizada para determinar a atividade enzimática da Ca^{2+} -ATPase. Como existem substratos que não possuem esta propriedade, necessitam ser acoplados a reações enzimáticas (Fersht, 2017; Wilson & Walker, 2005). Neste caso em particular, os ensaios com a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático foram medidos espectrofotometricamente a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelo método de enzimas acopladas piruvato cinase/ lactato desidrogenase, (Figura 2.1), tendo como base a absorção de um dos substratos (i.e., NADH) que absorve a 340 nm. Este procedimento utilizado tem sido aplicado em estudos recentes (Aureliano *et al.*, 2008; Fraqueza *et al.*, 2012; Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018).

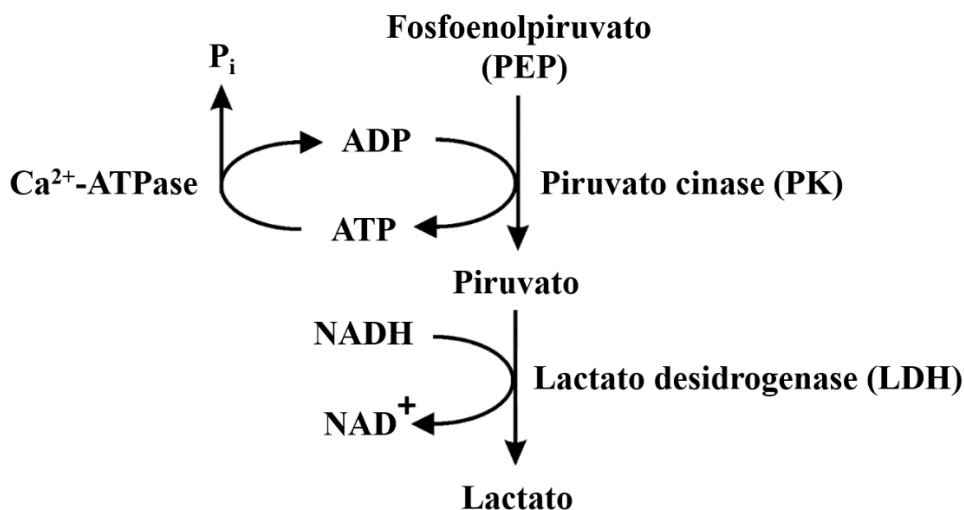


Figura 2.1 - Esquema do método de enzimas acopladas utilizado para medir a atividade da Ca²⁺-ATPase. Quando o NADH se transforma em NAD⁺, o valor de absorvência a 340 nm diminui ao longo do tempo da reação. Este declive é usado para determinar a velocidade da reação de hidrólise de ATP pela Ca²⁺-ATPase. PEP: fosfoenolpiruvato; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018).

Os estudos foram realizados no meio contendo 25 mM de HEPES (pH 7,0), 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 50 μM de CaCl₂, 250 mM de ATP, 42 mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 25 mM de NADH, 18 UI de lactato desidrogenase (LDH) e 7.5 UI de piruvato cinase (PK), com ou sem o POT a ser estudado (controlo). Os registos foram iniciados após a adição das VRS (contendo 10 μg/ml Ca²⁺-ATPase). O declive observado ao longo do tempo da reação é registado por leitura espectrofotométrica ao comprimento de onda de 340 nm (OD_{340 nm}), representando a atividade basal da enzima. Posteriormente, por adição de ionóforo de cálcio A23187, (i.e., um permeabilizador seletivo de Ca²⁺ na membrana), verifica-se um aumento do declive devido a uma diminuição da absorção a 340 nm, mais rápida ao longo do tempo. Esta diminuição de absorção mais rápida na OD_{340 nm} representa a enzima a funcionar na sua máxima velocidade, isto é, a bomba encontra-se desacoplada uma vez que a ausência do gradiente de cálcio causada pelo iónóforo permite o registo da velocidade máxima da atividade da enzima. A atividade desta ATPase, promovida pelo POT, foi medida tendo em consideração a diminuição da absorção do NADH a OD_{340 nm} ao longo do tempo e comparada com a leitura na ausência do composto (controlo, 100 % de atividade). A capacidade inibitória do composto P₅W₃₀ foi avaliada determinando-se o seu IC₅₀, i.e., a concentração necessária para inibir metade da atividade enzimática da Ca²⁺-ATPase. Na presença do composto P₅W₃₀, este foi adicionado antes de serem adicionadas as enzimas do método acoplado. Para cada concentração estudada da incubação foram realizadas experiências em triplicado.

2.7 Determinação de suscetibilidade pelo método de difusão em agar

Para uma avaliação da potencial atividade antibacteriana do composto P₅W₃₀ foi selecionado o método de difusão em agar. Este método consiste na difusão de uma substância biologicamente ativa através de um meio de cultura sólido onde é semeado o microrganismo de interesse. Após um intervalo de tempo estabelecido, a suscetibilidade do microrganismo à substância difundida é avaliada pelo aparecimento de um halo transparente ao redor do disco ou do poço que contém o agente inibidor, traduzindo assim a inibição do crescimento microbiano (Biemer, 1973). O método de difusão em agar é considerado bastante preciso, apesar de alguns aspetos menos favoráveis, tais como a possibilidade do composto não se difundir de modo apropriado no meio de cultura e por isso levar a resultados que se consideram como falsos negativos (Faleiro, 2011). Este método consistiu na preparação de uma cultura bacteriana em meio MH cuja incubação decorreu a 37 °C durante 24 h. A partir desta cultura foi transferida uma ansada para 10 ml de MH (pré-inóculo). A incubação decorreu a 37 °C durante a noite. Posteriormente, a 40 ml de meio MH agar liquefeito foram adicionados 8 ml do pré-inóculo. A mistura foi vertida para uma placa de Petri estéril (200 x 30 mm) que se manteve à temperatura ambiente, numa câmara de fluxo laminar, até à solidificação do meio de cultura inoculado. Seguidamente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril invertida, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro nos quais foram distribuídos 40 µL do composto P₅W₃₀ nas concentrações em estudo, nomeadamente: 0,83 mg/ml (100 µM), 1,65 mg/ml (200 µM), 2,48 mg/ml (300 µM), 3,31 mg/ml (400 µM), 4,13 mg/ml (500 µM). A incubação foi feita a 37 ± 1 °C durante 24 h. O ensaio com a bactéria *S. pneumoniae* D39 decorreu em condições de microaerofilia. Foram realizadas três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas (N=6).

A leitura da suscetibilidade das bactérias ao composto foi feita pela medição da zona de inibição do crescimento à volta do poço. O halo de inibição foi medido em milímetros, incluindo o diâmetro do poço. Pela facilidade de execução e da necessidade de reduzidas quantidades do composto a testar, este método foi utilizado na verificação da suscetibilidade de diferentes bactérias, quer Gram positivas, quer Gram negativas, como um método de triagem para seleção das bactérias e concentrações a utilizar na determinação da concentração mínima inibitória.

2.8 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC)

O valor da concentração mínima inibitória, MIC (do inglês, **Minimum Inhibitory Concentration**) do agente antibacteriano é definido como a menor concentração de um agente antibacteriano que permita a inibição do crescimento em cerca de 95-100 % da população bacteriana, durante um intervalo de tempo definido (geralmente entre 8- 24 h), onde, no entanto, é possível a recuperação das células bacterianas quando transferidas para meio sólido (EUCAST ESCMID, 2000). Quando não é possível observar a recuperação do crescimento bacteriano após a transferência para meio sólido a partir de uma determinada concentração, então essa concentração é denominada por concentração mínima bactericida, MBC (do inglês, **Minimum Bactericidal Concentration**).

Até ao momento não foram descritos ensaios padronizados para a determinação de valores MIC e MBC para os POMs, pelo que é fulcral a adaptação de métodos existentes, tais como o método de difusão em agar e o método de diluição em meio líquido (ex. teste de microdiluição), com vista à avaliação da atividade de compostos POMs e outros agentes antibacterianos (Balici *et al.*, 2016; Bijelic *et al.*, 2018; Fukuda *et al.*, 1999; Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018; Inoue *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 1993, 1996; Yamase, 2013; Yamase *et al.*, 1996). De encontro ao descrito anteriormente, a determinação do valor MIC e MBC foi realizada através do método das microdiluições (CLSI, 2006; Faleiro, 2011). Este método consiste na utilização simultânea de diferentes concentrações do composto no meio de cultura, distribuídos pelos poços nas microplacas (Sarstedt). Cada bactéria em estudo foi previamente cultivada em placas de Petri com meio MH agar a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, uma ansada desta cultura foi transferida para um tubo Falcon com meio de cultura líquido (10 ml), cuja incubação decorreu a 37 °C durante a noite. A distribuição das concentrações pela microplaca está ilustrada na Figura 2.2. Como controlo negativo foram utilizados 200 µL do meio de cultura. Como controlo positivo 100 µL do pré-inoculo foi adicionado a 100 µL do meio de cultura previamente distribuído pelos poços. As concentrações do POM P₅W₃₀ testadas (diluído em meio de cultura) foram as seguintes: 0,83 mg/ml (100 µM), 1,65 mg/ml (200 µM), 3,31 mg/ml (400 µM), 4,96 mg/ml (600 µM), 6,61 mg/ml (800 µM) e 8,26 mg/ml (1000 µM). Como referência foi utilizado o antibiótico cloranfenicol (30 µg/ml). A incubação da microplaca decorreu a 37 ± 1 °C durante 24 h. O crescimento bacteriano foi analisado por espectrofotometria com leituras da densidade ótica a um comprimento de onda de 600 nm (OD_{600 nm}) (Tecan Infinite). A concentração do POM que inibiu em 95- 100 % o crescimento bacteriano foi considerada o valor MIC. Para a

determinação do valor MBC, no final do período de incubação, 8 μL de cada poço foram transferidos para meio MH agar. A incubação decorreu a 37 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. A concentração mais baixa do composto onde não se observou a recuperação do crescimento bacteriano foi considerada o valor MBC. Para este estudo foram utilizadas para cada bactéria um total de três réplicas biológicas e três réplicas técnicas (N=9).

A mesma metodologia foi utilizada na determinação dos valores MIC para os antibióticos vancomicina, eritromicina, cefoxitina e cloranfenicol.

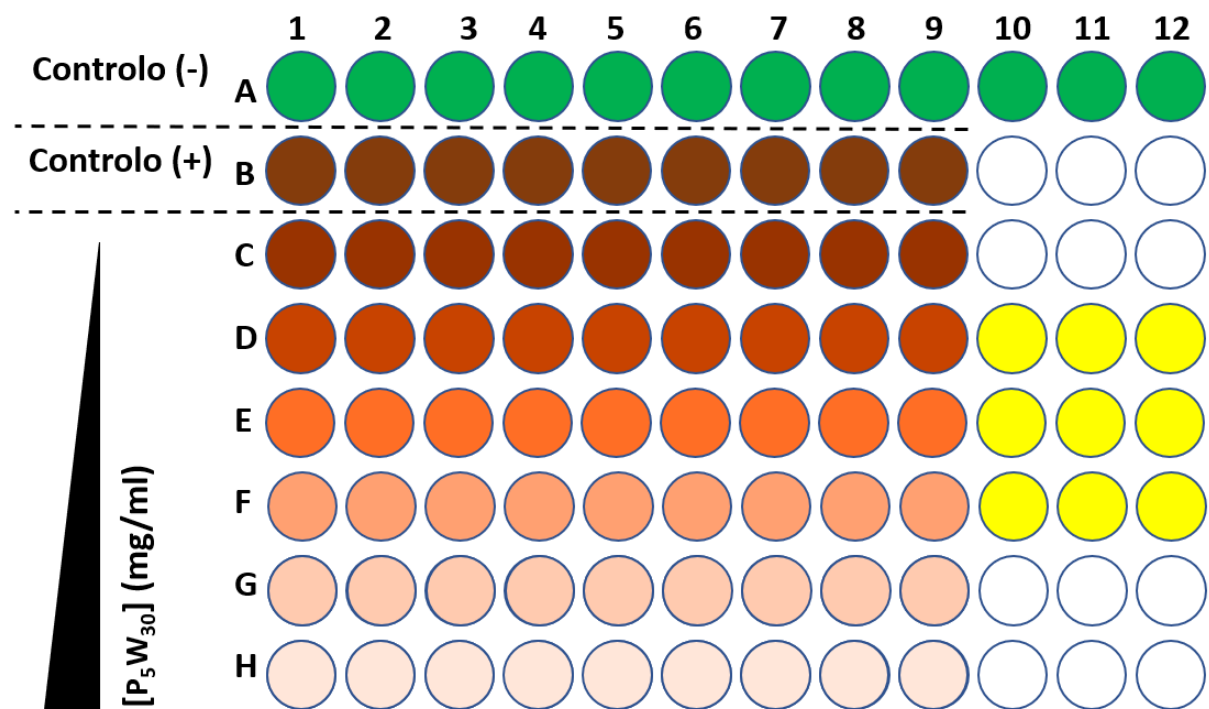


Figura 2.2 - Distribuição das concentrações do composto P_5W_{30} e controlo pelos poços da microplaca. Controlo negativo (-): 200 μL do meio de cultura; Controlo positivo (+): pré-inóculo e meio de cultura; a amarelo, nos poços D:10 a F:12, encontra-se o controlo com o antibiótico cloranfenicol (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Os poços a branco permaneceram vazios.

2.9 Determinação da concentração fracionária inibitória (FIC) e índice FIC

O conceito da concentração fracionária inibitória, FIC (do inglês, **F**ractional **I**nhibitory **C**oncentration) é aplicado no estabelecimento do tipo de ação da combinação dos agentes antimicrobianos. Sabe-se que a combinação de dois agentes antimicrobianos pode resultar em ações completamente diferentes, ou seja, pode ocorrer antagonismo, por um lado, ou apenas um efeito de adição e por último um efeito sinérgico. Um efeito sinérgico de uma mistura de dois agentes antimicrobianos é atingido quando o efeito é maior do que aquele que é observado pela ação isolada de cada agente (EUCAST ESCMID, 2000; Fratini *et al.*, 2017; Hodges &

Hanlon, 1991; Odds, 2003). Para calcular o valor FIC para cada composto antimicrobiano na combinação é necessário a determinação prévia do valor MIC, sendo que o valor FIC constitui a razão do valor MIC para o composto na combinação em relação ao valor MIC do composto individual (Hodges & Hanlon, 1991)(Equação 1 e Equação 2). A soma dos valores FIC de cada composto resulta na obtenção do índice FIC ($FIC_i / \Sigma FIC$) (Equação 3). Deste modo, um valor de $\Sigma FIC < 0,5$ é indicativo de uma ação de sinergismo, mas se o valor se aproximar de 1, então a interação é do tipo aditiva e caso exceda este valor o efeito é de antagonismo (EUCAST ESCMID, 2000; Hodges & Hanlon, 1991; Odds, 2003). Recentemente foi considerada ação sinérgica de compostos em interação com um valor de $\Sigma FIC < 1$ para alguns compostos (Fratini *et al.*, 2017). Estas interpretações estão esquematizadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Interpretação do valor de ΣFIC (i.e., efeito da combinação antibacteriana de dois compostos) segundo as referências indicadas.

	Sinérgico	Aditivo	Comutativo	Indiferente	Antagónico	Referência
ΣFIC	≤ 0.5	$> 0.5 - 1$	N.E.	$> 1 < 2$	≥ 2	(EUCAST ESCMID, 2000)
	< 1	N.E.	$= 1$	$> 1 \leq 2$	> 2	(Fratini <i>et al.</i> , 2017)

N.E. – não estabelecido na interpretação em referência.

