



**Universidade  
Católica de Brasília**

**Pró-Reitoria de Graduação  
Curso de Biomedicina  
Trabalho de Conclusão de Curso**

**ATIVIDADE ANTI-BACTERIANA  
DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS***

**Autor: Erich Wilhelm Hartmann  
Orientadora: Eliane Ferreira Noronha**

**Brasília - DF  
2010**

**ERICH WILHELM HARTMANN**

**ATIVIDADE ANTI-BACTERIANA  
DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS***

Monografia apresentada ao curso de graduação em Biomedicina da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Eliane Ferreira Noronha

Brasília  
2010



Monografia de autoria de Erich Wilhelm Hartmann, intitulada “ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS*”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina da Universidade Católica de Brasília em 11/11 /2010, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada.

---

Profª Dra. Eliane Ferreira Noronha

Orientadora

Curso de Ciências Biológicas/Departamento de Biologia Celular, Laboratório de  
Enzimologia - UNB

---

ProfªMsc. Lídia Maria Pinto De Lima

---

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Curso de Ciências Biológicas – UCB

Brasília

2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço

à Universidade Católica de Brasília pela oportunidade de realização de pesquisa acadêmico/científica;

à minha orientadora, Eliane Ferreira Noronha, pela dedicação e ensinamentos transmitidos;

aos colegas de laboratório, pela presteza, respeito e auxílio científico;

aos professores Sacha Braum, Cristiano Gatti, Eduardo Pandócio, Rinaldo Wellerson Pereira, Carlos Eduardo pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula que me foram de grande importância na minha vida acadêmica, pessoal e profissional.

à minha namorada Francine Barbosa Silva a quem amo muito e que sempre esteve presente ao meu lado e que me ajudou nos momentos difíceis.

## RESUMO

Referência: HARTMANN, Erich Wilhelm. **Título:** Atividade Antibacteriana de fungos do gênero *aspergillus*. 2010. Biomedicina- Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

A multiresistência tem sido uns dos grandes problemas do tratamento de infecções bacterianas. Na maioria das vezes isso ocorre devido ao uso indiscriminado de antibióticos. A procura por biomoléculas que apresentem atividade antibacteriana é de grande interesse no combate a essas infecções. Neste trabalho a partir do cultivo de fungos que são causadores de enfermidades em humanos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, iremos procurar biomoléculas que apresentaram atividade desejada contra as bactérias patogênicas humanas como *Salmonella sp*, causadora de muitas infecções por alimento principalmente em maionese, *Klebsiella pneumoniae*, responsável por diversos casos de infecções hospitalares, *Escherichia coli*, muito associada a infecções do trato urinário, *Staphylococcus aureus*, responsável por gastroenterites, infecções de pele e até mesmo infecções no coração, *Shiguella dysenteriae* causadora de desenteria e *Proteus vulgaris* uma bactéria oportunista eu é responsável por infecções em feridas e no trato urinário. Cultivo foi realizado em meio mínimo com restrição de nutrientes, o que pode induzir a expressão de genes latentes que necessitam de um estímulo externo para começar sua expressão. Entre esses genes latentes podem existir alguns que codificam biomoléculas capazes de inibir o crescimento de outros microorganismos na escassez de nutrientes. O cultivo mostrou que o fungo *Aspergillus flavus* obteve resultado semelhantes ao do controle com antibiótico na inibição das bactérias *Salmonella sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shiguella dysenteriae* e *Proteus vulgaris* realizados em bioensaios. Isto demonstra que existe uma demanda de biomoléculas que podem apresentar diferentes mecanismos de ação criando alternativas no combate das bactérias multiresistentes.

Palavras-chave: fungos filamentos, bactérias patogênicas, inibição e resistência.

## ABSTRACT

Reference: HARTMANN, Erich Wilhelm. **TITLE:** Antibacterial activity of Fungi *Aspergillus*. 2010. Biomedicine – Brazilian University Catholic, Brazilian, 2010.

Multidrug resistance has been a major problem with the treatment of bacterial infections. Mostly this is due to the indiscriminate use of antibiotics. The search for biomolecules that have antibacterial activity is extremely scientifically important in the combating of these infections. In this work cultivated fungi that cause human diseases such as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, and we will seek desired biomolecules that showed activity against human pathogenic bacteria such as *Salmonella* sp, which causes many infections with food mainly in mayonnaise, *Klebsiella pneumoniae*, responsible for many cases of hospital infections, *Escherichia coli* highly associated with urinary tract infections, *Staphylococcus aureus*, responsible for gastroenteritis, skin infections and even infections in the heart, causing Dysentery *Shigella dysenteriae* and *Proteus vulgaris* is a bacterium responsible for opportunistic infections in a wound and urinary tract. Culture was grown in minimal medium with restriction of nutrients, which can induce the expression of latent genes that need outside help to get his expression. Among these there may be some latent genes that encode biomolecules capable of inhibiting the growth of other microorganisms in nutrient scarcity. The cultivation showed the fungus *Aspergillus flavus* obtained results similar to the control with the antibiotic in inhibiting the bacteria *Salmonella* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Proteus vulgaris* *Shigella dysenteriae* performed in bioassays. This demonstrates that there is a demand of biomolecules that may have different mechanisms of action by creating alternatives to combat multidrug resistant bacteria.

Keyword: fungal filamenst, pathogenic bactéria, inhibition and resistance.

## SUMÁRIO

	Página
Introdução.....	1
Metodologia.....	11
Resultados dos Bioensaios.....	14
Conclusão.....	20
Referências Bibliográficas.....	21

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 FUNGOS FILAMENTOSOS

Fungos filamentosos são conhecidos por exercerem algum tipo de atividade inibitória contra bactérias<sup>1</sup>. Essa capacidade pode estar relacionada à produção de metabólitos secundários e síntese de peptídeos ou proteínas capazes de exercer função antibacteriana<sup>1</sup>. A descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1928, a partir do fungo *Penicillium notatum*, demonstra a capacidade dos fungos filamentosos em exercerem atividade antibacteriana<sup>2</sup>. Outros fungos, entre eles o *Cephalosporium acremonium*, são responsáveis pela produção de cefalosporina, um antibiótico pertencente à classe dos  $\beta$ -lactâmicos<sup>3,4</sup>. A partir destas descobertas, não somente fungos, mas outros microorganismos vêm sendo estudados na procura de moléculas com atividade inibitória contra bactérias patogênicas<sup>5,6</sup>.