O método “*checkerboard*” é utilizado para a avaliação da atividade simultânea de dois possíveis antimicrobianos a diferentes concentrações (Bajaksouzian, Visalli, Jacobs, & Appelbaum, 1997). De acordo com o proposto, e após a determinação dos valores MIC dos compostos individuais, tal como descrito na seção anterior, avaliou-se o efeito combinado do composto P₅W₃₀ ($FIC_{Preysslax}$) com o antibiótico cloranfenicol ($FIC_{Cloranfenicol}$) para diferentes concentrações, conforme ilustrado na Figura 2.3. As seis concentrações do composto P₅W₃₀ utilizadas foram 8,26 mg/ml ($5/3_{MIC}$), 6,61 mg/ml ($4/3_{MIC}$), 4,96 mg/ml (MIC), 3,31 mg/ml ($2/3_{MIC}$), 1,65 mg/ml ($1/3_{MIC}$), 0,83 mg/ml ($1/6_{MIC}$) e as seis concentrações do antibiótico cloranfenicol foram 0,24 mg/ml ($2 \times MIC$), 0,12 mg/ml (MIC), 0,06 mg/ml ($1/2_{MIC}$), 0,03 mg/ml ($1/4_{MIC}$), 0,015 mg/ml ($1/8_{MIC}$), 0,01 mg/ml ($1/12_{MIC}$). Foram distribuídos na microplaca 50 μ L de cada um dos compostos em combinação por poço e 100 μ L quando apenas um dos compostos estava presente.

[P₅W₃₀] (mg/ml)	8,26						
	6,61						
	4,96						
	3,31						
	1,65						
	0,83						
	0						
	0	0,01	0,015	0,03	0,06	0,12	0,24
	[cloranfenicol] (mg/ml)						

Figura 2.3 - Combinação das concentrações do composto Preyssler (P₅W₃₀) e do antibiótico cloranfenicol para determinação do valor de FIC pelo método “checkerboard”.

O inóculo bacteriano foi preparado cultivando a bactéria em meio MH agar a 37 °C durante 24 h. A partir desta cultura uma ansada foi transferida para 20 ml de MH com uma incubação a 37 °C durante a noite. Um volume de 100 µL da suspensão bacteriana, correspondente à escala de 0,5 McFarland, foi distribuída pelos poços da microplaca, à exceção dos poços correspondentes ao controlo negativo aos quais foram adicionados 100 µL de meio MH estéril. A incubação decorreu a 37 ± 1 °C durante 24 h, com monitorização do crescimento bacteriano através de DO_{600 nm} (Tecan Infinite). Os ensaios foram realizados utilizando três réplicas biológicas de três réplicas técnicas (N=9).

Para cada réplica foi realizado tratamento individual dos dados para obtenção dos valores MIC dos compostos antibacterianos na interação. De seguida foi calculado o ΣFIC, como exemplificado pela Equação 3, sendo que o valor de FIC_(Preyssler) e FIC_(Cloranfenicol) é obtido através da Equação 1 e Equação 2, respetivamente.

Equação 1 - FIC segundo o composto Preyssler (P₅W₃₀)

$$FIC_{(Preyssler)} = \frac{MIC_{(do\ Preyssler\ na\ presença\ de\ Cloranfenicol)}}{MIC_{(do\ Preyssler)}}$$

Equação 2 - FIC segundo o composto Cloranfenicol

$$FIC_{(Cloranfenicol)} = \frac{MIC_{(do\ Cloranfenicol\ na\ presença\ do\ Preyssler)}}{MIC_{(de\ Cloranfenicol)}}$$

Equação 3 - Índice de FIC

$$\Sigma FIC = FIC_{(Preyssler)} + FIC_{(Cloranfenicol)}$$

A interpretação do valor de ΣFIC neste estudo é baseada em estudos anteriores (EUCAST ESCMID, 2000) (Fratini *et al.*, 2017) – Tabela 2.2.

3. Resultados e Discussão

3.1 Estudo do efeito de P_5W_{30} na atividade ATPásica da Ca^{2+} -ATPase

Foram efetuados estudos para avaliar o efeito da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo-esquelético de coelho na presença do composto Preyessler $[NaP_5W_{30}O_{110}]^{14-}$ (abreviado P_5W_{30}), utilizando-se o método de enzimas acopladas piruvato cinase/lactato desidrogenase, de acordo com o descrito anteriormente (Figura 2.1). Neste método, a atividade da enzima é indiretamente calculada pela diminuição do valor de $OD_{340\text{ nm}}$, o qual é indicativo da transformação de NADH em NAD^+ que se encontra diretamente acoplado com a hidrólise de ATP pela enzima em estudo.

Os ensaios na presença de P_5W_{30} foram realizados para concentrações entre 0,1 μM e 1 μM . Consoante os valores de absorvência obtidos, foi realizada a conversão destes para o valor de atividade enzimática respectiva, consoante as concentrações do composto utilizadas em cada ensaio, tendo como controlo a atividade da enzima na ausência do composto (100 %). Nas concentrações do composto P_5W_{30} estudadas, nomeadamente 0,2 μM , 0,4 μM , 0,6 μM , 0,8 μM e 1 μM , os valores obtidos de atividade enzimática foram 67,9 %, 47,7 %, 35,0 %, 31,6 %, e 24,7 %, respetivamente. Com estes valores, obteve-se uma curva de tendência bem como a equação que a define (Figura 3.1). Como se pode verificar, a atividade da enzima quando exposta ao composto P_5W_{30} tem um comportamento dependente da concentração (i.e., nas concentrações estudadas), uma vez que com o aumento da concentração do composto, observa-se uma menor atividade da enzima. A concentração necessária do composto para inibir 50 % da atividade da enzima é, pois, definida como sendo o valor de IC_{50} . Neste caso, determinou-se para o composto P_5W_{30} que o valor de IC_{50} é de 0,40 μM .

É importante referir, que, nos testes com P_5W_{30} e a enzima Ca^{2+} -ATPase das VRS, não se verificou alteração da atividade basal da enzima antes do desacoplamento enzimático desencadeado pela adição de ionóforo (informação não apresentada). Posto isto, verifica-se não existir perturbação da região membrana das VRS, por parte de P_5W_{30} . A eventual criação de poros pelo composto P_5W_{30} na membrana onde a Ca^{2+} -ATPase se insere contribuiria para que a atividade enzimática ficasse seriamente comprometida, pois a sua atividade depende da estrutura química e da fluidez da membrana (Dalton, *et al.*, 1998). No estudo conduzido por Sakamoto, *et al.*, (2018), já referido neste trabalho na seção 1.5.2 e Figura 1.12, foi proposto que um dos efeitos antibacterianos dos POMs pode ser devido à permeabilização da membrana celular através da criação de poros resultante da interação dos POMs com a camada lipídica

(ligação lípido-POM). Assim, perante o resultado da atividade enzimática da Ca^{2+} -ATPase do presente ensaio, a interferência com a membrana e consequente formação de poros por parte de P_5W_{30} não parece provável, pelo que se exclui a hipótese sugerida por Sakamoto, *et al.*, (2018) para este POT.

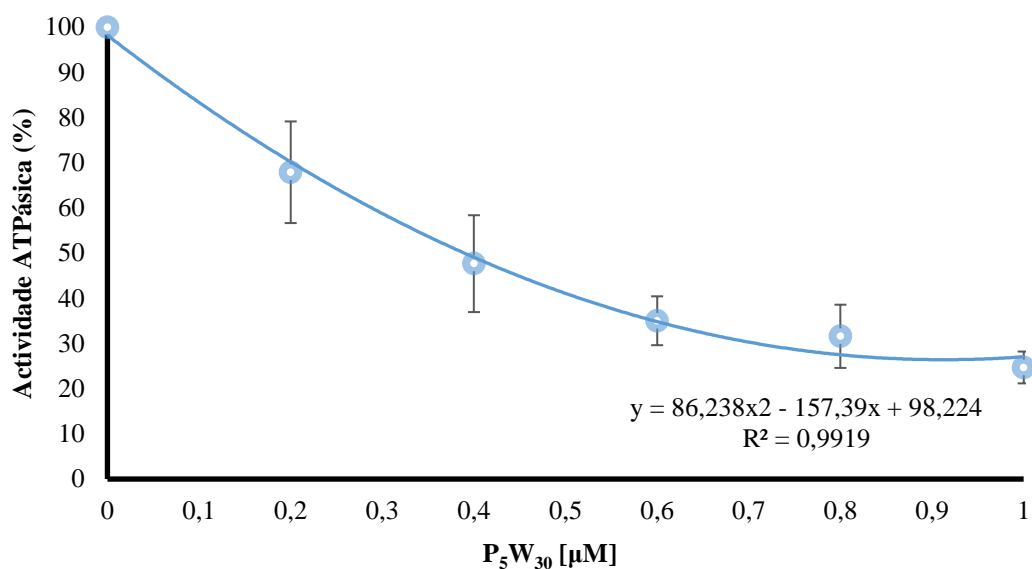


Figura 3.1 - Inibição da atividade da Ca^{2+} -ATPase por P_5W_{30} . A atividade da enzima foi medida espectrofotometricamente a $\text{OD}_{340\text{ nm}}$ e $25\text{ }^\circ\text{C}$ através do método de enzimas acopladas piruvato cinase/lactato desidrogenase. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão e resultam da análise em triplicado para cada condição experimental.

O valor de IC_{50} verificado para P_5W_{30} ($0,4\ \mu\text{M}$) é um dos mais baixos verificados para POMs inibidores desta ATPase que foram até à data descritos. De facto, valores muito próximos do encontrado agora foram estimados para o heteropolitungstato Se_2W_{29} e para o POT do tipo Dawson P_2W_{18} , respetivamente de $0,3\ \mu\text{M}$ e $0,6\ \mu\text{M}$ (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018). Foram também descritos para certos POTs valores de inibição mais elevados (portanto, menos eficazes), como por exemplo de As_2W_{19} , W_{22} , TeW_6 além do oxotungstato monomérico (WO_4), nomeadamente $28\ \mu\text{M}$, $68\ \mu\text{M}$, $200\ \mu\text{M}$ e $400\ \mu\text{M}$ (Fraqueza, 2013; Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018). Por outro lado, oxometalatos de vanádio como o anião monovanadato (V_1) e o decavanadato (V_{10}) também são descritos na literatura com $80\ \mu\text{M}$ e $15\ \mu\text{M}$, respetivamente (Aureliano *et al.*, 2008). Para o decaniobato (Nb_{10}), observou-se um valor de IC_{50} de $35\ \mu\text{M}$. Em relação ao composto P_5W_{30} aqui em estudo, verifica-se que apresenta um valor 1000 vezes inferior que o valor de IC_{50} conseguido pelo tungstato (WO_4), pelo que uma eventual decomposição em monómeros de tungstato não parece provável de ter ocorrido para estas

condições experimentais. Como foi observado anteriormente, o P_5W_{30} é estável a valor pH fisiológico (Shah *et al.*, 2014).

Recentemente foram sugeridas duas correlações entre o IC_{50} e a densidade da carga de POTs, sendo que a densidade da carga foi definida de formas diferentes para cada uma das correlações: a primeira, expressa pela razão da carga do POT em relação ao número de átomos de tungstênio (Figura 3.2:A); a segunda expressa pela razão da carga do POT em relação ao volume do POT (Figura 3.2:B) (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018). Esta correlação verificou-se para os POTs com maior afinidade para a Ca^{2+} -ATPase (i.e., POTs com um IC_{50} inferior a $16 \mu M$). Para estas condições, como se pode observar tendo em conta os resultados obtidos neste estudo, o composto P_5W_{30} obedece a estas mesmas correlações (Figura 3.2). É notável que a posição do composto P_5W_{30} se ajusta perfeitamente em ambas as retas de correlação, encontrando-se próximo do composto Se_2W_{29} e do P_2W_{18} , os quais apresentam o maior e o segundo maior valor de inibição de POMs verificado até então para esta enzima, previamente referido (i.e., $0,3 \mu M$ e $0,6 \mu M$, respetivamente) (Tabela 1.1) (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018).

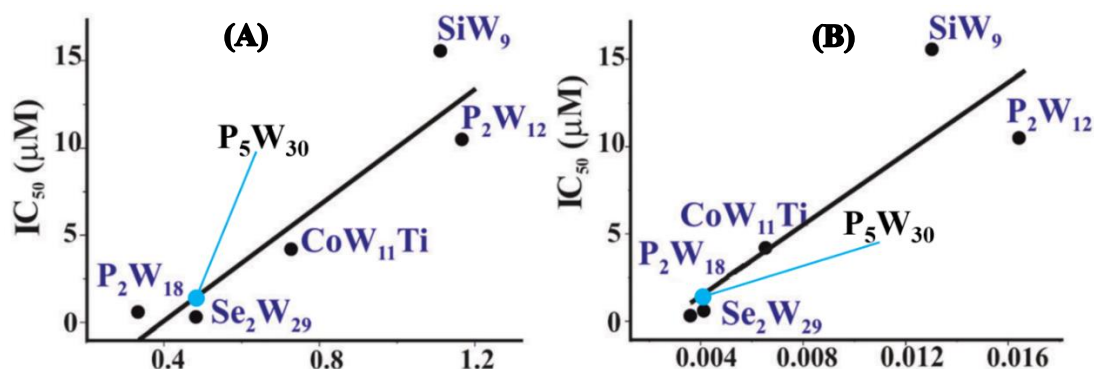


Figura 3.2 - Correlações de estrutura-atividade dos diferentes POTs para inibição da Ca^{2+} -ATPase. (A) correlação entre o valor de IC_{50} (IC_{50} menor que $16 \mu M$) da inibição da Ca^{2+} -ATPase e a densidade de carga (expressa pela carga do POT dividida pelo número de átomos de tungstênio). (B) correlação entre o valor de IC_{50} (IC_{50} menor que $16 \mu M$) da inibição da Ca^{2+} -ATPase e a densidade de carga (expressa pela carga do POT dividida pelo volume deste (em \AA^{-3})). A azul apresentamos o composto P_5W_{30} . Adaptado de (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018).

3.2 Estudo do tipo de inibição na Ca^{2+} -ATPase pelo composto P_5W_{30}

No sentido de se compreender o tipo de inibição de P_5W_{30} na ATPase durante o processo de inibição enzimática, estudou-se a atividade da enzima na ausência e presença de uma concentração do composto P_5W_{30} ($0,6 \mu M$), utilizando-se o método de enzimas acopladas anteriormente descrito (Figura 2.1). Neste sentido, foram utilizadas quatro concentrações

crecentes de ATP, nomeadamente 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, e 3,75 mM, de modo a observar a atividade da enzima consoante as diferentes concentrações de substrato, com e sem a adição do composto P₅W₃₀. Observou-se que a velocidade máxima (V_{máx}) da hidrólise do substrato (i.e., velocidade máxima da atividade da Ca²⁺-ATPase) na ausência e na presença do composto P₅W₃₀ é de 52,36 nmolATP.min⁻¹ e 20,79 nmolATP.min⁻¹, respetivamente (Figura 3.3; Tabela 3.1). O valor de K_M obtido, definido pela concentração de substrato (ATP) necessária para que se verifique metade da velocidade máxima da hidrólise de ATP (i.e., metade da velocidade máxima da atividade da Ca²⁺-ATPase), na ausência e na presença do POM P₅W₃₀ (na concentração de 0,6 μM) foi de 0,38 mM e 0,89 mM de ATP, respetivamente (Figura 3.3 e Tabela 3.1).

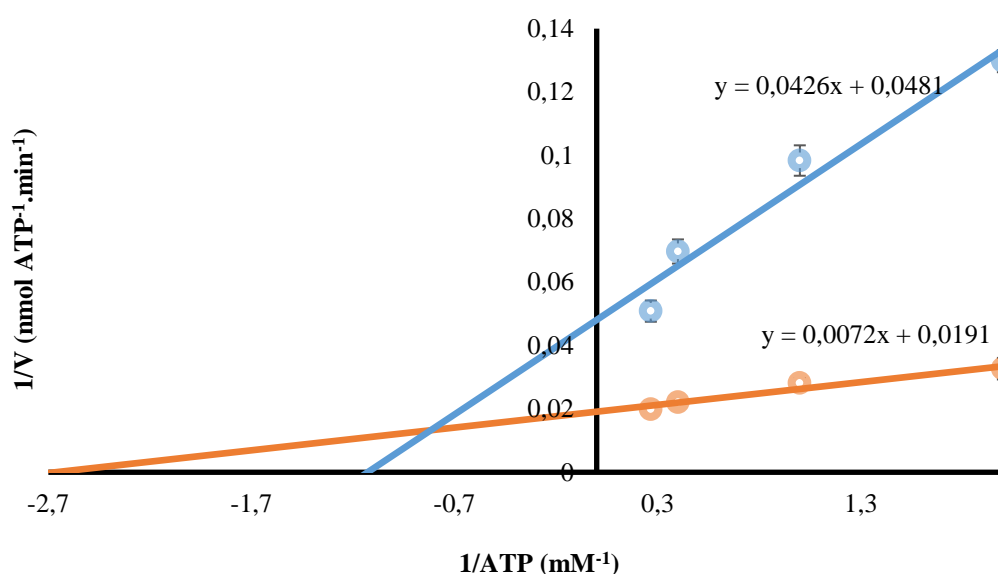


Figura 3.3 - Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade da Ca²⁺-ATPase de RS na ausência (laranja) e na presença (azul) do composto P₅W₃₀ e referidas equações. A concentração de POT usada neste estudo foi de 0,6 μM. A atividade da Ca²⁺-ATPase foi medida espectrofotometricamente através do método de enzimas acopladas determinada e calculada de acordo com as equações representadas referentes a cada uma das linhas: Linha laranja (ausência de P₅W₃₀): y = 0,0072x + 0,0191; linha azul (presença de P₅W₃₀): y = 0,0426x + 0,0481. Os resultados obtidos correspondem à média ± desvio padrão e resultam da análise em triplicado de cada condição experimental.

Tabela 3.1 - Valores de K_M e V_{máx} da Ca²⁺-ATPase na ausência e na presença de P₅W₃₀.

[P ₅ W ₃₀] (μM)	K _M [mM]	V _{máx} (nmolATP.min ⁻¹)
0	0,38	52,36
0,6	0,89	20,79

Uma vez que a $V_{\text{máx}}$ é diferente, isto é, diminui na adição do composto P_5W_{30} em relação ao controlo para as diferentes concentrações de ATP podemos inferir uma não-competitividade do composto na ligação ao local do substrato, sugerindo uma ligação a outro local da enzima para além do sítio ativo. Em relação ao K_M , este aumenta na presença do composto P_5W_{30} em relação ao controlo (i.e., na ausência do composto). Ao ser necessária maior concentração de ATP para se obter metade da velocidade máxima da enzima, pode inferir-se a existência de uma inibição do tipo competitiva em relação ao local de ligação do substrato (ATP) (Figura 3.3). Em suma, de acordo com o ensaio realizado confirmo a avaliação do tipo de inibição da atividade da Ca^{2+} -ATPase, ilustrado na representação de Lineweaver-Burk (Figura 3.3), o tipo de inibição da enzima pelo composto P_5W_{30} (para a concentração de $0,6 \mu\text{M}$) é mista, ou seja, simultaneamente competitiva e não-competitiva. Assim, na presença do POT o valor de $V_{\text{máx}}$ diminui, sugerindo uma inibição do tipo não competitivo. Por outro lado, o valor de K_M aumentou mais do que o dobro, sugerindo uma inibição competitiva. Portanto, como mudam os dois parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, verificou-se que o composto P_5W_{30} apresenta um tipo de inibição misto. Pode então sugerir-se que o P_5W_{30} durante o processo de inibição da enzima pode ligar-se ao local de ligação do substrato, neste caso o ATP, além de poder interagir também noutra local adicional, possivelmente um local carregado positivamente, uma vez que o POT apresenta uma carga global de -14. Este tipo de inibição é semelhante ao referido noutra estudo para outros POTs, tais como TeW_6 e P_2W_{18} (Gumerova, Krivosudský, *et al.*, 2018). No entanto, para Nb_{10} e V_{10} foi descrito uma inibição não competitiva desta ATPase, sugerindo um modo de interação noutra local que não o do substrato ATP (Fraqueza, 2013). Como exemplo, na Figura 3.4 observa-se o local de interação determinado para o V_{10} na Ca^{2+} -ATPase.

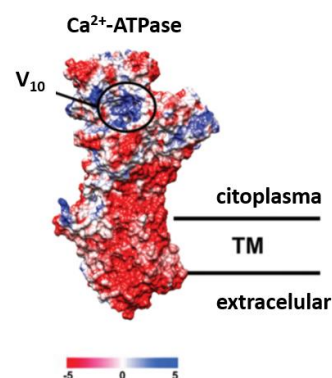

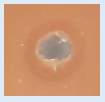
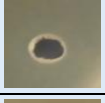




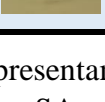


Figura 3.4 - Apresentação da Ca^{2+} -ATPase na conformação E_2 e o local de ligação sugerido do decavanadato (V_{10}) – numa região interna da Ca^{2+} -ATPase carregada positivamente, fora do local de ligação do substrato ATP. A escala refere o potencial electrostático na superfície em $\text{kcal mol}^{-1} e^{-1}$. TM – área transmembranar; Referência PDB: 1KJU. Adaptado de Gumerova, *et al.*, (2018).

3.3 Suscetibilidade bacteriana de P₅W₃₀ pelo método de difusão em agar

O método de difusão em agar foi utilizado com o objetivo de realizar uma triagem na suscetibilidade de bactérias Gram positivas e Gram negativas ao POM P₅W₃₀. Os valores dos halos de inibição obtidos são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores dos halos de inibição (mm) produzidos pelo composto P₅W₃₀ nas bactérias testadas.

Concentração de P ₅ W ₃₀ (mg/ml) (μM)		0,83 (100)	1,65 (200)	2,48 (300)	3,31 (400)	4,13 (500)	Figura representativa
		Halo de inibição (mm)*					
Bactéria							
Gram positivas	<i>S. aureus</i> ATCC6538	13,0 ± 1,4	15,5 ± 2,1	15,5 ± 0,7	16,0 ± 0,0	16,0 ± 5,7	
	<i>S. pneumoniae</i> D39	8,5 ± 0,6	9,5 ± 0,6	10,5 ± 0,6	11,0 ± 0,0	11,5 ± 0,6	
Gram negativas	<i>E. coli</i> DSM 1077	SA	SA	SA	SA	SA	
	<i>E. coli</i> I73194 (MR)	7,6 ± 0,5	7,8 ± 0,5	8,2 ± 0,3	8,9 ± 0,3	9,8 ± 0,5	
	<i>A. baumannii</i> DSM 3007	7,5 ± 1,9	6,8 ± 1,5	6,5 ± 1,0	SA	SA	
	<i>A. baumannii</i> I73775 (MR)	SA	6,5 ± 1,0	8,3 ± 0,5	9,8 ± 0,5	10,5 ± 0,6	
	<i>K. pneumoniae</i> 70923/4 (MR)	6,5 ± 0,6	6,5 ± 0,6	8,0 ± 1,4	8,3 ± 1,3	8,3 ± 0,5	
	<i>P. aeruginosa</i> C46281 (MR)	7,8 ± 4,8	6,5 ± 0,6	7,0 ± 0,8	7,5 ± 1,3	8,0 ± 0,8	

* O diâmetro da zona de inibição inclui o diâmetro do poço (6 mm). Os dados representam a média de três réplicas biológicas e duas réplicas técnicas (N=6) ± desvio padrão. SA: sem atividade; MR: estirpe multirresistente.

A bactéria *S. aureus* ATCC 6538 apresentou um halo de inibição de 13,0 ± 1,4 mm para a concentração mais baixa (0,83 mg/ml) e 16,0 ± 5,7 mm para a concentração mais elevada do composto (4,13 mg/ml). Como se pode observar, a atividade antibacteriana do composto

evidencia uma ação concentração dependente para as concentrações estudadas (Tabela 3.2). Para a bactéria *S. pneumoniae* D39 os halos de inibição também aumentaram de forma crescente de acordo com o aumento da concentração do composto, sendo que para a menor concentração, o halo de inibição observado foi de $8,5 \pm 0,6$ mm e para a maior concentração foi de $11,5 \pm 0,6$ mm o que evidencia menor suscetibilidade da bactéria *S. pneumoniae* D39 em comparação com os valores de inibição observados para a bactéria *S. aureus* ATCC 6538. A menor suscetibilidade de *S. pneumoniae* D39 pode estar associada à presença de uma cápsula polisacarídica que envolve estas células bacterianas, dificultando a entrada do composto na célula (Feldman & Anderson, 2014).

Relativamente às bactérias Gram negativas (*E. coli* DSM 1077, *A. baumannii* DSM 3007 e as estirpes multirresistentes de *E. coli* I73194, *A. baumannii* I73775, *K. pneumoniae* 70923/4 e *P. aeruginosa* C46281) observamos que apenas a bactéria de referência *E. coli* DSM 1077 não foi suscetível ao composto POM P₅W₃₀. Os valores dos halos de inibição observados foram, no geral, dependentes da concentração, sendo a primeira vez reportados para este POT. Contudo, a estirpe *A. baumannii* DSM 3007, nas duas concentrações mais elevadas, não apresentou qualquer halo de inibição, sugerindo uma possível promoção de células resistentes quando o composto P₅W₃₀ é utilizado em concentrações mais elevadas nesta bactéria. É importante salientar que, para esta bactéria, apesar da detecção de halos de inibição nas concentrações de 0,83 mg/ml a 2,48 mg/ml, os seus valores foram muito reduzidos, nomeadamente na ordem de $7,5 \pm 1,9$ mm para a concentração de 0,83 mg/ml e de $6,5 \pm 1,0$ mm para a concentração de 2,48 mg/ml.

Relativamente à bactéria *E. coli* DSM1077, com a qual não se obteve nenhum halo de inibição, os resultados obtidos na presença do composto P₅W₃₀ podem não se concluir como ineficazes contra esta estirpe uma vez que pode afetar o potencial de virulência desta estirpe através do sistema de perceção de quórum podendo, mesmo assim, revelar-se útil na terapêutica. Seriam necessários mais estudos para ser possível elucidar sobre tais efeitos. No entanto, existem referências de que POTs como SiW₁₁ e PW₁₁ possam ser indutores de stress nesta bactéria ao desencadarem, uma expressão do gene *osmY*, normalmente expresso após um sinal osmótico (Tajima, 2003). Estes resultados não foram observados quando realizados com tungstato, fosfato e silicato em separado (Tajima, 2003), sugerindo que estes efeitos antibacterianos desencadeados pela promoção de stress não resultam da decomposição dos compostos, mas sim dos próprios POTs.

No estudo conduzido por Tajima (2005) foi observado que, em discordância com os resultados do presente estudo, apenas estirpes da bactéria *S. aureus* foram suscetíveis aos POTs, no

entanto, o resultado obtido não teve em conta todos os POTs sintetizados, tais como o P₅W₃₀, o que pode explicar a diferença entre os resultados dos dois estudos (Tajima, 2005).

3.4 Suscetibilidade bacteriana a P₅W₃₀ pelo método de microdiluição

Para as bactérias *S. pneumoniae* e *S. aureus* que evidenciaram halos de inibição mais elevados que as restantes bactérias testadas, procedeu-se à determinação dos seus valores MIC, bem como de duas bactérias multiresistentes. Os valores MIC do composto P₅W₃₀ para as bactérias de referência *S. aureus* ATCC 6538 e *S. pneumoniae* D39 e as estirpes multirresistentes MRSA 15 e MRSA 16, foram determinados pelo método de microdiluição. Os valores MIC e MBC obtidos são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Valores da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC) do composto P₅W₃₀.

Bactéria	MIC (mg/ml)*	MBC (mg/ml)*
<i>S. aureus</i> ATCC6538	< 0,83 ± 0,00	0,83 ± 0,00
<i>S. pneumoniae</i> D39	SI	SI
MRSA 15	3,31 ± 0,00	> 8,26
MRSA 16	4,96 ± 0,00	> 8,26

* Os valores representam a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas e três réplicas técnicas (N=9). SI- Sem inibição

O valor MIC para a bactéria *S. aureus* ATCC 6538, foi de 0,83 mg/ml (100 µM) (Figura 3.5). Ao recuperarmos as células das concentrações testadas em meio de cultura sólido, verificou-se que apenas foi possível uma ligeira recuperação numa das réplicas biológicas na concentração mais baixa testada (Figura 3.6). Deste modo, podemos inferir que o valor MBC para o composto P₅W₃₀ nesta estirpe é de 0,83 mg/ml (100 µM) e o valor MIC é consequentemente inferior a esse valor (< 0,83 mg/ml).

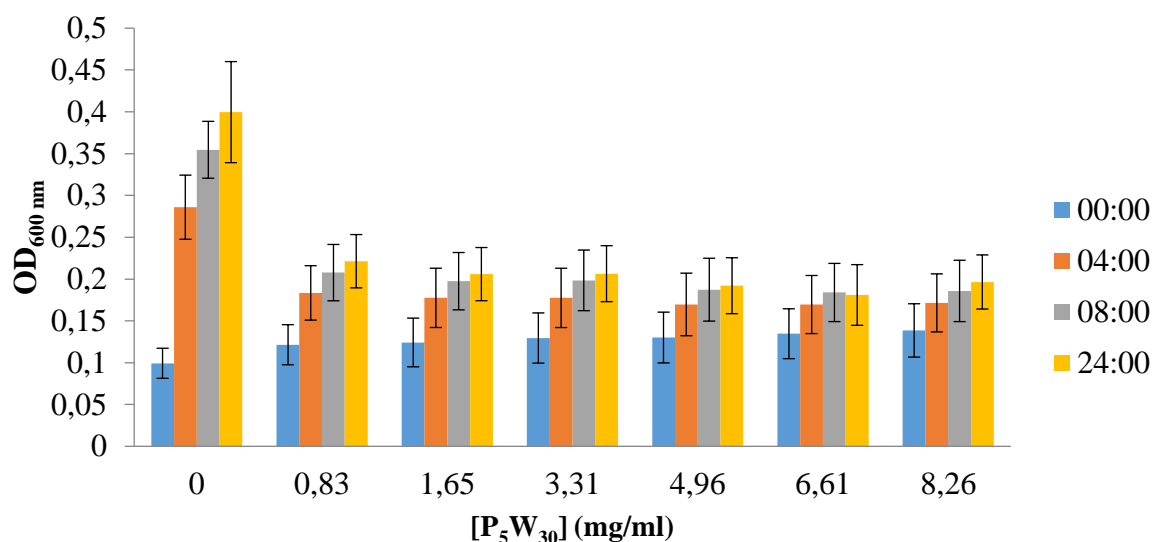


Figura 3.5 - Valores de OD_{600 nm} para a estirpe *S. aureus* ATCC 6538 na presença do composto P₅W₃₀, nas concentrações indicadas, durante 24 h. Os dados representam a média de três réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas (N=9). As barras representam o desvio padrão.

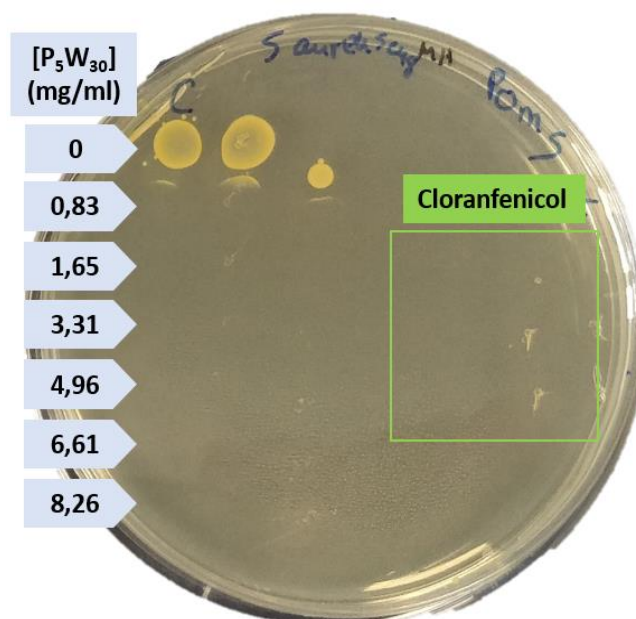


Figura 3.6 - Recuperação da viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538 após exposição a diferentes concentrações do composto P₅W₃₀ (gotas de 8 µl). As concentrações testadas do composto P₅W₃₀ são as indicadas. A zona delimitada a verde corresponde à zona de inoculação a partir dos poços com o antibiótico cloranfenicol (30 µg/ml). É possível observar a recuperação da culturabilidade das células controle © (ausência de qualquer agente antibacteriano).

O valor MIC reportado para o composto P₅W₃₀ por (Gumerova, *et al.*, 2018) para a estirpe de *S. aureus* ATCC 29213 foi de 16 µg/ml, um valor bastante inferior ao obtido no presente estudo.