A busca por moléculas com atividade antibacteriana foi facilitada, atualmente, em função da disponibilidade de sequências de peptídeos e proteínas com esta atividade, que podem ser utilizadas para a sua identificação no genoma de outros microorganismos<sup>7,8</sup>. Os genes responsáveis por essas moléculas são encontrados no material genético dos microorganismos representando uma imunidade inata<sup>8</sup>. Contudo esses genes podem ou não ser expressos, dependendo das condições em que cada microorganismo se encontra<sup>9</sup>. Todo microorganismo tende a se adaptar quando colocados em ambientes alterados<sup>9</sup>. Essa alteração do meio ambiente pode levar a uma variação da expressão de seus genes, podendo desencadear uma resposta adaptativa em suas vias metabólicas ou na síntese de moléculas<sup>9,10</sup>. Desta forma, nem todos os genes são expressos continuamente, podendo ser expressos em resposta a estímulos externos e internos favorecendo a sobrevivência do microorganismo<sup>10,11,12</sup>.

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* apresentam em seu genoma sequências gênicas com alta homologia com genes que codificam peptídeos/proteínas com atividade antibacteriana já muito bem caracterizada<sup>13</sup>. No entanto, estes genes e proteínas ainda não foram caracterizados para estes fungos<sup>13</sup>. O fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* é responsável por infecções oportunistas principalmente em pacientes com leucemia e em transplantados de medula óssea, tem o seu genoma sequenciado mostrando muita similaridade com o genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* amplamente utilizada na fermentação pela indústria<sup>14</sup>. Apesar de sua ação como agente causador da aspergilose, este fungo é muito estudado como fonte de enzimas de aplicação biotecnológica e fonte em potencial de



atividades antimicrobianas como descrito por Zhu (2008). Outros fungos deste gênero que também foram descritos como fonte de atividades antibacterianas são o *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. O *A. niger* também já é muito bem caracterizado como produtor de enzimas industriais e pela sua aplicação em processos fermentativos<sup>15</sup>. O *A. flavus* tem sido estudado em função dos impactos causados na produção de grãos como o amendoim e castanhas<sup>16</sup>. Ele que contamina toneladas destes grãos todos os anos e produz um potente agente cancerígeno, a aflatoxina<sup>16,17,18</sup>.

Outros fungos e microrganismos já foram descritos como produtores de atividades antibacterianas e compostos secundários com ação de antibióticos, como o fungo *Cephalosporium acremonium* que produz o antibiótico cefalosporina, pertencente aos grupos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que interferem na síntese da parede celular de peptidoglicano, impedindo que ocorra a formação da parede bacteriana<sup>19,20</sup>. Na presença do antibiótico a bactéria não consegue manter sua morfologia e nem o equilíbrio osmótico<sup>20</sup>. Essa característica permite que o antibiótico atue nas bactérias em sua fase de multiplicação. A estrutura das cefalosporinas é baseada no ácido aminocefalosporânico, o que não permite a ação das penicilinas sobre as cefalosporinas<sup>20</sup>.

A oxitetraciclina é um antibiótico da família das tetraciclinas obtido de *Streptomyces rimosus*<sup>21</sup>. A oxitetraciclina tem maior ação bacteriostática e exerce ação antimicrobiana por inibir a síntese protéica. Ela apresenta atividade contra uma ampla gama de organismos Gram-negativos e Gram-positivos<sup>21</sup>.

A vancomicina, um glicopeptídeo tricíclico produzido pelo fungo *Amycolatopsis orientalis*, é um antibiótico responsável por inibir a síntese da parede celular das bactérias<sup>22,23</sup>. Ela impede a incorporação do peptidoglicano das subunidades N-ácido acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, desta forma a bactéria não consegue formar sua parede celular e morre. A resistência que as bactérias apresentam é devido a alterações das estruturas do N-ácido acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, que diminui a afinidade em torno de 1000 vezes para a ligação das moléculas do antibiótico, impedindo a sua atividade<sup>22,23</sup>.

## 1.2 PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A procura por genes que codificam peptídeos ou proteínas com atividade antimicrobiana vem aumentando com o decorrer dos anos devido ao fato de que estes microrganismos são capazes de carregar uma grande variedade de informação destas moléculas<sup>24</sup>. Novos estudos demonstram que peptídeos antimicrobianos tais como a homotarsinina (HMT-2), isolados de anuros da espécie *Phyllomedusa tarsius* têm grande espectro de ação contra bactérias patogênicas, tanto Gram positivas, quanto Gram negativas<sup>25</sup>. Estudos na identificação e caracterização destes peptídeos têm sido realizados também para amostras de aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* e o carrapato de boi *Boophilus microplus*. Sendo que para *B. microplus* foram descritos quatro peptídeos um deles apresentando atividade contra bactérias, fungos e o parasita causador da leishmaniose<sup>26</sup>.

O peptídeo Pg-AMP1 isolado de semente de goiabas (*Psidium guajava*) apresentou atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativa tais como a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*<sup>27</sup>. Este peptídeo ainda apresentou atividade contra fungos fitopatogênicos mostrando ser um antimicrobiano muito promissor a ser utilizado no desenvolvimento de novos antibióticos<sup>27</sup>.

A procura por biomoléculas com atividade antimicrobiana tem aumentado muito visto que visto que as bactérias têm adquirido mecanismos contra praticamente todos os antibióticos já existentes<sup>28</sup>. Ainda não se conhece os mecanismos de ação destes peptídeos, mas existem evidências que de que eles atuem desestruturando as membranas das bactérias.  
<sup>27,28</sup>.

## 1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

Os compostos com atividade antibacteriana podem apresentar ação bactericida bacteriostática<sup>29</sup>. Estas atividades podem ocorrer por meio da ação inibitória na síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição ou alteração da síntese protéica e atuação nos ácidos nucleicos impedindo a adição de nucleotídeos na fase de replicação do DNA<sup>29,30</sup>. A ação destes compostos depende da sua ligação nos sítios de ação para que possa interferir no metabolismo bacteriano, alterando suas funções vitais<sup>29,30</sup>.

Algumas das classes de antibióticos mais utilizados e sua ação contra as bactérias estão descritos na tabela a abaixo

Tabela 1. Classes mais utilizadas de antibióticos com seus princípios de ação e efeitos secundários.