As diferenças nos valores MIC entre o nosso estudo e o de Gumerova, *et al.*, (2018) estará relacionado com possíveis diferenças na suscetibilidade das estirpes testadas. Esta diferença entre os valores MIC obtidos nos dois estudos reforça a necessidade de determinar os valores MIC em várias estirpes. A estirpe testada (ATCC 6538) foi anteriormente utilizada em outro estudo com sete POTs com bismuto, verificando-se um valor MIC de 1,6 mg/ml, um valor superior ao aqui reportado para o nosso composto (Balici *et al.*, 2016).

A determinação dos valores MIC em estirpes MRSA foi igualmente realizada (Tabela 3.3). O valor MIC para as estirpes MRSA 15 e 16 foi de 3,31 mg/ml (400 μ M) e 4,96 mg/ml (600 μ M), respetivamente. A recuperação da viabilidade das células expostas ao composto P₅W₃₀ foi observada a partir de todas as concentrações testadas, pelo que o valor MBC será superior à concentração máxima estudada (i.e., 8,26 mg/ml, 1000 μ M). A suscetibilidade destas estirpes foi semelhante ao reportada para outras estirpes MRSA para diferentes POTs, exemplo do estudo de Yamase, *et al.*, (1996), onde foi reportado um valor de 3,2 mg/ml para o POT PW₁₂ nas estirpes SR 605 e ATCC 43300. Como seria de esperar, estas estirpes multirresistentes demonstraram-se menos suscetíveis a P₅W₃₀ que a bactéria de referência ATCC 6538. No entanto, no estudo conduzido por Balici, *et al.*, (2016) os valores MIC determinados de POTs com bismuto para estirpes MRSA foram iguais aos obtidos para a estirpe *S. aureus* ATCC 6538, 1,6 mg/ml (Balici *et al.*, 2016).

A estirpe MRSA 16 foi menos suscetível que a estirpe MRSA 15 ao composto P₅W₃₀, razão pela qual foi selecionada para estudos posteriores onde se realizou a combinação do composto P₅W₃₀ com antibióticos de forma a observar possíveis efeitos sinérgicos entre eles.

De modo a elucidar qual o papel do tungstato monomérico (WO₄²⁻) na ação antibacteriana, verifica-se na literatura, no estudo conduzido por Yamase (2006), que o tungstato não contribui para a ação antibacteriana de diferentes POTs, exemplo dos compostos PW₁₂ e As₄W₄₀, ao observar-se um valor MIC, para as estirpes MRSA SR 3605 e ATCC 43300, de 3,2 mg/ml e 0,4 mg/ml, respetivamente, ao invés do tungstato que foi de 102 mg/ml para ambas as estirpes (Yamase *et al.*, 1996). Foi também verificado que o tungstato, até à concentração estudada de 0,256 mg/ml, não demonstrou efeito antibacteriano contra estirpes de *Helicobacter pylori*, resistentes ao antibiótico metronidazol (Inoue *et al.*, 2005). Nestas estirpes de *H. pylori*, os POTs As₄W₄₀ e P₂W₁₈ apresentaram valores MIC entre 0,008 mg/ml – 0,032 mg/ml e 0,128 mg/ml – 0,256 mg/ml, respetivamente (Inoue *et al.*, 2005). Assim, podemos inferir que o efeito antibacteriano verificado para o composto P₅W₃₀, agora estudado nesta dissertação, não parece ocorrer devido à forma monomérica do tungstato.

Foi ainda determinado o valor MIC do composto P₅W₃₀ para a bactéria *S. pneumoniae* D39, contudo, não foi possível determinar um valor MIC para esta bactéria, embora pelo método de difusão em agar tivesse sido possível observar halos de inibição para esta bactéria, evidenciando alguma suscetibilidade ao composto P₅W₃₀ (valores de halos de inibição muito baixos) (Tabela 3.2; Tabela 3.3). Deste modo, consideramos esta bactéria resistente às concentrações estudadas do P₅W₃₀. A presença de cápsula na *S. pneumoniae* pode conferir a esta bactéria uma maior proteção contra o composto P₅W₃₀ em relação à bactéria *S. aureus*. A corroborar com os resultados do presente estudo, no estudo de Fukuda e Yamase (1997), foi observada a mesma resistência a diferentes POTs e POMos para outras estirpes de *S. pneumoniae*. De acordo com aqueles autores, apenas foi possível determinar os valores MICs para compostos POVs (ex. VO₄, V₁₀, Na₃VO₄ e VO₂SO₄), sugerindo como local de ação a membrana ou espaço intramembranar, tanto em estirpes de referência como em estirpes resistentes à penicilina. Os autores observaram ainda a morfologia das células bacterianas após exposição a estes POVs, concluindo que interferem com a divisão celular ao provocarem alongamento das células até à concentração igual ao valor MIC. Para concentrações acima do valor MIC observaram a lise celular com o consequente efeito bactericida (Fukuda & Yamase, 1997).

A combinação entre diferentes antimicrobianos tem sido adotada pela necessidade de resolver a lacuna de antibioterapia necessária para combater infecções provocadas por agentes patogénicos multirresistentes, sendo que novas combinações podem auxiliar como estratégias adjuvantes a serem exploradas como futuros antibióticos (Worthington & Melander, 2013). Perante o anteriormente descrito, determinaram-se os valores MIC do composto P₅W₃₀ em combinação com antibióticos utilizados na terapêutica, tendo como alvo a bactéria MRSA 16. De forma a estabelecer as resistências da estirpe aos antibióticos testados, os valores MIC para os antibióticos eritromicina, vancomicina, cefoxitina e cloranfenicol foram previamente determinados. Os valores MIC dos antibióticos observados para esta bactéria são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Valores MIC dos antibióticos para a bactéria MRSA 16. O perfil de resistência foi adotado dos valores de *breakpoints* referidos pela EUCAST (2019).

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC de referência de resistência ($\mu\text{g/ml}$) ¹	Interpretação ¹
Eritromicina (Macrólido)	$> 4 \pm 0,00$	> 2 ^{1;2}	Resistente
Vancomicina (Glicopéptido)	$> 4 \pm 0,00$	> 2	Resistente
Cefoxitina (Cefalosporina)	$4 \pm 0,00$	> 4 ^{1;3}	Suscetível
Cloranfenicol	$120 \pm 0,00$	> 8	Resistente

¹ – de acordo com EUCAST (2019); ²- o valor pode ser usado para determinar a suscetibilidade aos antibióticos azitromicina, claritromicina e roxitromicina; ³- acima deste valor a estirpe é considerada resistente, principalmente pela detecção do gene *mecA* ou *mecC*.

O valor MIC para o antibiótico cloranfenicol foi de 0,12 mg/ml. Para os restantes antibióticos as concentrações testadas não foram suficientes para a determinação do valor MIC, mas foram suficientes para concluirmos sobre a resistência da bactéria a estes antibióticos, de acordo com a tabela de *breakpoints* da EUCAST (2019). Ainda de acordo com as diretrizes da EUCAST (2019) podemos ainda inferir que: i) a resistência ao antibiótico eritromicina evidencia que a estirpe é igualmente resistente aos antibióticos azitromicina, claritromicina e roxitromicina; ii) a resistência ao antibiótico cefoxitina revela a possível presença do gene *mecA* ou *mecC* nesta estirpe (EUCAST, 2019).

Consoante o aumento da concentração da eritromicina, manteve-se o crescimento das populações bacterianas em estudo, demonstrando a prevalência de populações resistentes.

Para o antibiótico cefoxitina o valor MIC foi de 4 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.7) e por isso foi considerada suscetível a este antibiótico, embora esse valor se encontre no limite para a resistência (de acordo com as diretrizes de EUCAST, 2019).

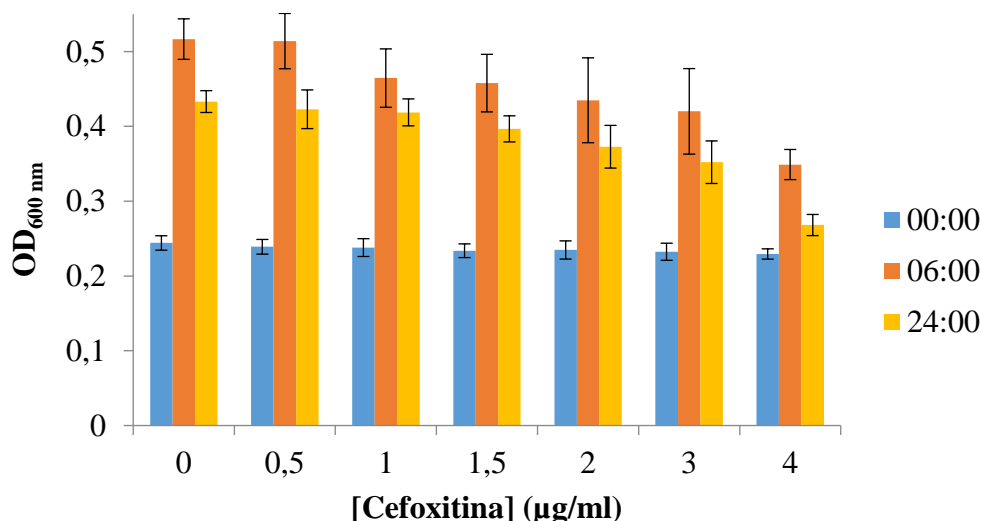


Figura 3.7 - Valores de OD_{600 nm} para a estirpe MRSA 16, na presença do antibiótico cefoxitina, nas concentrações referidas, durante 24 h. Os dados representam a média de três réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas (N=9). As barras representam o desvio padrão.

Após estabelecer-se os valores MIC para os antibióticos, prosseguiu-se com a avaliação da combinação de cinco concentrações do P₅W₃₀, nomeadamente 0,83 mg/ml (100 µM), 1,65 mg/ml (200 µM), 3,31 mg/ml (400 µM), 4,96 mg/ml (600 µM), 6,61 mg/ml (800 µM) e 8,26 mg/ml (1000 µM) e duas concentrações do antibiótico vancomicina, nomeadamente 0,5 µg/ml e 2 µg/ml e a combinação das mesmas concentrações do P₅W₃₀ e uma concentração do antibiótico cefoxitina, 2 µg/ml. Os valores MIC determinados, bem como o perfil de ação da combinação são demonstrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Valores MIC da combinação dos antibióticos vancomicina e cefoxitina com o composto P₅W₃₀.

	MIC (mg/ml)	Perfil da ação da combinação
P₅W₃₀ + vancomicina (0,5 µg/ml)	4,96 ± 0,00	Indiferente
P₅W₃₀ + vancomicina (2 µg/ml)	4,96 ± 0,00	Indiferente
P₅W₃₀ + cefoxitina (2 µg/ml)	< 0,83 ± 0,00	Sinérgico

As combinações do antibiótico vancomicina nas concentrações de 0,5 µg/ml e 2 µg/ml com o composto P₅W₃₀ não alteraram o valor MIC individual do composto (4,96 mg/ml), pelo que o perfil da ação combinada foi indiferente (Tabela 3.5).

A combinação do composto P₅W₃₀ com o antibiótico cefoxitina numa concentração de metade do valor MIC, em relação ao avaliado individualmente para este antibiótico, observou-se um perfil de ação combinada do tipo sinérgico, pois o valor MIC do composto P₅W₃₀ na combinação foi inferior a 0,83 mg/ml, ou seja, inferior ao valor MIC individual (4,96 mg/ml) (Figura 3.8; Tabela 3.5).

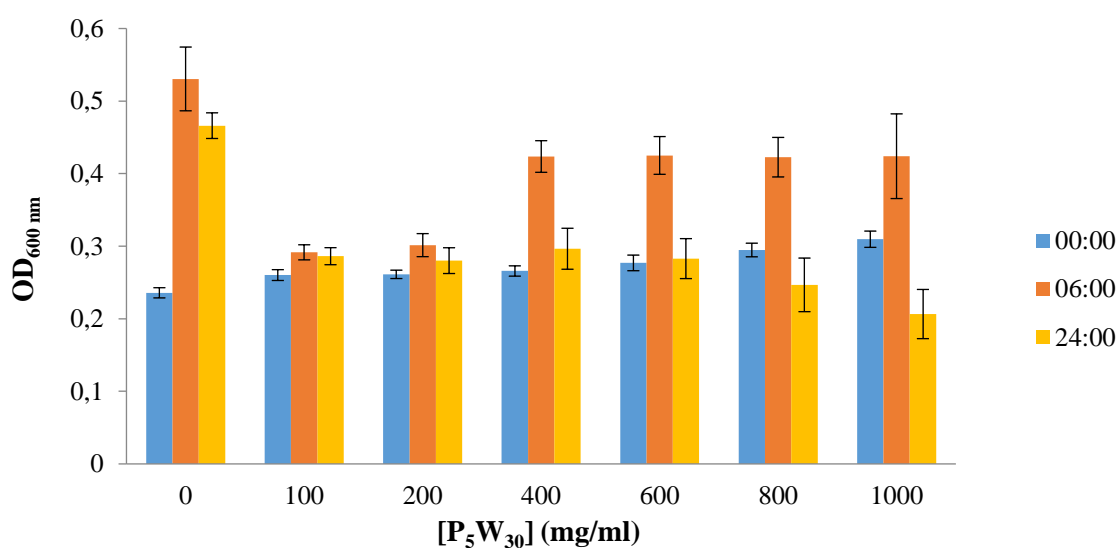


Figura 3.8 - Valores de OD_{600 nm} observados para a estirpe MRSA 16 na presença da combinação do antibiótico cefoxitina, na concentração de 2 µg/ml e o composto P₅W₃₀ nas concentrações indicadas, durante 24 h. Os dados representam a média de três réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas (N=9). As barras representam o desvio padrão.

De acordo com os valores de *breakpoints* referidos pela EUCAST (2019), é possível que a estirpe MRSA 16 seja portadora do gene *mecA* ou *mecC*, pois apesar de podermos considerar esta estirpe suscetível ao antibiótico cefoxitina, o valor MIC está no limite ($\leq 0,004$ mg/ml). A reversão da resistência à oxacilina por POMs já foi descrita em vários estudos (Fukuda *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2006; Yamase, 2013; Yamase *et al.*, 1996) nas quais se verificou inclusivamente uma diminuição na transcrição do gene *mecA* em bactérias pré-expostas, por cerca de 2-3 h, a diferentes POTs.

Embora no presente estudo não se tenham determinado valores MIC de bactérias Gram negativas pelo método de microdiluição, recorrendo ao estudo conduzido por Gumerova

(2018), verifica-se a determinação de um valor MIC para P₅W₃₀ de 1 µg/ml na bactéria *Moraxella catarrhalis*, verificando-se um valor bastante superior (64 vezes maior) para outro POT de carga e tamanho idênticos, embora com selênio em vez de fósforo na sua composição (Se₂W₂₉). Evidencia-se assim o efeito antibacteriano dependente da estrutura, forma e composição de POTs (Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018).

3.5 Determinação da Concentração Fracionária Inibitória (FIC) para o antibiótico cloranfenicol e o composto P₅W₃₀

De forma a determinar o tipo de ação da combinação do antibiótico cloranfenicol e o composto P₅W₃₀, para diferentes concentrações, tendo em conta o valor MIC individual de cada um dos compostos, foi realizado o método “*checkerboard*” referido anteriormente na seção 2.9 (Tabela 2.2), sendo os resultados apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Perfil da ação da combinação do composto P₅W₃₀ com o antibiótico cloranfenicol contra a estirpe MRSA 16 obtido pelo método “*checkerboard*”.

	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	ΣFIC	Interpretação
P₅W₃₀*	4,96 ± 0,00	> 8,263		
Cloranfenicol*	0,12 ± 0,00			Resistente
P₅W₃₀ + Cloranfenicol (0,01 a 0,24 µg/ml)	3,31 + 0,015 ± 0,00 + 0,00	>8,263 + >0,24	0,79 (0,667+0,125)	Aditivo ¹ Sinérgico ²

¹-De acordo com EUCAST ESCMID (2000); ²- De acordo com Fratini, *et al.*, (2017). * - Os valores MIC individuais dos compostos antibacterianos são incluídos na tabela de forma a facilitar a interpretação dos valores MIC na combinação.

O valor MIC em combinação, do composto P₅W₃₀ com o antibiótico cloranfenicol, foi de 3,31 mg/ml, ou seja, diminuiu cerca de ¹/₃, enquanto que o valor MIC do antibiótico cloranfenicol em combinação com o composto P₅W₃₀ decresceu de 0,12 mg/ml para 0,015 mg/ml, ou seja, observou-se uma diminuição de oito vezes no valor MIC do antibiótico cloranfenicol quando combinado. De acordo com o descrito na seção 2.5, a determinação dos valores FIC_{Preyssler} e FIC_{Cloranfenicol} resultou no valor de 0,667 e de 0,125, respetivamente (Equação 1, Equação 2 e Tabela 3.6). O valor ΣFIC, determinado pela Equação 3, foi de 0,79, pelo que o perfil da ação

da combinação é aditivo segundo a interpretação (EUCAST, ESCMID, 2000), mas de acordo com Fratini *et al.*, (2017) este valor indica uma ação sinérgica (Tabela 2.2).

O sinergismo que observamos no presente estudo, quer com o antibiótico cloranfenicol, quer com o antibiótico cefoxitina, não foi descrito em estudos anteriores (Tajima, 2005; Yamase *et al.*, 1996), os quais afirmam não ocorrer efeitos sinérgicos com outros antibióticos a não ser com β -lactâmicos.

3.6 Inibição da Ca^{2+} -ATPase e efeito antibacteriano

Após os resultados expostos, são verificados efeitos tanto da inibição do composto P_5W_{30} na Ca^{2+} -ATPase, bem como o efeito antibacteriano em diferentes bactérias Gram positivas e Gram negativas. Uma vez que a Ca^{2+} -ATPase é um elemento essencial para procariontes, um efeito antibacteriano, bem como a diminuição de resistências em bactérias, pode estar associado à presença de um inibidor da Ca^{2+} -ATPase. No entanto, recentemente foi verificado precisamente o contrário, isto é, três POVs inibidores desta enzima mostraram uma correlação inversa com a inibição do crescimento da bactéria Gram negativa *E. coli* (Marques-da-Silva *et al.*, 2019). Em relação aos POTs, no estudo conduzido por Gumerova (2018) não correlacionam o IC_{50} da Ca^{2+} -ATPase e o valor MIC, mas sim a carga do POT (quando inferior a -12 e com o número de átomos de tungstênio inferior a 22) com o valor MIC para a bactéria Gram negativa *M. catarrhalis*, sendo que os de carga inferior (-8 a -6) apresentaram um valor MIC menor (Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018). Para POTs maiores, como o caso do aqui estudado P_5W_{30} e o POT Se_2W_{29} , ambos de carga e estrutura idêntica, não parece haver uma correlação entre o valor MIC da estirpe *M. catarrhalis* e o IC_{50} da Ca^{2+} -ATPase pois o IC_{50} do primeiro foi aqui determinado como superior ao do segundo POT (0,4 μM e 0,3 μM , respectivamente), mas o seu MIC nesta bactéria Gram negativa foi determinado por Gumerova *et al.*, (2018) como sendo 64 vezes inferior ao do POT Se_2W_{29} (Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018).

Não obstante, esta correlação, entre a inibição da Ca^{2+} -ATPase e o efeito antibacteriano pode ser equacionada para bactérias Gram positivas, pela diferente estrutura da superfície celular, i.e., ausência de membrana externa. No entanto seriam necessários mais testes com bactérias e POTs para elucidar sobre esta possível correlação.

4. Conclusões

4.1 Conclusões

Com este estudo verificamos que o P_5W_{30} tem um efeito inibidor na atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase. O tipo de interação é misto, ou seja, competitivo (ao ligar-se ao local ativo) e não competitivo (ao ligar-se em outro local que não o de ligação do substrato). Para interagir com o local ativo este composto tem de ultrapassar a membrana das VRS. Uma vez que não afeta a atividade basal da enzima, não se sugere desestabilizador da membrana das VRS. Em paralelo, os estudos de suscetibilidade bacteriana demonstraram resultados positivos em bactérias Gram positivas bem como em bactérias Gram negativas. Foram determinados valores MIC de P_5W_{30} para a bactéria *S. aureus* e também em estirpes multirresistentes, nomeadamente MRSA 15 e 16. A combinação P_5W_{30} com antibióticos como a cefoxitina e cloranfenicol revelou um perfil de ação sinérgico para a estirpe MRSA 16.

Sendo o ião cálcio importante na homeostasia de procariontes, a inibição da Ca^{2+} -ATPase da membrana celular poderá contribuir para o efeito antibacteriano verificado, bem como para a reversão da suscetibilidade de determinadas bactérias multirresistentes.

4.2 Perspetivas Futuras

A elaboração de um trabalho incita, durante o percurso até à sua realização, dúvidas que não se colocam inicialmente pelos objetivos delimitados à priori. Deste modo, após o término deste trabalho, tanto pelos ensaios com a enzima Ca^{2+} -ATPase, bem como pela avaliação da suscetibilidade bacteriana ao composto P_5W_{30} em diferentes bactérias, seria importante em trabalhos futuros elucidar alguns aspetos, tais como:

- 1- Ensaio de estabilidade do composto P_5W_{30} com período de incubação com as VRS previamente ao estudo do efeito do composto na atividade da Ca^{2+} -ATPase;
- 2- Ensaio da possível decomposição do composto P_5W_{30} com período de incubação no meio utilizado para o ensaio da Ca^{2+} -ATPase, sem incubação das VRS;
- 3- Os ensaios realizados com a bactéria *S. pneumoniae* D39 demonstraram um efeito na suscetibilidade via difusão agar (embora com halos de inibição menores que os observados para a bactéria *S. aureus*), mas não foi possível obter um valor MIC para esta bactéria. Uma vez que esta bactéria apresenta cápsula e que estão documentadas mais de 90 serovares e algumas delas não apresentam cápsula, mas são todavia virulentas (Keller, Bradshaw, Pipkins, & McDaniel, 2016), seria pois importante a

realização de ensaios com estas estirpes de modo a verificar se existem ou não diferenças na inibição do crescimento destas bactérias pelo composto condicionado por esta barreira;

- 4- Na avaliação da combinação do composto P₅W₃₀ com os demais antibióticos utilizados na terapêutica, observou-se o efeito sinérgico deste em combinação com o antibiótico cefoxitina numa concentração de 2 µg/ml contra a bactéria MRSA 16. Uma vez que o MIC desta bactéria para a cefoxitina se encontra no limite de resistência de acordo com os valores *breakpoints* da EUCAST (2019), esta estirpe pode apresentar os genes *mecA* ou *meC*. Deste modo, podemos comparar o nosso resultado com o reportado na literatura e explorar a eventual capacidade do nosso POT também promover a inibição da transcrição destes genes e por sua vez afetar a resistência da bactéria ao antibiótico cefoxitina;
- 5- Como foi determinado anteriormente um valor MIC deste composto para a bactéria Gram negativa *M. catarrhalis* (Gumerova, Al-Sayed, *et al.*, 2018), seria importante determinar valores MIC para as bactérias Gram negativas que se demonstraram neste trabalho susceptíveis a este composto no método de difusão em agar;
- 6- Avaliar o efeito de P₅W₃₀ na percepção de quórum com a bactéria biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 , bem como os efeitos na aderência e virulência que este composto possa apresentar.

5. Referências

- Achim, M., Peters, F., Pope, M. T., & Gatteschi, D. (1998). *Polyoxometalates: Very Large Clusters/Nanoscale Magnets*. <https://doi.org/10.1021/CR9603946>
- Ahern, G. P., Junankar, P. R., Pace, S. M., Curtis, S., Mould, J. A., & Dulhunty, A. F. (1999). Effects of ivermectin and midecamycin on ryanodine receptors and the Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum of rabbit and rat skeletal muscle. *The Journal of physiology*, *514* (Pt 2), 313–326.
- Alizadeh, Mohammed Harmalker, S., Jeannin, Y., Frere, J., & Pope, M. (1985). A heteropolyanion with fivefold molecular symmetry that contains a nonlabile encapsulated sodium ion. *The structure and chemistry of [NaP₅W₃₀O₁₁₀]¹⁴⁻*.
- Arefian, M., Mirzaei, M., Eshtiagh-Hosseini, H., & Frontera, A. (2017). A survey of the different roles of polyoxometalates in their interaction with amino acids, peptides and proteins. *Dalton Transactions*, *46*(21), 6812–6829. <https://doi.org/10.1039/C7DT00894E>
- Aubier, M., & Viires, N. (1998). Calcium ATPase and respiratory muscle function. *The European respiratory journal*, *11*(3), 758–766.
- Aureliano, M. (1996). *Transdução e conjugação energética na Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático : interacção de vanadatos*. Fac. de Ciências e Tecnologia de Coimbra.
- Aureliano, M., Henao, F., Tiago, T., Duarte, R. O., Moura, J. J. G., Baruah, B., & Crans, D. C. (2008). Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase Is Inhibited by Organic Vanadium Coordination Compounds: Pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an Amavadinine Analogue. *Inorganic Chemistry*, *47*(13), 5677–5684. <https://doi.org/10.1021/ic702405d>
- Ayass, W. W., Fodor, T., Lin, Z., Smith, R. M., Xing, X., Abdallah, K., Tóth, I., Zékány, L., Pascual-Borràs, M., Rodríguez-Forteza, A., Poblet, J., Fan, L., Cao, J., Keita, B., Ullrich, M. (2016). Synthesis, Structure, and Antibacterial Activity of a Thallium(III)-Containing Polyoxometalate, [Tl₂{B-β-SiW₈O₃₀(OH)}₂]¹²⁻. *Inorganic Chemistry*, *55*(20), 10118–10121. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01921>
- Bajaksouzian, S., Visalli, M. A., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. (1997). Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters as determined by checkerboard and time-kill studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *41*(5), 1073–1076. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.5.1073>
- Balici, S., Niculae, M., Pall, E., Rusu, M., Rusu, D., & Matei, H. (2016). Antibiotic-Like Behaviour of Polyoxometalates. In vitro comparative study: seven polyoxotungstates-nine antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria. *Revista de chimie*, *67*(3), 485–490.
- Bartolommei, G., Tadini-Buoninsegni, F., Hua, S., Moncelli, M. R., Inesi, G., & Guidelli, R. (2006). Clotrimazole Inhibits the Ca²⁺-ATPase (SERCA) by Interfering with Ca²⁺ Binding and Favoring the E₂ Conformation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(14), 9547–9551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510550200>
- Bassetti, M., Carnelutti, A., & Peghin, M. (2017). Patient specific risk stratification for antimicrobial resistance and possible treatment strategies in gram-negative bacterial infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, *15*(1), 55–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1251840>

- Belizário, J. E., Faintuch, J., & Garay-Malpartida, M. (2018). Gut Microbiome Dysbiosis and Immunometabolism: New Frontiers for Treatment of Metabolic Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/2037838>
- Berkelman, T., Garret-Englele, P., & Hoffman, N. E. (1994). The *pacL* gene of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 encodes a Ca(2+)-transporting ATPase. *Journal of bacteriology*, 176(14), 4430–4436. <https://doi.org/10.1128/jb.176.14.4430-4436.1994>
- Bhattacharyya, D., & Sen, P. C. (1999). The effect of binding of chlorpromazine and chloroquine to ion transporting ATPases. *Molecular and cellular biochemistry*, 198(1–2), 179–185.
- Biemer, J. J. (1973). *Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method*.
- Bijelic, A., Aureliano, M., & Rompel, A. (2018). The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 54(10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>
- Bijelic, A., & Rompel, A. (2015). The use of polyoxometalates in protein crystallography - An attempt to widen a well-known bottleneck. *Coordination chemistry reviews*, 299, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.03.018>
- Bijelic, A., & Rompel, A. (2018). Polyoxometalates: more than a phasing tool in protein crystallography. *ChemTexts*, 4(3), 10. <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0064-1>
- Bilmen, J G, Khan, S. Z., Javed, M. H., & Michelangeli, F. (2001). Inhibition of the SERCA Ca²⁺ pumps by curcumin. Curcumin putatively stabilizes the interaction between the nucleotide-binding and phosphorylation domains in the absence of ATP. *European journal of biochemistry*, 268(23), 6318–6327.
- Bilmen, Jonathan G, Wootton, L. L., & Michelangeli, F. (2002). The inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by macrocyclic lactones and cyclosporin A. *The Biochemical journal*, 366(Pt 1), 255–263. <https://doi.org/10.1042/BJ20020431>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 1–12. <https://doi.org/10.1086/595011>
- Brandt, P. C., & Vanaman, T. C. (1996). The plasma membrane calcium pump: not just another pretty ion translocase. *Glycobiology*, 6(7), 665–668.
- Bublitz, M., Morth, J. P., & Nissen, P. (2011). P-type ATPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(15), 2515–2519. <https://doi.org/10.1242/jcs.088716>
- Bush, L. M., Calmon, J., Cherney, C. L., Wendeler, M., Pitsakis, P., Poupard, J., Levison, M., Johnson, C. C. (1989). High-Level Penicillin Resistance among Isolates of Enterococci. *Annals of Internal Medicine*, 110(7), 515–520. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-110-7-515>
- Carafoli, E. (1982). *The Regulation of Intracellular Calcium*. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4259-5_51
- Chermann, J. C., Raynaud, M., Jasmin, C., & Mathé, G. (1970). Powerful new inhibitor of

- murine leukaemia and sarcoma viruses. *Nature*, 227(5254), 173–174. <https://doi.org/10.1038/227173A0>
- Clemente-Juan, J. M., Coronado, E., & Gaita-Ariño, A. (2012). Magnetic polyoxometalates: from molecular magnetism to molecular spintronics and quantum computing. *Chemical Society Reviews*, 41(22), 7464–7478. <https://doi.org/10.1039/c2cs35205b>
- CLSI. (2006). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.
- D’Elia, J. A., & Weinrauch, L. A. (2018). Calcium Ion Channels: Roles in Infection and Sepsis Mechanisms of Calcium Channel Blocker Benefits in Immunocompromised Patients at Risk for Infection. *International journal of molecular sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19092465>
- Daima, H. K., Selvakannan, P. R., Kandjani, A. E., Shukla, R., Bhargava, S. K., & Bansal, V. (2014). Synergistic influence of polyoxometalate surface corona towards enhancing the antibacterial performance of tyrosine-capped Ag nanoparticles. *Nanoscale*, 6(2), 758–765. <https://doi.org/10.1039/C3NR03806H>
- de Meis, L. (2001). Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Regulation by ADP. *The Journal of biological chemistry*, 276(27), 25078–25087. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103318200>
- de Meis, L., & Vianna, A. L. (1979). Energy Interconversion by the Ca²⁺-Dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 48(1), 275–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.001423>
- DGS. (2018). *Infeções e Resistências aos Antimicrobianos 2018 - Relatório Anual do Programa Prioritário*.
- Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.08.031>
- Domínguez, D. C., Guragain, M., & Patrauchan, M. (2015). Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*, 57(3), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.006>
- Dufaud, V., & Lefebvre, F. (2010). Inorganic Hybrid Materials with Encapsulated Polyoxometalates. *Materials*, 3(1), 682–703. <https://doi.org/10.3390/ma3010682>
- Durão, P., Balbontín, R., & Gordo, I. (2018). Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, 26(8), 677–691. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.005>
- ECDC. (2018). *Antimicrobial consumption - Annual Epidemiological Report for 2017*.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., van Goethem, I. D. A., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., ... Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature*, 424(6951), 957–961. <https://doi.org/10.1038/nature01813>
- EUCAST. (2019). *No TitleThe European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 9.0*.
- EUCAST ESCMID. (2000). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial

- Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCM). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 6(9), 503–508. <https://doi.org/10.1046/J.1469-0691.2000.00149.X>
- Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Formatex Research Center*, 2.
- Faleiro, M. L., & Miguel, M. (2013). Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. In Fighting Multidrug Resistance With herbal Extracts, Essential Oils And Their Components. Em M. K. R. and K. Kon (Ed.), *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components* (pp. 65–94). Elsevier, Academic Press, USA.
- Farzana, R., Iqra, P., & Hunaiza, T. (2018). Antioxidant and antimicrobial effects of polyoxometalates. *Microbiology: Current Research*, 02. <https://doi.org/10.4066/2591-8036.18-186>
- Faxén, K., Andersen, J. L., Gourdon, P., Fedosova, N., Morth, J. P., Nissen, P., & Møller, J. V. (2011). Characterization of a *Listeria monocytogenes* Ca²⁺ Pump. *Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1609–1617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176784>
- Feldman, C., & Anderson, R. (2014). Recent advances in our understanding of Streptococcus pneumoniae infection. *F1000Prime Reports*, 6(82), 82. <https://doi.org/10.12703/P6-82>
- Fersht, A. (2017). *Structure and Mechanism in Protein Science*. <https://doi.org/10.1142/10574>
- Fiers, W. D., Craighead, M., & Singh, I. (2017). Teixobactin and Its Analogues: A New Hope in Antibiotic Discovery. *ACS Infectious Diseases*, 3(10), 688–690. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00108>
- Fiorani, G., Saoncella, O., Kaner, P., Altinkaya, A., Bonchio, M., Carraro, M., Figoli, A. (2014). Chitosan-Polyoxometalate Nanocomposites: Synthesis, Characterization and Application as Antimicrobial Agents. *J Clust Sci*, 25, 839–854. <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0685-x>
- Fishovitz, J., Hermoso, J. A., Chang, M., & Mobashery, S. (2014). Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *IUBMB life*, 66(8), 572–577. <https://doi.org/10.1002/iub.1289>
- Fraqueza, G. (2013). *Interação de oxometalatos de vanádio, nióbio, tungstênio e molibdênio com a Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático: um alvo de ação de fármaco*.
- Fraqueza, G., Ohlin, C. A., Casey, W. H., & Aureliano, M. (2012). Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interactions with decanobate, decavanadate, vanadate, tungstate and molybdate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 107(1), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.10.010>
- Fratini, F., Mancini, S., Turchi, B., Friscia, E., Pistelli, L., Giusti, G., & Cerri, D. (2017). A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiological Research*, 195, 11–17. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.11.005>
- Fu, D. Y., Zhang, S., Qu, Z., Yu, X., Wu, Y., & Wu, L. (2018). Hybrid Assembly toward

- Enhanced Thermal Stability of Virus-like Particles and Antibacterial Activity of Polyoxometalates. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(7), 6137–6145. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17082>
- Fu, L., Gao, H., Yan, M., Li, S., Li, X., Dai, Z., & Liu, S. (2015). Polyoxometalate-Based Organic-Inorganic Hybrids as Antitumor Drugs. *Small*, 11(24), 2938–2945. <https://doi.org/10.1002/sml.201500232>
- Fukuda, N., & Yamase, T. (1997). In Vitro Antibacterial Activity of Vanadate and Vanadyl Compounds against *Streptococcus pneumoniae*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20(8), 927–930. <https://doi.org/10.1248/bpb.20.927>
- Fukuda, N., Yamase, T., & Tajima, Y. (1999). Inhibitory effect of polyoxotungstates on the production of penicillin-binding proteins and beta-lactamase against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 22(5), 463–470.
- Geisler, M., Koenen, W., Richter, J., & Schumann, J. (1998). Expression and characterization of a *Synechocystis* PCC 6803 P-type ATPase in *E. coli* plasma membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 1368(2), 267–275. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00193-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00193-4)
- Geng, Y., & Lotz, M. (1995). Increased intracellular Ca²⁺ selectively suppresses IL-1-induced NO production by reducing iNOS mRNA stability. *The Journal of cell biology*, 129(6), 1651–1657.
- Goss, C. H., Kaneko, Y., Khuu, L., Anderson, G. D., Ravishankar, S., Aitken, M. L., Lechtzin, N., Zhou, G., Czyz, D., McLean, K., Olakanmi, O., Shuman, H., Teresi, M., Wilhelm, E., Caldwell, E., Salipante, S., Hornick, D., Siehnel, R., Becker, L., Britigan, B., Singh, P. K. (2018). Gallium disrupts bacterial iron metabolism and has therapeutic effects in mice and humans with lung infections. *Science Translational Medicine*, 10(460), eaat7520. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat7520>
- Goy, R. C., Britto, D. de, & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Grama, L., Man, A., Muntean, D.-L., Andrei, Șerban, Florea, G., Boda, F., & Curticăpean, A. (2014). Antibacterial activity of some saturated polyoxotungstates Activitatea antibacteriană a unor compuși polioxowolframici. *Revista Română de Medicină de Laborator*, 22(1). <https://doi.org/10.2478/rrlm-2014-0007>
- Grösch, S., Maier, T. J., Schiffmann, S., & Geisslinger, G. (2006). Cyclooxygenase-2 (COX-2)–Independent Anticarcinogenic Effects of Selective COX-2 Inhibitors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 98(11), 736–747. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj206>
- Gu, J., Zhang, L., Yuan, X., Chen, Y.-G., Gao, X., & Li, D. (2018). Synthesis and Antibacterial Activity of Polyoxometalates with Different Structures. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/9342326>
- Gumerova, N., Al-Sayed, E., Krivosudský, L., Čipčić-Paljetak, H., Verbanac, D., & Rompel, A. (2018). Antibacterial Activity of Polyoxometalates Against *Moraxella catarrhalis*. *Frontiers in chemistry*, 6, 336–345. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00336>
- Gumerova, N., Krivosudský, L., Fraqueza, G., Breibeck, J., Al-Sayed, E., Tanuhadi, E., Bijelic, A., Fuentes, J., Aureliano, M., Rompel, A. (2018). The P-type ATPase inhibiting potential of polyoxotungstates. *Metallomics: integrated biometal science*, 10(2), 287–295. <https://doi.org/10.1039/c7mt00279c>

- Gunes, H., Gulen, D., Mutlu, R., Gumus, A., Tas, T., & Topkaya, A. E. (2016). Antibacterial effects of curcumin. *Toxicology and Industrial Health*, 32(2), 246–250. <https://doi.org/10.1177/0748233713498458>
- Gupta, H. K., Shrivastava, S., & Sharma, R. (2017). A Novel Calcium Uptake Transporter of Uncharacterized P-Type ATPase Family Supplies Calcium for Cell Surface Integrity in *Mycobacterium smegmatis*. *mBio*, 8(5), e01388-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01388-17>
- Haider, A., Zarschler, K., Joshi, S. A., Smith, R. M., Lin, Z., Mougharbel, A. S., Herzog, U., Müller, C., Stephan, H., Kortz, U., (2018). Preyssler-Pope-Jeannin Polyanions $[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{14-}$ and $[\text{AgP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{14-}$: Microwave-Assisted Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 644(14), 752–758. <https://doi.org/10.1002/zaac.201800113>
- Häsler, R., Kautz, C., Rehman, A., Podschun, R., Gassling, V., Brzoska, P., Sherlock, J., Gräsner, J., Hoppenstedt, G., Schubert, S., Ferlinz, A., Lieb, W., Laudes, M., Heinsen, F., Scholz, J., Harmsen, D., Franke, A., Eisend, S., Kunze, T., Fickenscher, H., Ott, S., Rosenstiel, P., Schreiber, S. (2018). The antibiotic resistome and microbiota landscape of refugees from Syria, Iraq and Afghanistan in Germany. *Microbiome*, 6(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0414-7>
- Hayashi, A., Wihadi, M. N. K., Ota, H., López, X., Ichihashi, K., Nishihara, S., Inoue, K., Tsunoji, N., Sano, T., Sadakane, M., (2018). Preparation of Preyssler-type Phosphotungstate with One Central Potassium Cation and Potassium Cation Migration into the Preyssler Molecule to form Di-Potassium-Encapsulated Derivative. *ACS Omega*, 3(2), 2363–2373. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00163>
- Hodges, N. A., & Hanlon, G. W. (1991). Detection and measurements of combined biocide action. Denyer SP, Hugo WB, eds. *Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation. Detection and Measurement of combined biocide action. Technical series of the Society for Applied Bacteriology.*, 297–310.
- Inoue, M., Segawa, K., Matsunaga, S., Matsumoto, N., Oda, M., & Yamase, T. (2005). Antibacterial activity of highly negative charged polyoxotungstates, K27[KAs4W4O140] and K18[KSb9W21O86], and Keggin-structural polyoxotungstates against *Helicobacter pylori*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5), 1023–1031. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.01.010>
- Inoue, M., Suzuki, T., Fujita, Y., Oda, M., Matsumoto, N., & Yamase, T. (2006). Enhancement of antibacterial activity of β -lactam antibiotics by $[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}]^{6-}$, $[\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$, and $[\text{PTi}_2\text{W}_{10}\text{O}_{40}]^{7-}$ against methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(7), 1225–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.02.004>
- Inouye, Y., Tokutake, Y., Yoshida, T., Seto, Y., Hujita, H., Dan, K., Yamamoto, A., Nishiya, S., Yamase, T., Nakamura, S. (1993). In vitro antiviral activity of polyoxomolybdates. Mechanism of inhibitory effect of PM-104 $(\text{NH}_4)_{12}\text{H}_2(\text{Eu}_4(\text{MoO}_4(\text{H}_2\text{O})_{16}(\text{Mo}_7\text{O}_{24})_4) \cdot 13\text{H}_2\text{O}$ on human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Research*, 20(4), 317–331. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(93\)90075-T](https://doi.org/10.1016/0166-3542(93)90075-T)
- Institute of Medicine. (2011). *What You Need to Know About Infectious Disease*. <https://doi.org/10.17226/13006>

- Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M. T. G., Coleman, D., Goering, R., Philip, M., Skov, R.L., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B., Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John, J.F., Daum, R., Soderquist, B., Buist, G., International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). (2012). Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(10), 4997–4999. <https://doi.org/10.1128/AAC.01199-12>
- Jing, B., Hutin, M., Connor, E., Cronin, L., & Zhu, Y. (2013). Polyoxometalate macroion induced phase and morphology instability of lipid membrane. *Chemical Science*, 4(10), 3818. <https://doi.org/10.1039/c3sc51404h>
- Johnson, A. J., Hsu, A.-L., Lin, H.-P., Song, X., & Chen, C.-S. (2002). The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *The Biochemical journal*, 366(Pt 3), 831–837. <https://doi.org/10.1042/BJ20020279>
- Keller, L. E., Bradshaw, J. L., Pipkins, H., & McDaniel, L. S. (2016). Surface Proteins and Pneumolysin of Encapsulated and Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* Mediate Virulence in a Chinchilla Model of Otitis Media. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00055>
- Kobayashi, D., Nakahara, H., Shibata, O., Unoura, K., & Nabika, H. (2017). Interplay of Hydrophobic and Electrostatic Interactions between Polyoxometalates and Lipid Molecules. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(23), 12895–12902. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b01774>
- Kodavanti, P. R., Cameron, J. A., Yallapragada, P. R., & Desai, D. (1990). Effect of chlordecone (Kepone) on calcium transport mechanisms in rat heart sarcoplasmic reticulum. *Pharmacology & toxicology*, 67(3), 227–234.
- Kubo, A.-L., Kremer, L., Herrmann, S., Mitchell, S. G., Bondarenko, O. M., Kahru, A., & Streb, C. (2017). Antimicrobial Activity of Polyoxometalate Ionic Liquids against Clinically Relevant Pathogens. *ChemPlusChem*, 82(6), 867–871. <https://doi.org/10.1002/cplu.201700251>
- LaRosa, S. P., & Opal, S. M. (2008). Sepsis Strategies in Development. *Clinics in Chest Medicine*, 29(4), 735–747. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2008.06.007>
- Lee, S.-Y., Fiene, A., Li, W., Hanck, T., Brylev, K. A., Fedorov, V. E., Lecka, J., Haider, A., Pietzsch, H., Zimmermann, H., Sévigny, J., Kortz, U., Stephan, H., Müller, C. E. (2015). Polyoxometalates—Potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 93(2), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.11.002>
- Li, J., Chen, Z., Zhou, M., Jing, J., Li, W., Wang, Y., Wu, L., Wang, L., Wang, Y., Lee, M. (2016). Polyoxometalate-Driven Self-Assembly of Short Peptides into Multivalent Nanofibers with Enhanced Antibacterial Activity. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(7), 2592–2595. <https://doi.org/10.1002/anie.201511276>
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T., Hughes, D., Epstein, S., Millett, W., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V., Cohen, D., Felix, C., Fetterman, K. A., Nitti, A., Zullo, A., Chen, Chao., Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535),

455–459. <https://doi.org/10.1038/nature14098>

- Liu, H., Zou, Y.-L., Zhang, L., Liu, J.-X., Song, C.-Y., Chai, D.-F., Gao, G., Qiu, Y.-F. (2014). Polyoxometalate cobalt–gatifloxacin complex with DNA binding and antibacterial activity. *Journal of Coordination Chemistry*, 67(13), 2257–2270. <https://doi.org/10.1080/00958972.2014.940923>
- Logan-Smith, M. J., Lockyer, P. J., East, J. M., & Lee, A. G. (2001). Curcumin, a Molecule That Inhibits the Ca²⁺-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum but Increases the Rate of Accumulation of Ca²⁺. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 46905–46911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108778200>
- Mahalingam, D., Peguero, J., Cen, P., Allgood, V., Shazer, R., & Campos, L. (2017). Mipsagargin, a PSMA-directed prodrug, provides clinical benefit in patients with advanced sorafenib-refractory hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 66(1), S207. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(17\)30711-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(17)30711-0)
- Marques-da-Silva, D., Fraqueza, G., Lagoa, R., Vannathan, A. A., Mal, S. S., & Aureliano, M. (2019). Polyoxovanadate inhibition of *Escherichia coli* growth shows a reverse correlation with Ca²⁺-ATPase inhibition. *New Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01208G>
- Marques, M. P. M., Gianolio, D., Ramos, S., Batista de Carvalho, L. A. E., & Aureliano, M. (2017). An EXAFS Approach to the Study of Polyoxometalate–Protein Interactions: The Case of Decavanadate–Actin. *Inorganic Chemistry*, 56(18), 10893–10903. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01018>
- Matono, T., Nagashima, M., Mezaki, K., Motohashi, A., Kutsuna, S., Hayakawa, K., Ohmagari, N., Kaku, M. (2018). Molecular epidemiology of β-lactamase production in penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* under high-susceptibility conditions. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 24(2), 153–155. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.10.014>
- Mintz, E., & Guillain, F. (1997). Ca²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochimica et biophysica acta*, 1318(1–2), 52–70.
- Missina, J. M., Gavinho, B., Postal, K., Santana, F. S., Valdameri, G., de Souza, E. M., Hughes, D., Ramirez, M., Soares, J., Nunes, G. G. (2018). Effects of Decavanadate Salts with Organic and Inorganic Cations on *Escherichia coli*, *Giardia intestinalis*, and Vero Cells. *Inorganic Chemistry*, 57(19), 11930–11941. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01298>
- Moreno, I., Norambuena, L., Maturana, D., Toro, M., Vergara, C., Orellana, A., Zurita-Silva, A., Ordenes, V. R. (2008). AtHMA1 Is a Thapsigargin-sensitive Ca²⁺/Heavy Metal Pump. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9633–9641. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800736200>
- Ni, L., Greenspan, P., Gutman, R., Kelloes, C., Farmer, M. A., & Boudinot, F. D. (1996). Cellular localization of antiviral polyoxometalates in J774 macrophages. *Antiviral Research*, 32(3), 141–148. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(95\)00988-4](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(95)00988-4)
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1–1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- OMS. (2017). WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research,

discovery, and development of new antibiotics. *WHO*.