<b>Classe do antibiótico</b>	<b>Principais moléculas e princípios ativos da família</b>	<b>Ação sobre as bactérias</b>	<b>Efeitos secundários</b>
Penicilinas (beta-lactamase)	Amoxicilina + ev. <i>um inibidor da lactamase ácido clavulânico</i>	Inibidor da síntese da parede bacteriana (ação bactericida)	Diarréias, alergia (até 5% das doenças tratadas), toxicidade digestiva, renal
	Ampicilina		
	Penicilina G. <i>Substância original da penicila</i>		
	Penicilina V		
	Piperacilina		
Cefalosporinas (beta-lactamase)	1ª geração -Cefactor -Cefazolina	Inibidores da síntese da parede bacteriana (ação bactericida)	Alergia, toxicidade renal (alta dose)  Reações alérgicas, hemorragias
	2ª geração -Cefamandol -Cefuroxima		
	3ª geração -Cefixima -Cefpodoxima -Cefotaxima -Ceftazidima -Ceftriaxona		
Aminosídeos (Aminoglicosídeos)	Estreptomina Neomicina Tobramicina Amikacina Gentamicina	Inibidor da síntese protéica (função bactericida)	Toxicidade na região da audição (ototoxicidade) e renal (nefrotoxicidade, em geral reversível)
Macrolídeos	Axitromicina Eritromicina Roxitromicina Claritromicina	Inibidores da síntese protéica (função bactericida)	Alergia, toxicidade digestiva, toxicidade hepática
Tetraciclina	Doxicilina Minociclina Tetraciclina	Inibidores da síntese protéica (função bactericida)	Alergia, toxicidade digestiva, renal, na região neuronal

## 1.4 RESISTÊNCIA

A resistência a antimicrobianos pode ser natural (inata) ou adquirida e ocorre quando há o aparecimento da resistência na bactéria anteriormente sensível à droga<sup>31</sup>. É uma nova característica manifestada em algumas bactérias, mas que não estão presente nas células genitoras<sup>31</sup>. Essa nova característica pode resultar em alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana lhe dando uma nova característica, mas também pode ser cromossômicas ou extra-cromossômica localizada em plasmídeos<sup>31,32</sup>. Uma única alteração genética pode levar ao aparecimento de uma cepa muito resistente, que normalmente não perde sua viabilidade e patogenicidade<sup>32</sup>.

Outras possibilidades para a resistência bacteriana podem ser a mutação, que é um fenômeno espontâneo, sendo resultado de um erro na replicação do DNA, estes erros podem ocorrer a cada 10<sup>4</sup> a 10<sup>10</sup> divisões celulares e podem envolve deleção, substituição ou adição de um ou mais pares de bases na cadeia de DNA, levando a alterações na composição de aminoácidos de peptídeos e proteínas<sup>31, 32,33</sup>. Essas mutações podem ocorrer na ausência ou presença de antibióticos, mas o uso de antibióticos pode ocasionar uma seleção das bactérias mutantes, favorecendo seu crescimento por sua atuação nas células normais e sensíveis<sup>31,32,33</sup>. Esse problema é mais evidenciado em tratamentos prolongados com o uso de antibiótico<sup>32,33</sup>. A mutação leva, muitas vezes, a alteração de permeabilidade da célula ou ainda a alteração de seu receptor impedindo a atuação do antibiótico<sup>33,34</sup>. As mutações podem ser divididas em: Single large-step, quando uma única mutação, normalmente associada à estrutura do receptor, leva a um aumento súbito da CMI (concentração mínima inibitória) para a bactéria e, Multi-step, quando sucessivas mutações levam a diminuições graduais da efetividade de antibióticos frente ao microrganismo<sup>33,34</sup>.

## 1.5 FORMAS DE RESISTENCIA DAS BACTÉRIAS

A resistência transferível acontece quando um microrganismo recebe material genético de outro microrganismo e passa a expressar a característica contida no gene adquirido<sup>35</sup>. Esse material genético que contém a informação que expressa a resistência também pode ser transferido de outras formas como: transformação, transdução, conjugação e ainda transposição<sup>35</sup>.

A transdução envolve a incorporação de DNA bacteriano cromossômico ou plasmidial por um bacteriófago durante seu processo de infecção celular. Após a lise celular, esse

bacteriófago atua então como um vetor e ao infectar uma nova célula pode introduzir o DNA contendo o gene de resistência, tornando-a resistente à determinada droga<sup>35</sup>. A conjugação é um processo que depende do contato físico, bactéria-bactéria, onde uma vai transferir através de fimbria ou pilus sexual o material genético para a outra<sup>36</sup>. A habilidade de uma bactéria em conjugar na maioria das vezes é codificada em plasmídios, chamados plasmídios F, de fertilidade ou conjugativos<sup>36</sup>. Esses plasmídios são segmentos de DNA de fita dupla autoreplicantes que ligam à bactéria que os possui a propriedade de estabelecer, através desse canal protéico (fimbria), contato com outras bactérias para a transferência de genes plasmidiais<sup>36</sup>. Ao receber o material genético sob a forma de plasmídios que pode conter genes determinantes de resistência (plasmídios R), a bactéria receptora a partir desse momento pode expressar uma nova característica, tornando-se resistente<sup>37</sup>. Pode ainda conjugar com outra bactéria, atuando agora como doadora, pois junto com genes de resistência, ela recebe genes conjugativos (plasmídios F), permitindo então repetir o processo agora em progressão geométrica<sup>37</sup>. Esses plasmídios transferidos por conjugação podem conter genes determinantes de resistência a muitos antibióticos. Caso o uso inadequado de algum antimicrobiano seja feito ele pode selecionar microrganismos multirresistentes<sup>37</sup>.

Em hospitais o uso frequente de antibióticos de amplo espectro pode favorecer de forma significativa essa multirresistência devido a uma infinidade de diferentes bactérias estarem sendo expostas a diferentes antibióticos com diferentes mecanismos de ação<sup>38</sup>. No fenômeno da transposição há a dependência da presença na bactéria de segmentos curtos de DNA denominados transposons<sup>39</sup>. Os transposons podem conter genes de resistência para um ou mais antibióticos. Eles não têm capacidade de auto-replicação; então se unem a replicons, ou seja, "saltam" dentro da célula entre plasmídios, cromossomos e bacteriófagos, caracterizando uma promiscuidade gênica celular. Esses "genes saltadores", quando se unem a segmentos de DNA para sua replicação, podem incorporar genes de resistência nesse DNA<sup>39</sup>. A partir desses mecanismos as bactérias podem transferir sua resistência a outras bactérias tornando-as resistentes a determinadas drogas que antes elas não eram resistentes<sup>39</sup>. É importante ressaltar que não há necessidade de patogenicidade do microrganismo para que carregue genes de resistência<sup>37,39</sup>. Bactérias da microbiota normal são as que carregam maior quantidade de genes resistentes a uma ou mais drogas por estarem expostas a antibióticos presentes em leite de vaca e à imprudência de automedicação sem uso correto da medicação. Desta forma, sofrem uma pressão maior de seletividade<sup>38</sup>.

## 1.6 MECANISMOS DE RESPOSTA DAS BACTÉRIAS AOS ANTIBIÓTICOS

As bactérias possuem também mecanismos de escape que possibilitam a sua sobrevivência na presença de antibióticos como a bomba de efluxo, a impenetrabilidade, a proteção ribossômica, e a produção de  $\beta$ -lactamases<sup>40</sup>. As  $\beta$ -lactamases são enzimas que atuam promovendo a hidrólise dos antibióticos derivados de  $\beta$ -lactâmicos deixando aberta a estrutura do anel. Nesta configuração molecular os antibióticos são incapazes de se ligar ao seu sítio receptor, as PBPs (penicillin binding proteins), evitando a inibição da síntese da parede celular bacteriana<sup>40</sup>. Dessa forma a bactéria continua seu ciclo reprodutivo normalmente, tornando-se então resistente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos<sup>40</sup>. Existem dezenas de tipos de  $\beta$ -lactamases, variando de substrato e microrganismo produtor<sup>40</sup>. A informação para sua produção em microrganismos pode estar presente no cromossomo bacteriano, em plasmídios ou em transposons<sup>39,40</sup>. As  $\beta$ -lactamases são capazes de hidrolisar quase todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, como aztreonam<sup>41</sup>.

No caso da bomba de efluxo, a bactéria passa a produzir proteínas de membrana que funcionam, bombeando ativamente a tetraciclina para fora da célula bacteriana<sup>40</sup>. Existem evidências de que existam pelo menos dois subtipos destes sistemas de bombeamento; aquele dito "multi-drug-pump", que bombeia inespecificamente diferentes drogas e um sistema específico para transporte de tetraciclina<sup>39,40</sup>. No caso de bactérias que apresentam este tipo de sistema a droga não atinge concentrações intracelulares suficientes para promover inibição de síntese protéica ribossomal, pois é rapidamente bombeada para meio extracelular<sup>39,40</sup>.

A impenetrabilidade é um mecanismo de defesa onde as bactérias, através de gerações, passam a sintetizar os canais protéicos em sua membrana cada vez menores ou até codificar a ausência completa desses canais, impedindo assim a entrada da droga na célula<sup>41</sup>. Desta forma, algumas bactérias não permitem, pela ausência ou modificação do canal, a entrada de alguns antibióticos, como penicilinas, cefalosporinas e quinolonas<sup>41</sup>. Devido a gama de mecanismos de defesa que as bactérias oferecem contra os antibacterianos, faz-se necessária a constante busca de antibióticos que utilizem mecanismos de ação diferenciados ou novos sítios de ação capazes de neutralizar as resistências atuais<sup>41</sup>. As bactérias podem provocar infecções quando colonizam locais onde elas não deveriam existir como o sistema urinário médio, ou quando ocorre uma perda da microbiota local<sup>42</sup>. Esses mecanismos de defesa das bactérias é um grande risco para a saúde mundial, ainda mais pelo fato de elas poderem

compartilhar os genes responsáveis pelos diferentes tipos de resistência<sup>42</sup>. Esse fato torna cada vez menos eficiente os antibióticos existentes e cada vez mais as bactérias multirresistentes vão predominar dentro e fora de ambientes hospitalares se tornando um problema cada vez maior na saúde pública<sup>42</sup>.

### 1.7 NOVOS MECANISMOS DE AÇÃO

As novas descobertas de peptídeos, ou até mesmo proteínas, que podem ser expressos por plantas, insetos, anfíbios, fungos, bactérias ou qualquer outro microorganismo e que apresentam atividade inibitória contra bactérias tem sido uma alternativa muito cobiçada pelos pesquisadores em decorrência da diversidade de informações que esses organismos podem carregar<sup>43</sup>.

Cada organismo é capaz de expressar genes que outro não pode ser capaz<sup>43</sup>. Muitos genes podem ser transcritos, mas no caminho, podem sofrer ação de interferentes que não permitem que eles sejam traduzidos sendo, dessa forma, silenciados, o que os tornam incapazes de expressar sua informação<sup>44</sup>. Outros genes podem ser transcritos e traduzidos, contudo, toda expressão pode sofrer interferência do local, exposição à variação do ambiente e vários outros fatores capazes de favorecer ou não a expressão desses genes em diferentes espécies de animais e microrganismos<sup>44</sup>. A identificação de uma proteína ou peptídeo pode proporcionar a identificação da sequência de DNA responsável por aquele gene, favorecendo a síntese em uma escala maior daquelas moléculas<sup>44</sup>. A biodiversidade genética dos diversos microrganismos que são capazes de expressar genes que sintetizam várias moléculas com diversas propriedades e funções pode favorecer a busca por antibióticos que possam combater os microrganismos multirresistentes causadores de milhares de mortes anualmente no mundo<sup>44,45</sup>.

O antibiótico é capaz de exercer uma pressão seletiva nos microrganismos onde atuará, levando à morte as cepas sensíveis, sobrevivendo então àquelas resistentes<sup>46</sup>. Isso é muito bem observado em ambientes hospitalares ou em comunidades onde não existe o controle no uso dessas drogas, que ocasiona o aparecimento de cepas multirresistentes<sup>46</sup>. O problema da multirresistência também está na venda sem prescrição de antibióticos, onde a fila na rede pública e a demora no atendimento levam o cidadão a comprar antibióticos na farmácia e a se automedicar sem saber as grandes consequências de seu ato<sup>46</sup>. A incidência de cepas multirresistentes fora dos hospitais tem aumentado nas comunidades, criando um grande problema de saúde pública, pois essas cepas vêm atingindo pessoas com boa saúde<sup>46</sup>.

A disseminação intra-hospitalar de cepas multirresistentes é um problema grave, pois os próprios profissionais da área da saúde são disseminadores dessas bactérias entre diferentes hospitais<sup>46</sup>.