- Opal, S. M., Garber, G. E., LaRosa, S. P., Maki, D. G., Freebairn, R. C., Kinasewitz, G. T., Dhainaut, J., Yan, S., Williams, M., Graham, D., Nelson, D., Levy, H., Bernard, G., (2003). Systemic Host Responses in Severe Sepsis Analyzed by Causative Microorganism and Treatment Effects of Drotrecogin Alfa (Activated). *Clinical Infectious Diseases*, 37(1), 50–58. <https://doi.org/10.1086/375593>
- Orgad, O., Oren, Y., Walker, S. L., & Herzberg, M. (2011). The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. *Biofouling*, 27(7), 787–798. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.603145>
- Plattner, H., & Verkhatsky, A. The ancient roots of calcium signalling evolutionary tree. , 57 *Cell Calcium* § (2015).
- Plattner, H., & Verkhatsky, A. (2016). Inseparable tandem: evolution chooses ATP and Ca²⁺ to control life, death and cellular signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0419>
- Pope, M. T., & Kortz, U. (2012). Polyoxometalates. Em *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0185.pub2>
- Portilla-Zúñiga, O., Sathicq, Á., Martínez, J., Rojas, H., De Geronimo, E., Luque, R., Romanelli, G. (2018). Novel Bifunctional Mesoporous Catalysts Based on Preyssler Heteropolyacids for Green Pyrrole Derivative Synthesis. *Catalysts*, 8(10), 419. <https://doi.org/10.3390/catal8100419>
- Pradeep, C. P., Long, D.-L., & Cronin, L. (2010). Cations in control: crystal engineering polyoxometalate clusters using cation directed self-assembly. *Dalton Transactions*, 39(40), 9443. <https://doi.org/10.1039/c0dt00325e>
- Raeymaekers, L., Wuytack, E., Willems, I., Michiels, C. W., & Wuytack, F. (2002). Expression of a P-type Ca(2+)-transport ATPase in *Bacillus subtilis* during sporulation. *Cell calcium*, 32(2), 93.
- Ramos, S., Moura, J. J. G., & Aureliano, M. (2012). Recent advances into vanadyl, vanadate and decavanadate interactions with actin. *Metallomics*, 4(1), 16–22. <https://doi.org/10.1039/C1MT00124H>
- Rappas, M., Niwa, H., & Zhang, X. (2004). Mechanisms of ATPases - A Multi-Disciplinary Approach. *Current Protein and Peptide Science*, 5(2), 89–105. <https://doi.org/10.2174/1389203043486874>
- Relman, D. A., & Lipsitch, M. (2018). Microbiome as a tool and a target in the effort to address antimicrobial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(51), 12902–12910. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717163115>
- Rosch, J. W., Sublett, J., Gao, G., Wang, Y.-D., & Tuomanen, E. I. (2008). Calcium efflux is essential for bacterial survival in the eukaryotic host. *Molecular Microbiology*, 70(2), 435–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06425.x>
- Rozenbaum, W., Dormont, D., Spire, B., Vilmer, E., Gentilini, M., Griscelli, C., Montagnier, L., Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. (1985). Antimoniotungstate (HPA 23) treatment of three patients with aids and one with prodrome. *The Lancet*, 325(8426), 450–451. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)91162-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)91162-6)

- Sagara, Y., & Inesi, G. (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *The Journal of biological chemistry*, 266(21), 13503–13506.
- Sakamoto, A., Unoura, K., & Nabika, H. (2018). Molecular Scale Insights into Activity of Polyoxometalate as Membrane-Targeting Nanomedicine from Single-Molecule Observations. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(2), 1404–1411. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11251>
- Salem, W., Leitner, D. R., Zingl, F. G., Schratte, G., Prassl, R., Goessler, W., Reidl, J., Schild, S. (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.005>
- Salton, M. R. J., & Kim, K.-S. (1996). Medical Microbiology. Em *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Sarkisova, S., Patrauchan, M. A., Berglund, D., Nivens, D. E., & Franklin, M. J. (2005). Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, 187(13), 4327–4337. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4327-4337.2005>
- Shah, H. S., Al-Oweini, R., Haider, A., Kortz, U., & Iqbal, J. (2014). Cytotoxicity and enzyme inhibition studies of polyoxometalates and their chitosan nanoassemblies. *Toxicology Reports*, 1, 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.06.001>
- Singh, S. B., Young, K., & Silver, L. L. (2017). What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.003>
- Soler, F., Plenge-Tellechea, F., Fortea, I., & Fernandez-Belda, F. (1998). Cyclopiazonic Acid Effect on Ca²⁺-Dependent Conformational States of the Sarcoplasmic Reticulum ATPase. Implication for the Enzyme Turnover †. *Biochemistry*, 37(12), 4266–4274. <https://doi.org/10.1021/bi971455c>
- Suetens, C., Latour, K., Kärki, T., Ricchizzi, E., Kinross, P., Moro, M. L., Jans, B., Hopkins, S., Hansen, S., Lyytikäinen, O., Reilly, J., Deptula, A., Zingg, W., Plachouras, D., Monnet, D., Group, the H.A. I. P. S. (2018). Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*, 23(46), 1800516. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800516>
- Tajima, Y. (2003). The effects of tungstophosphate and tungstosilicate on various stress promoters transformed in *Escherichia coli*. *Journal of inorganic biochemistry*, 94(1–2), 155–160.
- Tajima, Y. (2005). Polyoxotungstates Reduce the β-Lactam Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(3), 255–268. <https://doi.org/10.2174/1389557053175344>
- Tajima, Y., Nagasawa, Z., & Tadano, J. (1993). A factor found in aged tungstate solution enhanced the antibacterial effect of beta-lactams on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and immunology*, 37(9), 695–703. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.1993.TB01694.X>

- Tajima, Y., Nagasawa, Z., Tanabe, I., Kusaba, K., & Tadano, J. (1996). Anionic properties of β -lactam-enhancing factor on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology*, 147(4), 279–286. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)81388-X](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)81388-X)
- Toyoshima, C., & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430(6999), 529–535. <https://doi.org/10.1038/nature02680>
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405(6787), 647–655. <https://doi.org/10.1038/35015017>
- Walker, S. P., Wachs, T. D., Meeks Gardner, J., Lozoff, B., Wasserman, G. A., Pollitt, E., ... International Child Development Steering Group. (2007). Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *The Lancet*, 369(9556), 145–157. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60076-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60076-2)
- Wang, S. Q., Lakatta, E. G., Cheng, H., & Zhou, Z. Q. (2002). Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators. *The Journal of experimental biology*, 205(Pt 19), 2957–2962.
- Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551(7680), 313–320. <https://doi.org/10.1038/nature24624>
- Wilson, K., & Walker, J. (2005). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (K. Wilson & J. Walker, Eds.). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511813412>
- Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends in Biotechnology*, 31(3), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.006>
- Yamase, T. (2005). Anti-tumor, -viral, and -bacterial activities of polyoxometalates for realizing an inorganic drug. *Journal of Materials Chemistry*, 15(45), 4773–4782. <https://doi.org/10.1039/b504585a>
- Yamase, T. (2013). Polyoxometalates Active Against Tumors, Viruses, and Bacteria. Em *Progress in molecular and subcellular biology* (Vol. 54, pp. 65–116). https://doi.org/10.1007/978-3-642-41004-8_4
- Yamase, T., Fukuda, N., & Tajima, Y. (1996). Synergistic effect of polyoxotungstates in combination with beta-lactam antibiotics on antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 19(3), 459–465.
- Yang, P., Bassil, B. S., Lin, Z., Haider, A., Alfaro-Espinoza, G., Ullrich, M. S., Silvestru, S., Kortz, U. (2015). Organoantimony(III)-Containing Tungstoarsenates(III): From Controlled Assembly to Biological Activity. *Chemistry - A European Journal*, 21(44), 15600–15606. <https://doi.org/10.1002/chem.201502398>
- Yang, P., Lin, Z., Alfaro-Espinoza, G., Ullrich, M. S., Raț, C. I., Silvestru, C., & Kortz, U. (2016). 19-Tungstodiarsenate(III) Functionalized by Organoantimony(III) Groups: Tuning the Structure–Bioactivity Relationship. *Inorganic Chemistry*, 55(1), 251–258. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02189>
- Yang, P., Lin, Z., Bassil, B. S., Alfaro-Espinoza, G., Ullrich, M. S., Li, M.-X., Silvestru, C., Kortz, U. (2016). Tetra-Antimony(III)-Bridged 18-Tungsto-2-Arsenates(V), $[(LSb^{III})_4(A-\alpha-As^V W_9 O_{34})_2]^{10-}$ (L = Ph, OH): Turning Bioactivity On and Off by Ligand

Substitution. *Inorganic Chemistry*, 55(8), 3718–3720.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b00107>

Yard, N. J., Chiesi, M., & Ball, H. A. (1994). Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, on the frequency-dependence of the contraction-relaxation cycle of the guinea-pig isolated atrium. *British journal of pharmacology*, 113(3), 1001–1007.

Zhang, G., Keita, B., Brochon, J.-C., de Oliveira, P., Nadjo, L., Craescu, C. T., & Miron, S. (2007). Molecular Interaction and Energy Transfer between Human Serum Albumin and Polyoxometalates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(7), 1809–1814.
<https://doi.org/10.1021/jp063758z>

Zhang, Y., Qin, J., Tan, B., Kong, W., Chen, G., Zhang, C., & Liang, H. (2017). The P-Type ATPase PA1429 Regulates Quorum-Sensing Systems and Bacterial Virulence. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02449>

6. Anexo

Tabela A1 - Efeitos antibacterianos de POTs, POVs e POMos puros, híbridos e em combinação (sinérgicos) por bactéria que foram encontrados na literatura nos últimos 6 anos (2014 – 2019).

POTs puros			
GRAM NEGATIVAS			
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246			
POM	Abreviatura	MIC (µg/ml)	Referência
$(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 30\text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_5\text{W}_{30}^{14-}$	1	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{K}_6[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}] \cdot 14\text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_2\text{W}_{18}^{6-}$	2	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$[\text{N}(\text{CH}_3)_4]_6[\text{H}_3\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3\text{O}_{62}] \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3^{6-}$	2	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_7[\text{AsW}_{18}\text{O}_{60}] \cdot 16 \text{H}_2\text{O}$	AsW_{18}^{7-}	8	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_{12}[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}] \cdot 25 \text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_2\text{W}_{15}^{12-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{K}_6[\text{As}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}] \cdot 14 \text{H}_2\text{O}$	$\text{As}_2\text{W}_{18}^{6-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{K}_6\text{H}_2[\text{CoTiW}_{11}\text{O}_{40}] \cdot 13 \text{H}_2\text{O}$	CoTiW_{11}^{6-}	16	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{K}_8[\text{SiW}_{10}\text{O}_{36}] \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	SiW_{10}^{8-}	32	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	PW_{12}^{3-}	128	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_9[\text{SbW}_9\text{O}_{33}] \cdot 19.5 \text{H}_2\text{O}$	SbW_9^{9-}	256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)

$\text{Na}_9[\text{AsW}_9\text{O}_{33}] \cdot 19.5 \text{ H}_2\text{O}$	AsW_9^{9-}	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$(\text{NH}_4)_5[\text{H}_2\text{PCoW}_{11}\text{O}_{40}]$	PCoW_{11}^{5-}	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{K}_{14}[\text{As}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]$	$\text{As}_2\text{W}_{19}^{14-}$	64	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{K}_9(\text{C}_2\text{H}_8\text{N})_5[\text{H}_{10}\text{Se}_2\text{W}_{29}\text{O}_{103}] \cdot 30 \text{ H}_2\text{O}$	$\text{Se}_2\text{W}_{29}^{14-}$	64	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_6[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \cdot 22 \text{ H}_2\text{O}$	TeW_6^{6-}	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_4[\text{Ni}(\text{OH})_6\text{W}_6\text{O}_{18}] \cdot 16 \text{ H}_2\text{O}$	NiW_6^{4-}	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_2[\text{N}(\text{CH}_3)_4]_2[\text{Ni}(\text{OH})_3\text{W}_6\text{O}_{18}(\text{OCH}_2)_3\text{CCH}_2\text{OH}] \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$	$\text{NiW}_6^{\text{penta}4-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_{10}[\text{W}_{12}\text{O}_{40}(\text{OH})_2] \cdot 27 \text{ H}_2\text{O}$	W_{12}^{10-}	64	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_{12}[\text{H}_4\text{W}_{22}\text{O}_{74}] \cdot 31 \text{ H}_2\text{O}$	W_{22}^{12-}	128	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. coli</i> ECM1556			
$(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}] \cdot 30\text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_5\text{W}_{30}^{14-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$[\text{N}(\text{CH}_3)_4]_6[\text{H}_3\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3\text{O}_{62}] \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	$\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3^{6-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_7[\text{AsW}_{18}\text{O}_{60}] \cdot 16 \text{ H}_2\text{O}$	AsW_{18}^{7-}	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. coli</i> DH5 α			
$\text{K}_8[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]$		SI	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
$[\text{Tl}_2\{\text{B-}\beta\text{-SiW}_8\text{O}_{30}(\text{OH})\}_2]^{12-}$		80	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)

$[\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{14-}$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Na}_9(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})\{\text{Na}(\text{H}_2\text{O})\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{11-}$		500	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{10-}$		250	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_3(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})_2]^{12-}$		125	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[\text{Na}\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{10-}$		1000	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$[\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{8-}$		500	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{9-}$		SI	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		62,5	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{OHSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		1000	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
<i>E. coli</i> ATCC 10536			
$\text{Na}_{12}[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 29\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{12}[(\text{VO})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 36\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Ni}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 39\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Co}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 37\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 43\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_9[\text{Fe}_3^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 36\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)

$\text{Na}_{12}[\text{Fe}_3^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 34\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
<i>E. coli</i> ATCC 35218			
$\text{H}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^* \cdot n\text{H}_2\text{O}$	SiW ₁₂	1880/1880	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^* \cdot n\text{H}_2\text{O}$	PW ₁₂	3920/7850	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{Na}_3 [\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^* \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Na ₃ PW ₁₂	5510/11030	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
<i>E. coli</i> (estirpe não especificada)			
$\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$	HSiW		(Li, <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_9[\text{EuW}_{10}\text{O}_{36}]^{32-} \cdot \text{H}_2\text{O}$	EuW ₁₀		(D. Y. Fu <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Glycinea</i> PG4180			
$\text{K}_8[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]$		SI	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
$[\text{Ti}_2\{\text{B-}\beta\text{-SiW}_8\text{O}_{30}(\text{OH})\}_2]^{12-}$		10	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			
$\text{Na}_{12}[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 29\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{12}[(\text{VO})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Ni}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 39\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)

$\text{Na}_{12}[\text{Co}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 43\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_9[\text{Fe}_3^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Fe}_3^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 34\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{H}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	SiW_{12}	1880/3770	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	PW_{12}	3920/7850	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{Na}_3 [\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_3 \text{PW}_{12}$	5510/11030	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
<i>MDR P. aeruginosa</i>			
$\text{H}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	SiW_{12}	1880/3770	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	PW_{12}	1960/7850	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{Na}_3 [\text{PW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_3 \text{PW}_{12}$	5510/5510	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. putida DSM 291</i>			
$\text{K}_{14}(\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O}))$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Na}_9(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_3\text{K}_{3.5}\text{Na}_{4.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})\{\text{Na}(\text{H}_2\text{O})\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})] \cdot 41\text{H}_2\text{O}$		125	(Yang <i>et al.</i> , 2015)

$\text{Cs}_{4.5}\text{K}_{5.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 35\text{H}_2\text{O}$		62,5	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{Na}_{7.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_3(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 42\text{H}_2\text{O}$		15,6	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[\text{Na}\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{10-}$		500	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$[\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{8-}$		1000	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{9-}$		SI	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		<7.8/7.8	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{OHSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		1000	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)			
$\text{H}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^*\text{nH}_2\text{O}$	SiW_{12}	1880/3770	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^*\text{nH}_2\text{O}$	PW_{12}	3920/7850	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{Na}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^*\text{nH}_2\text{O}$	$\text{Na}_3\text{PW}_{12}$	5510/11030	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076			
$\text{Na}_{12}[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 29\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{12}[(\text{VO})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 36\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Ni}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 39\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)

$\text{Na}_{12}[\text{Co}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 43\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_9[\text{Fe}_3^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Fe}_3^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 34\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028			
$\text{Na}_{12}[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 29\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{12}[(\text{VO})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Ni}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 39\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Co}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 43\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_9[\text{Fe}_3^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Fe}_3^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 34\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
<i>Vibrio</i> sp. Gal12			
$\text{K}_{14}(\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O}))$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Na}_9(B\text{-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)

$\text{Cs}_3\text{K}_{3.5}\text{Na}_{4.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})\{\text{Na}(\text{H}_2\text{O})\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 41\text{H}_2\text{O}$	(CsKNa-1)	125	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{K}_{5.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 35\text{H}_2\text{O}$	(CsK-2)	62,5	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{Na}_{7.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_3(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 42\text{H}_2\text{O}$	(CsNa-3)	31,3	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[\text{Na}\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{10-}$		250	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$[\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{8-}$		250	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{9-}$		SI	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		15,6	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{OHSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		1000	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
GRAM POSITIVAS			
<i>S. aureus</i> ATCC 29213			
$(\text{NH}_4)_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]\cdot 30\text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_5\text{W}_{30}^{14-}$	16	(Gumerova, <i>et al.</i> , 2018)
$[\text{N}(\text{CH}_3)_4]_6[\text{H}_3\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3\text{O}_{62}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3^{6-}$	>256	(Gumerova, <i>et al.</i> , 2018)
$\text{Na}_7[\text{AsW}_{18}\text{O}_{60}]\cdot 16\text{H}_2\text{O}$	AsW_{18}^{7-}	>256	(Gumerova, <i>et al.</i> , 2018)
<i>S. aureus</i> YB57			
$\text{K}_5\text{PW}_{11}\text{TiO}_{40}\cdot 14\text{H}_2\text{O}$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)

$K_{13}[La(SiW_{11}O_{39})_2] \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>S. aureus</i> USA300			
$K_5PW_{11}TiO_{40} \cdot 14H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
$K_{13}[La(SiW_{11}O_{39})_2] \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
$Na_7CeW_{10}O_{35} \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
$K_{13}[Ce(SiW_{11}O_{39})_2] \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538			
$Na_{12}[Cu_3(H_2O)_3(BiW_9O_{33})_2] \cdot 29H_2O$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$K_{12}[(VO)_3(BiW_9O_{33})_2] \cdot 36H_2O$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$Na_{12}[Ni_3(H_2O)_3(BiW_9O_{33})_2] \cdot 39H_2O$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$Na_{12}[Co_3(H_2O)_3(BiW_9O_{33})_2] \cdot 37H_2O$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$Na_{12}[Mn_3(H_2O)_3(BiW_9O_{33})_2] \cdot 43H_2O$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$Na_9[Fe_3^{III}(H_2O)_3(BiW_9O_{33})_2] \cdot 36H_2O$		Si	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$Na_{12}[Fe_3^{II}(H_2O)_3(BiW_9O_{33})_2] \cdot 34H_2O$		si	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
$H_4[SiW_{12}O_{40}] \cdot nH_2O$	SiW ₁₂	1880/3770	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$H_3[PW_{12}O_{40}] \cdot nH_2O$	PW ₁₂	1960/7850	(Grama <i>et al.</i> , 2014)

$\text{Na}_3 [\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^* n\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_3 \text{PW}_{12}$	2750/11030	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
MRSA (isolada de membro amputado e de ferida infetada de um paciente com isquemia crítica)			
$\text{Na}_{12}[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 29\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{12}[(\text{VO})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Ni}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 39\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Co}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 43\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_9[\text{Fe}_3^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Fe}_3^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 34\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
MRSA (estirpe não especificada)			
$\text{H}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^*n\text{H}_2\text{O}$	SiW_{12}	1880/3770	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{H}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^* n\text{H}_2\text{O}$	PW_{12}	1960/7850	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$\text{Na}_3 [\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^* n\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_3 \text{PW}_{12}$	1370/11030	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
$\text{H}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^*n\text{H}_2\text{O}$	SiW_{12}	1880/15100	(Grama <i>et al.</i> , 2014)

$H_3[PW_{12}O_{40}] \cdot nH_2O$	PW_{12}	3920/15700	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
$Na_3 [PW_{12}O_{40}] \cdot nH_2O$	$Na_3 PW_{12}$	11030/11030	(Grama <i>et al.</i> , 2014)
<i>E. faecalis</i> FA2			
$[Cu(phen)_2]_2(H_4W_{12}O_{40})$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. faecalis</i> ATCC29212			
$(NH_4)_{14}[NaP_5W_{30}O_{110}] \cdot 30H_2O$	$P_5W_{30}^{14-}$	8	
$[N(CH_3)_4]_6[H_3P_2W_{15}V_3O_{62}] \cdot 6 H_2O$	$P_2W_{15}V_3^{6-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$Na_7[AsW_{18}O_{60}] \cdot 16 H_2O$	AsW_{18}^{7-}	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
<i>Enterococcus faecium</i> SA2			
$Na_7CeW_{10}O_{35} \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
$K_{13}[Ce(SiW_{11}O_{39})_2] \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. faecium</i> SA3			
$Na_7CeW_{10}O_{35} \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
$K_{13}[Ce(SiW_{11}O_{39})_2] \cdot 26H_2O$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (estirpe não especificada)			

$\text{Na}_7\text{CeW}_{10}\text{O}_{35} \cdot 26\text{H}_2\text{O}$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
$\text{K}_{13}[\text{Ce}(\text{SiW}_{11}\text{O}_{39})_2] \cdot 26\text{H}_2\text{O}$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579			
$\text{Na}_{12}[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 29\text{H}_2\text{O}$		400	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{12}[(\text{VO})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		400	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Ni}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 39\text{H}_2\text{O}$		400	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Co}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 37\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Mn}_3(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 43\text{H}_2\text{O}$		1600	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_9[\text{Fe}_3^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 36\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
$\text{Na}_{12}[\text{Fe}_3^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{BiW}_9\text{O}_{33})_2] \cdot 34\text{H}_2\text{O}$		SI	(Balici <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> (estirpes não especificadas)			
$\text{K}_8[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]$		SI	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
$[\text{Tl}_2\{B\text{-}\beta\text{-SiW}_8\text{O}_{30}(\text{OH})\}_2]^{12-}$		0,625	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{14}(\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O}))$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Na}_9(B\text{-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)

$\text{Cs}_3\text{K}_{3.5}\text{Na}_{4.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})\{\text{Na}(\text{H}_2\text{O})\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 41\text{H}_2\text{O}$	(CsKNa-1)	125	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{K}_{5.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 35\text{H}_2\text{O}$	(CsK-2)	62,5	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{Na}_{7.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_3(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 42\text{H}_2\text{O}$	(CsNa-3)	62,5	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[\text{Na}\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{10-}$		250	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$[\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{8-}$		250	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{9-}$		SI	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		15,6	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{OHSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		250	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus aquimaris</i>			
$\text{K}_8[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]$		SI	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
$[\text{Tl}_2\{\text{B-}\beta\text{-SiW}_8\text{O}_{30}(\text{OH})\}_2]^{12-}$		0,3125	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
<i>Clavibacter michiganensis</i>			
$\text{K}_8[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}]$		SI	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
$[\text{Tl}_2\{\text{B-}\beta\text{-SiW}_8\text{O}_{30}(\text{OH})\}_2]^{12-}$		2,5	(Ayass <i>et al.</i> , 2016)
$\text{K}_{14}(\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O}))$		Si	(Yang <i>et al.</i> , 2015)

$\text{Na}_9(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_3\text{K}_{3.5}\text{Na}_{4.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})\{\text{Na}(\text{H}_2\text{O})\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 41\text{H}_2\text{O}$	(CsKNa-1)	250	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{K}_{5.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 35\text{H}_2\text{O}$	(CsK-2)	250	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{Na}_{7.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_3(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 42\text{H}_2\text{O}$	(CsNa-3)	<7,8 / 7,8	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[\text{Na}\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{10-}$		500	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$[\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{8-}$		250	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{9-}$		SI	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		<7,8/ 7,8	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{OHSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		125	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
<i>Paenibacillus</i> sp.			
$\text{K}_{14}(\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O}))$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Na}_9(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})$		SI	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_3\text{K}_{3.5}\text{Na}_{4.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})\{\text{Na}(\text{H}_2\text{O})\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 41\text{H}_2\text{O}$	(CsKNa-1)	250	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{K}_{5.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]\cdot 35\text{H}_2\text{O}$	(CsK-2)	125	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$\text{Cs}_{4.5}\text{Na}_{7.5}[(\text{PhSb}^{\text{III}})_3(\text{B-}\alpha\text{-As}^{\text{III}}\text{W}_9\text{O}_{33})_2]\cdot 42\text{H}_2\text{O}$	(CsNa-3)	62,5	(Yang <i>et al.</i> , 2015)
$[\text{Na}\{2\text{-(Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2\text{)C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})]^{10-}$		500	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)

$[\{2-(\text{Me}_2\text{HN}^+\text{CH}_2)\text{C}_6\text{H}_4\text{Sb}^{\text{III}}\}_2\text{As}^{\text{III}}_2\text{W}_{19}\text{O}_{67}(\text{H}_2\text{O})\}^{8-}]$		250	(Yang, Lin, Alfaro-Espinoza, <i>et al.</i> , 2016)
$(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2^{9-}$		SI	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{PhSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		15,6	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
$[(\text{OHSb}^{\text{III}})_4(\text{A-}\alpha\text{-As}^{\text{V}}\text{W}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$		1000	(Yang, Lin, Bassil, <i>et al.</i> , 2016)
POTs sinérgicos			
GRAM POSITIVAS			
MRSA (4 estirpes não especificadas)			
Fosfotungstato com substituto de ferro + amoxicilina			(Farzana <i>et al.</i> , 2018)
Fosfotungstato com substituto de ferro + imipenem			(Farzana <i>et al.</i> , 2018)
Fosfotungstato de céσιο + Amoxicilina			(Farzana <i>et al.</i> , 2018)
Fosfotungstato de céσιο + Imipenem			(Farzana <i>et al.</i> , 2018)
POT em nanopartículas/híbridos			
GRAM NEGATIVAS			
<i>E. coli</i> (estirpes não especificadas)			
Lisina-azobenzeno- $\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$ (nanofibra proporção 3:1)	L1/HSiW	(60 μM)	(Li <i>et al.</i> , 2016)

Encapsulação de Na ₉ [EuW ₁₀ O ₃₆] ³²⁻ .H ₂ O em HPV 16 L1-pentamer	EuW ₁₀ @VLP		(D. Y. Fu <i>et al.</i> , 2018)
[N(C ₆ H ₁₃) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁶ -IL	1000/1000	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₆ H ₁₃) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁶ -Br	500/1000	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₇ H ₁₅) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁷ -IL	25/50	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₇ H ₁₅) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁷ -Br	25/25	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₈ H ₁₇) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁸ -IL	100/100	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₈ H ₁₇) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁸ -Br	50/100	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[Co ^{II} (C ₁₉ FH ₂₂ N ₃ O ₄) ₃][C ₁₉ FH ₂₃ N ₃ O ₄][HSiW ₁₂ O ₄₀].23H ₂ O [SiW ₁₂ O ₄₀] ₄ -	gatifloxacina-cobalto-POT	2,42	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. aeruginosa</i> (estirpes não especificadas)			
[N(C ₆ H ₁₃) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁶ -IL	>1000/>1000	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₆ H ₁₃) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁶ -Br	>1000/>1000	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₇ H ₁₅) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁷ -IL	100/100	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
[N(C ₇ H ₁₅) ₄ ⁺ (α-SiW ₁₁ O ₃₉ ⁸⁻)]	Q ⁷ -Br	50/100	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)

$[\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁸ -IL	100/100	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
$[\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁸ -Br	100/100	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
GRAM POSITIVAS			
<i>S. aureus</i> (estirpes não especificadas)			
$[\text{N}(\text{C}_6\text{H}_{13})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁶ -IL	10/10	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
$[\text{N}(\text{C}_6\text{H}_{13})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁶ -Br	10/10	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
$[\text{N}(\text{C}_7\text{H}_{15})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁷ -IL	2/2	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
$[\text{N}(\text{C}_7\text{H}_{15})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁷ -Br	2/2	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
$[\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁸ -IL	5/5	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
$[\text{N}(\text{C}_8\text{H}_{17})_4^+(\alpha\text{-SiW}_{11}\text{O}_{39}^{8-})]$	Q ⁸ -Br	5/10	(Kubo <i>et al.</i> , 2017)
$[\text{Co}^{\text{II}}(\text{C}_{19}\text{FH}_{22}\text{N}_3\text{O}_4)_3][\text{C}_{19}\text{FH}_{23}\text{N}_3\text{O}_4][\text{HSiW}_{12}\text{O}_{40}] \cdot 23\text{H}_2\text{O}$ $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]_4^-$	gatifloxacina- cobalto-POT	2,52	(Liu <i>et al.</i> , 2014)

POVs puros

GRAM NEGATIVAS			
<i>E. coli</i> (estirpes não especificadas)			

NaV₁₀			(Missina <i>et al.</i> , 2018)
K₅MnV₁₁O₃₃·10H₂O	MnV₁₁		(Marques-da-Silva <i>et al.</i> , 2019)
K₇MnV₁₃O₃₈·18H₂O	MnV₁₃		(Marques-da-Silva <i>et al.</i> , 2019)
V₁₀			(Marques-da-Silva <i>et al.</i> , 2019)
<i>M. catarrhalis</i> (ATCC 23246)			
K₄Na₂[V₁₀O₂₈]·10H₂O	V₁₀⁶⁻	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
K₄[V₄O₈(L-tart)₂]·8H₂O, tart=C₄H₂O₆⁴⁻	V₄-L-tart⁴⁻	256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
K₄[V₄O₈(D-tart)₂]·8H₂O, tart=C₄H₂O₆⁴⁻	V₄-D-tart⁴⁻	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)

POVs sinérgicos			
GRAM POSITIVAS			
MRSA (estirpes não especificadas)			
Silicovanadato + Imipenem			(Farzana <i>et al.</i> , 2018)
Silicovanadato + Amoxicilina			(Farzana <i>et al.</i> , 2018)
POVs híbridos			

GRAM NEGATIVAS	
<i>E. coli</i> (estirpe não especificada)	
Nicotinamida + decavanadato (3-Hpca) ₄ [H ₂ V ₁₀ O ₂₈]·2H ₂ O·2(3-pca)	(Missina <i>et al.</i> , 2018)
Isonicotinamide + decavanadato (4-Hpca) ₄ [H ₂ V ₁₀ O ₂₈]·2(4-pca)	(Missina <i>et al.</i> , 2018)

POMos puros			
GRAM NEGATIVAS			
<i>E. coli</i> ECM1556			
$[(C_{16}H_{36})_4N]_4[P_4Mo_{18}O_{61}]$	$P_2O_7Mo_{18}^{4-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$(CH_6N_3)_6[As_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 9 H_2O$	$As_2Mo_{18}^{6-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 23246			
$[(C_4H_9)_4N]_2[Mo_6O_{19}]$	Mo_6^{2-}	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$[(C_{16}H_{36})_4N]_4[P_4Mo_{18}O_{61}]$	$P_2O_7Mo_{18}^{4-}$	4	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$(CH_6N_3)_6[As_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 9 H_2O$	$As_2Mo_{18}^{6-}$	4	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$[(C_4H_9)_4N]_4[\alpha-Mo_8O_{26}]$	Mo_8^{4-}	32	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$(NH_4)_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot 12 H_2O$	$P_2Mo_{18}^{6-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
$[(CH_3)_4N]_4[S_2Mo_{18}O_{62}]$	$S_2Mo_{18}^{4-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
<i>Acinetobacter baumannii</i> ABC3			
$[Cu(phen)(H_2O)(Mo_3O_{10})]$			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
$Na_4[Ni(OH)_6Mo_6O_{18}] \cdot 16 H_2O$	$NiMo_6^{4-}$	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)

GRAM POSITIVAS			
<i>S. aureus</i> ATCC 29213			
[(C ₁₆ H ₃₆) ₄ N] ₄ [P ₄ Mo ₁₈ O ₆₁]	P ₂ O ₇ Mo ₁₈ ⁴⁻	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
(CH ₆ N ₃) ₆ [As ₂ Mo ₁₈ O ₆₂]·9 H ₂ O	As ₂ Mo ₁₈ ⁶⁻	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
<i>S. aureus</i> YB57			
[Cu(phen) (H ₂ O) (Mo ₃ O ₁₀)]			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
Staphylococcus aureus (USA300)			
[Cu(phen) (H ₂ O) (Mo ₃ O ₁₀)]			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. faecalis</i> ATCC29212			
[(C ₁₆ H ₃₆) ₄ N] ₄ [P ₄ Mo ₁₈ O ₆₁]	P ₂ O ₇ Mo ₁₈ ⁴⁻	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
(CH ₆ N ₃) ₆ [As ₂ Mo ₁₈ O ₆₂]·9 H ₂ O	As ₂ Mo ₁₈ ⁶⁻	>256	(Gumerova, Al-Sayed, <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. faecalis</i> FA2			
[Cu(phen) (H ₂ O) (Mo ₃ O ₁₀)]			(Gu <i>et al.</i> , 2018)
<i>E. faecalis</i> FA3			
[Cu(phen) (H ₂ O) (Mo ₃ O ₁₀)]			(Gu <i>et al.</i> , 2018)