## 1.8 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E SAÚDE HUMANA

*Pseudomonas aeruginosa*, é uma bactéria de relevância quanto à ocorrência em ambientes hospitalares, sendo que já existem registros de cepas resistentes para os antibióticos  $\beta$  – lactâmicos<sup>41</sup>. As cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases começaram a aparecer devido ao uso freqüente de antibióticos da classe dos carbapenêmicos, quando estes eram os únicos antibióticos eficientes contra estas bactérias<sup>49</sup>. O primeiro relato de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de  $\beta$ -lactamases foi identificado no Japão em 1991, e posteriormente casos começaram a ocorrer na Europa, Ásia e América<sup>49</sup>. No Brasil, o gene de  $\beta$ -lactamases prevalente é o blaSPM-1, cepas originalmente isoladas em São Paulo em ambiente hospitalar<sup>49</sup>.

Recentemente o Correio brasileiro do DF relatou o aparecimento de uma cepa multiresistente de *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (KPC) sendo relatada a morte de 18 pessoas infectadas. A SES-DF afirmou ainda que 111 pacientes de hospitais públicos e particulares estão entre casos confirmados e suspeitos de infecção pela bactéria em todo o DF e o número de hospitais que já estão com pacientes infectados vem aumentando junto com o número de mortes.

*Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) capaz de produzir uma enzima carbapenemase onde na sua presença a bactéria confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, e também são capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos<sup>47,48</sup>. Isso é um grande problema, pois estes antibióticos são amplamente utilizados no tratamento de infecções<sup>47,48</sup>.

De fato, o desenvolvimento de novas moléculas com potencial de ação antibacteriana é necessário já que os níveis de resistência excederam a capacidade dos antibióticos comumente utilizados<sup>24</sup>. A continuidade das pesquisas que envolvem a procura de proteínas e/ou peptídeos com atividade antibacteriana deve, portanto, continuar<sup>25</sup>. A grande variabilidade dessas moléculas e a possibilidade de se encontrar novos mecanismos de ação, que podem



favorecer o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes e com menor possibilidade de indução de resistência<sup>25</sup>.

Doenças nosocomiais causadas por bactérias representam um problema para o sistema de saúde no Brasil e no mundo. Ademais, a ocorrência de bactérias resistentes aos antibióticos tradicionais é cada vez mais frequente. Esse fato torna os procedimentos cirúrgicos mais arriscados (maior risco de uma infecção) e afeta diretamente o número de mortes e a qualidade de vida de pacientes pós cirurgia e internados. A imprudência humana em usar antibióticos de forma indiscriminada faz com que os avanços da medicina não sejam capazes de deter simples infecções que outrora não significavam mais um risco à saúde.

Crianças e idosos são um grupo de risco quando se trata de infecções. As crianças ainda não possuem um sistema imunológico completamente formado e são dependentes de antibióticos para ajudar no combate a infecções. Os idosos por outro lado possuem um sistema imunológico debilitado onde qualquer infecção sem o uso de antibióticos pode ocasionar a morte.

Desta forma, a busca por novas moléculas com atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas humanas representa uma nova alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos e medidas para o controle de infecções bacterianas.

Este trabalho, portanto, tem como objetivo principal avaliar o potencial de utilização de fungos do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. awamori*) como fonte de compostos com atividade inibitória contra as bactérias patogênicas *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* e *Proteus vulgaris*. Estas bactérias são patogênicas a humanos e representam um grande problema para a saúde pública no Brasil e no mundo.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 MEIOS DE CULTURA

#### a) Meio MYG:

Para o preparo de 500mL de meio MYG sólido, foram adicionados 2,5 g de extrato de malte, 1,25 g de extrato de levedura e 5,0 g de glicose a um béquer contendo 300mL de água destilada. Os solutos foram homogeneizados sob agitação, o pH foi ajustado para 7,0, e posteriormente transferido para proveta e o volume ajustado para 500mL. A seguir, esta solução foi transferida para um erlemmeyer de 1,0L contendo 10,0 g de ágar, o meio de cultura foi autoclavado a 120° C, por 20 min. Após resfriamento parcial, este foi vertido, aproximadamente 20mL, em placas de petri, em fluxo laminar. Para preparar este meio para cultura líquida não foi adicionado o ágar.

Para o preparo de 1000mL de meio mínimo, foram adicionados 2,0 g de fosfato de potássio monobásico, 0,3 g de cloreto de cálcio, 0,3 g de sulfato de magnésio, três cristais de ferro (fosfato de ferro), três cristais de zinco (sulfato de zinco) e 2,0 g de glicose a um béquer de 1000mL contendo 600mL de água destilada, a solução foi homogeneizada sob agitação, e o pH ajustado para 6,0. Posteriormente, o meio foi transferido para proveta e o volume ajustado para 1000mL. O volume de 250 mL foi adicionado a quatro erlemmeyers de 500mL e o meio autoclavado a 120° C, por 20 min.

**Meio LB** – Para o preparo de 500 mL de meio LB, foram adicionados 5,0 g de triptona, 2,5 g de extrato de levedura e 2,5 g de cloreto de sódio a um béquer de 500mL contendo 300mL de água destilada. O material foi homogeneizado sob agitação e o pH ajustado para 7,0. Posteriormente a solução foi transferida para uma proveta e o volume ajustado para 500mL. A seguir, 5mL foram transferidos para tubos Falcon de 15mL e submetidos à esterilização em autoclave, a 120° C, por 15min.

### 2.2 CULTIVO DOS FUNGOS

Os fungos *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. awamori* cedidos pelo Dr. Carlos Roberto Felix do Laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília, foram inoculados em placas de petri contendo meio MYG e incubados a 28° C até a sua esporulação.

Três a quatro discos destas culturas foram coletadas e transferidas para os seguintes meios de cultura: MYG e meio mínimo líquidos. Os frascos cônicos contendo os inóculos foram incubados a 28° C com agitação constante de 120 rpm.

### **2.3 PREPARO DOS FILTRADOS DAS CULTURAS PARA OS ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS**

Para cada um dos fungos cultivados como descrito no item acima, foram retiradas três alíquotas de 10mL nos seguintes tempos de cultivo: 48h, 72h e 96h. As alíquotas foram filtradas em filtro Milipore 22µm. A seguir foram divididas em alíquotas de 5mL cada, uma foi liofilizada e a outra não. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 100µL de água destilada estéril, transferidas para um microtubo de 1500µL e estocados a -80° C até a realização dos bioensaios, assim como as amostras não liofilizadas.

### **2.4 CULTIVOS DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

Foram retirados individualmente 100µL de cultura das bactérias *S. sp*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. dysenteriae* e *P. vulgaris* que estavam congeladas há -80 °C e inoculadas nos tubos Falcons contendo meio LB líquido. As culturas foram incubadas a 37 °C com agitação constante de 260 rpm por 4 horas a 260 rpm. As curvas de crescimento na ausência dos filtrados das culturas fúngicas foram realizadas pelo monitoramento do crescimento bacteriano medindo-se densidade ótica a 595 nm das culturas, a cada meia hora de cultivo. A partir de uma cultura inicial com densidade ótica de 0,05. Cada experimento foi realizado em triplicata.

### **2.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO**

Os ensaios de inibição foram realizados em triplicata, utilizando-se placas de ELISA. Para cada ensaio foram adicionados 10µL de cada uma das amostras dos filtrados das culturas fúngicas (liofilizadas e não liofilizadas). A densidade ótica inicial das culturas era de 0,05 e meio LB líquido foi adicionado para completar o volume final para 100 µL. Os controles negativos das inibições foram realizados com as amostras (liofilizadas e não liofilizadas) após 10 minutos de fervura. Os controles do crescimento bacteriano foram realizados para as

culturas na ausência dos filtrados das culturas fúngicas. O controle positivo da inibição foi realizado substituindo o volume dos filtrados das culturas fúngicas pelo antibiótico cloranfenicol na concentração final de  $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Portanto foram utilizadas cinco condições controle: amostra com cloranfenicol (controle positivo), amostra sem antibiótico (controle de crescimento), amostra com adição de meio mínimo (controle negativo), amostra com adição de meio mínimo fervido e amostra teste fervida (controle negativo). A amostra com o antibiótico cloranfenicol foi utilizada como controle positivo já que este é capaz de inibir o crescimento das bactérias. A amostra sem antibiótico foi utilizada para observar o crescimento normal da bactéria em meio LB líquido, em bioensaio. Quanto mais distantes os resultados entre a amostra teste e a amostra sem antibiótico, maior a atividade inibitória da amostra teste. Foi realizado um controle com o meio mínimo, utilizado para o cultivo dos fungos. Esse controle teve o intuito de mostrar que o meio mínimo não interfere no crescimento das bactérias utilizadas no experimento. A amostra do meio mínimo fervida também foi utilizada com o intuito de demonstrar que, após a fervura, ela não sofre alterações capazes de interferirem no crescimento das bactérias utilizadas no experimento. A amostra fervida tem a mesma composição da amostra teste, a fervura é capaz de desnaturar a maioria das proteínas e peptídeos que possam apresentar atividade inibitória e que estejam presentes na amostra teste, permitindo que ocorra o crescimento das bactérias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

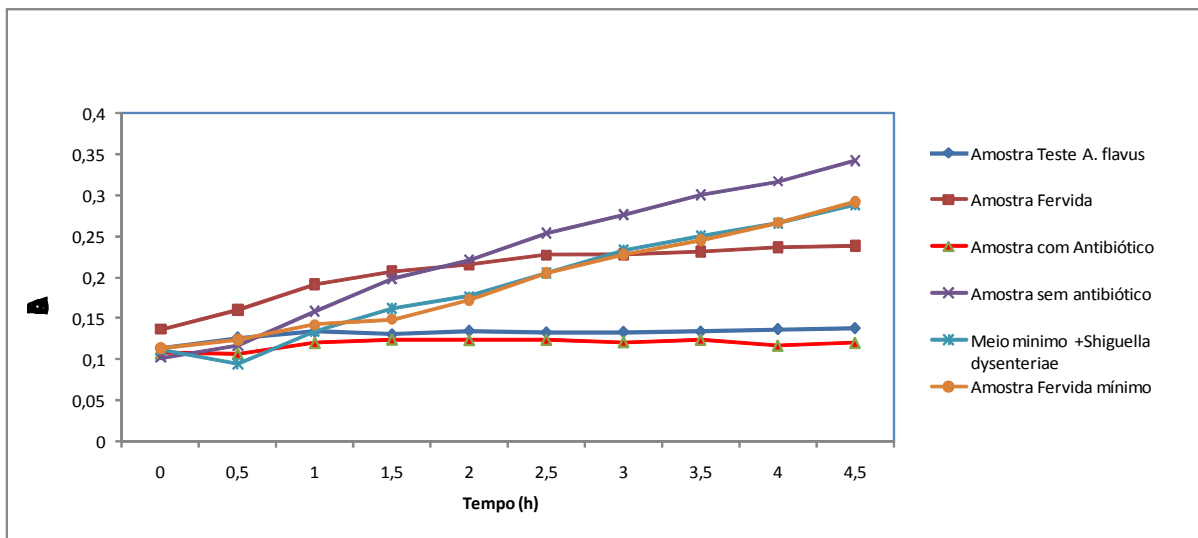


Figura 1. Atividade inibitória do fungo *Aspergillus flavus* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Shigella dysenteriae* utilizando amostra liofilizada.

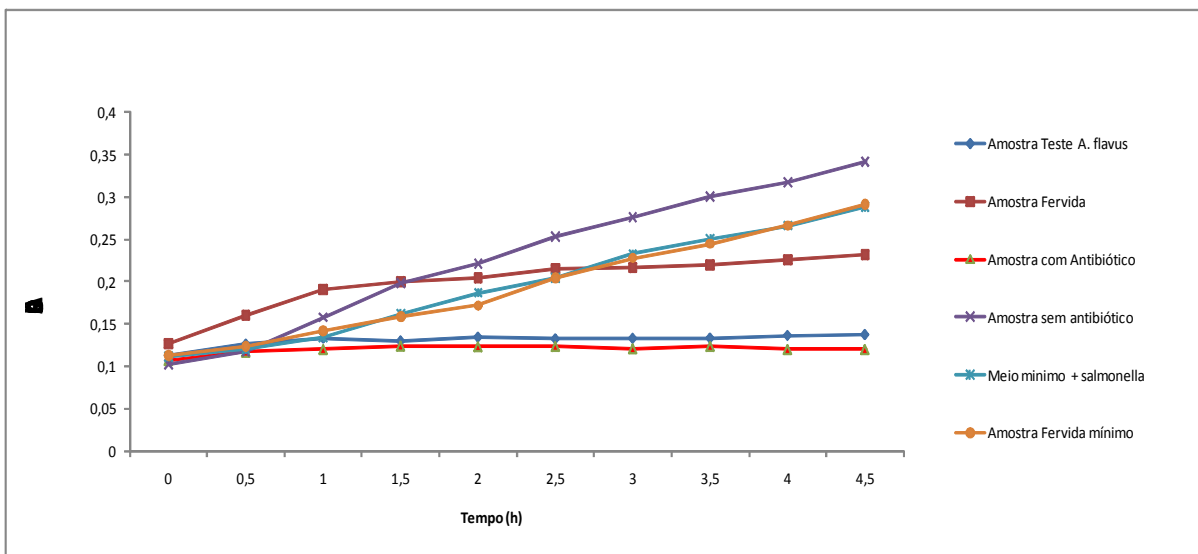


Figura 2. Atividade inibitória do fungo *Aspergillus flavus* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Salmonella sp* utilizando amostra liofilizada.

É possível observar nas figuras 1 e 2 que o filtrado da cultura de *A. flavus* para o cultivo por 96 horas e amostra liofilizada (representada pela linha azul) apresentou a mesma taxa de inibição obtida para o cloranfenicol (representada pela linha vermelha), sobre os crescimentos das bactérias *S. dysenteriae* e *S. sp*. As taxas de crescimento das culturas bacterianas, na ausência das culturas fúngicas e antibiótico, foram maiores que as dos tratamentos (Figuras 1 e 2).

A amostra fervida tem a mesma composição da amostra teste de *A. flavus*, mas não apresentou a mesma taxa de inibição obtida para a amostra não fervida, permitindo um crescimento normal da bactéria como observado (Linha referente à amostra fervida) (Figuras 1 e 2). A perda da atividade inibitória para a amostra fervida é um indicio da natureza protéica desta. No entanto, vale ressaltar que nem todo composto peptídico ou protéico é totalmente desnaturado no processo de fervura, pois alguns deles podem apresentar característica termoestáveis o que pode justificar uma queda da curva de crescimento após o tempo de 2,5 h na figura 1 e após 1h na figura 2. Esta queda pode ser justificada pelos compostos não terem perdido seu potencial inibitório. As condições de cultivo meio mínimo + *S. dysenteriae* (Figura 1) e meio mínimo + *S. sp* (Figura 2) foram controles realizados para demonstrar que o meio mínimo no qual os fungos foram cultivados não é capaz de interferir no crescimento da bactéria. Isso pode ser observado pelo crescimento exponencial das bactérias nestes controles.

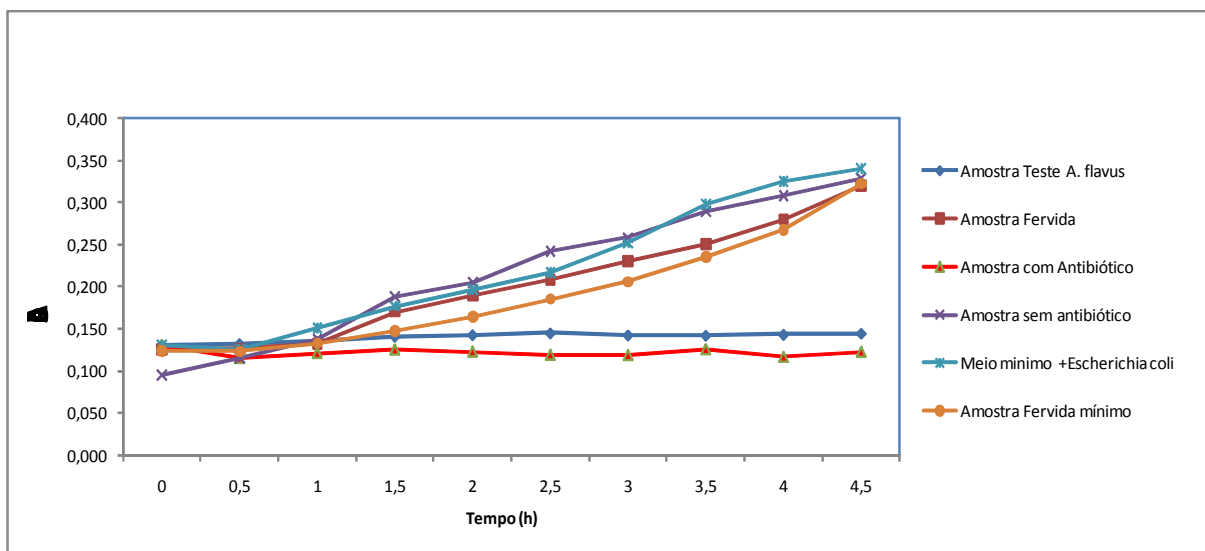


Figura 3. Atividade inibitória do fungo *Aspergillus flavus* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *klebsiella pneumoniae* utilizando amostra liofilizada.

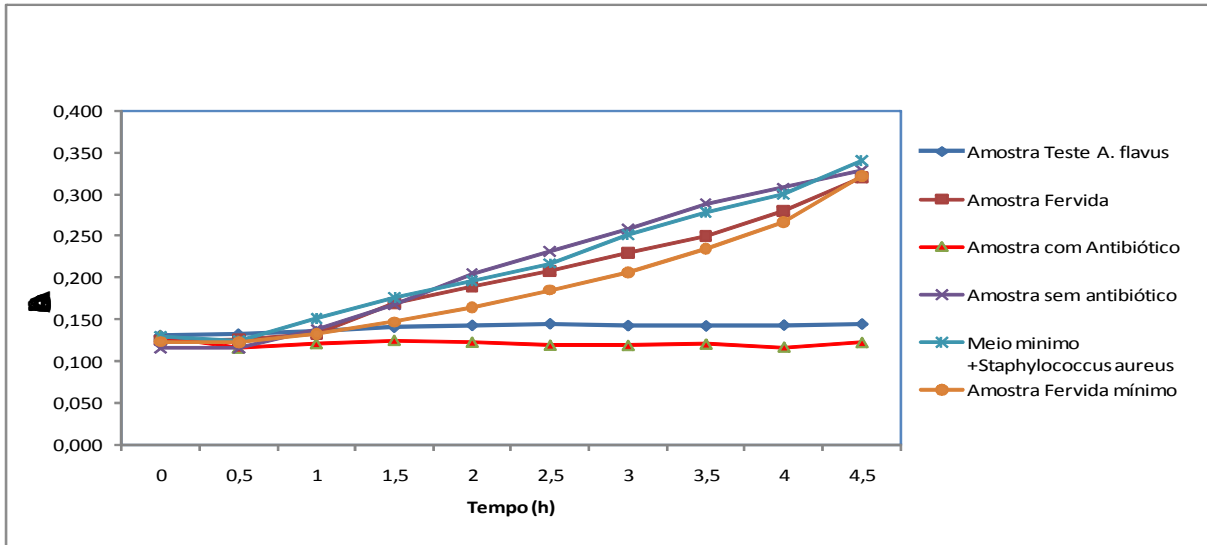


Figura 4. Atividade inibitória do fungo *Aspergillus flavus* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Escherichia coli* utilizando amostra liofilizada.

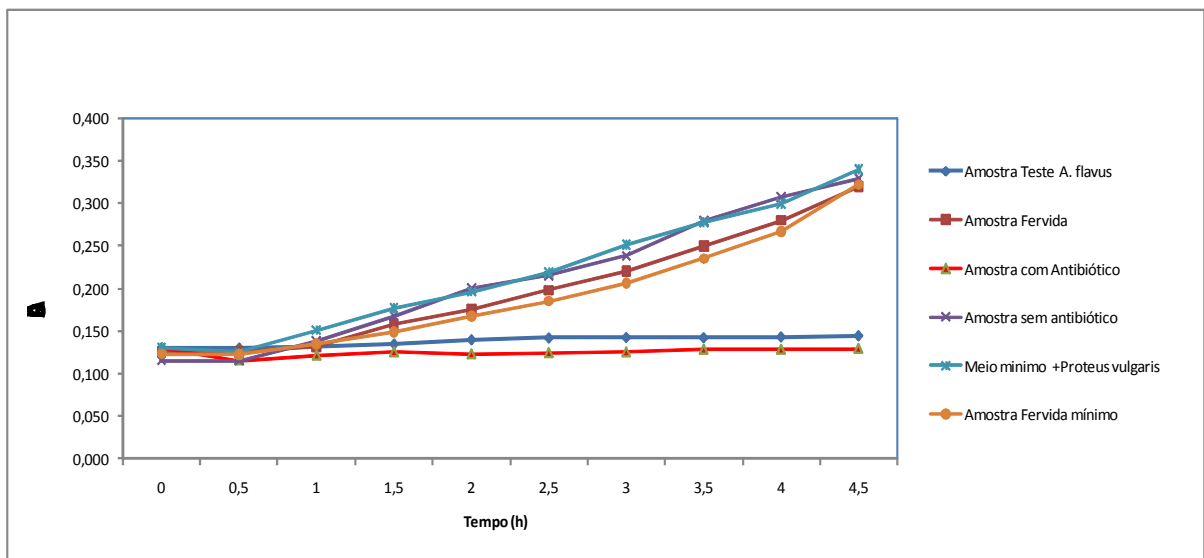


Figura 5. Atividade inibitória do fungo *Aspergillus flavus* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Staphylococcus aureus* utilizando amostra liofilizada.

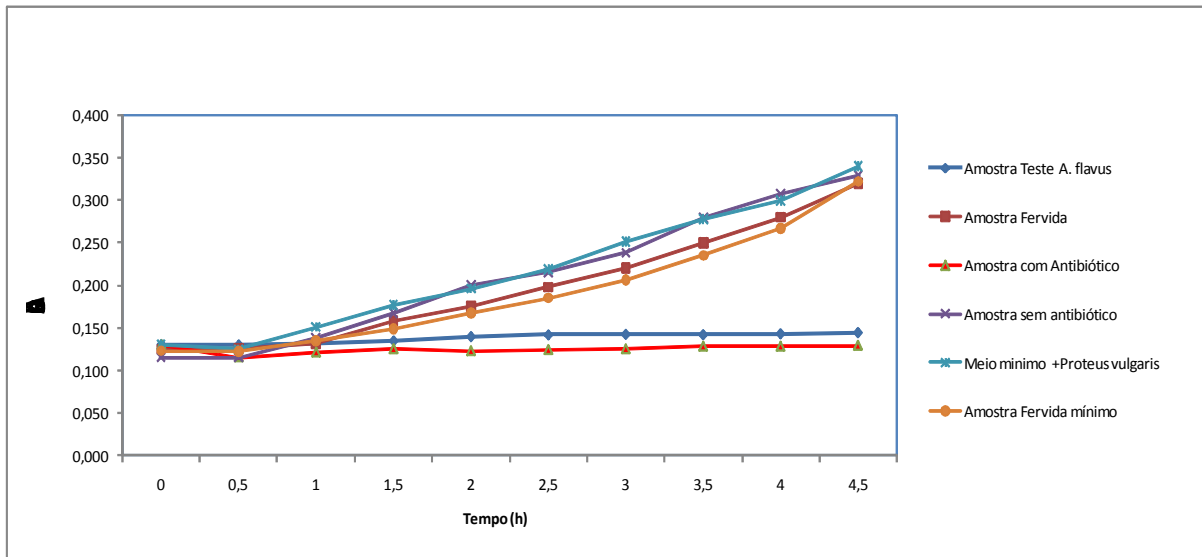


Figura 6. Atividade inibitória do fungo *Aspergillus flavus* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Proteus vulgaris* utilizando amostra liofilizada.

É possível observar nas figuras 3, 4, 5 e 6 que o filtrado da cultura de *A. flavus* para o cultivo por 96 horas e amostra liofilizada (representada pela linha azul) apresentou a mesma taxa de inibição obtida para o cloranfenicol (representada pela linha vermelha), sobre os crescimentos das bactérias, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Proteus vulgaris*. As taxas de crescimento das culturas bacterianas, na ausência das culturas fúngicas e antibiótico, foram maiores que as dos tratamentos (Figuras 3, 4, 5 e 6). As condições de cultivo meio mínimo + bactérias patogênicas foram controles realizados para demonstrar que o meio mínimo no qual os fungos foram cultivados não é capaz de interferir no crescimento da bactéria. Isso pode ser observado pelo crescimento exponencial das bactérias nestes controles (Figuras 3, 4, 5 e 6). Estes resultados estão de acordo com os descritos no trabalho de Furtado (1944)<sup>50</sup>. No entanto, o presente estudo dá um direcionamento melhor da natureza da química biomolécula responsável pela atividade antibacteriana.

A amostra teste fervida não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, o que sugere que a atividade anti-bacteriana é de origem protéica. As amostras concentradas dos filtrados das culturas de *A. flavus* também foram digeridas com tripsina, e o sistema de digestão utilizado nos bioensaios para avaliação da atividade anti-bacteriana. O teste de inibição realizado em placa não mostrou halo de inibição após o tratamento com a tripsina o que reforça hipótese de se tratar de um composto protéico.



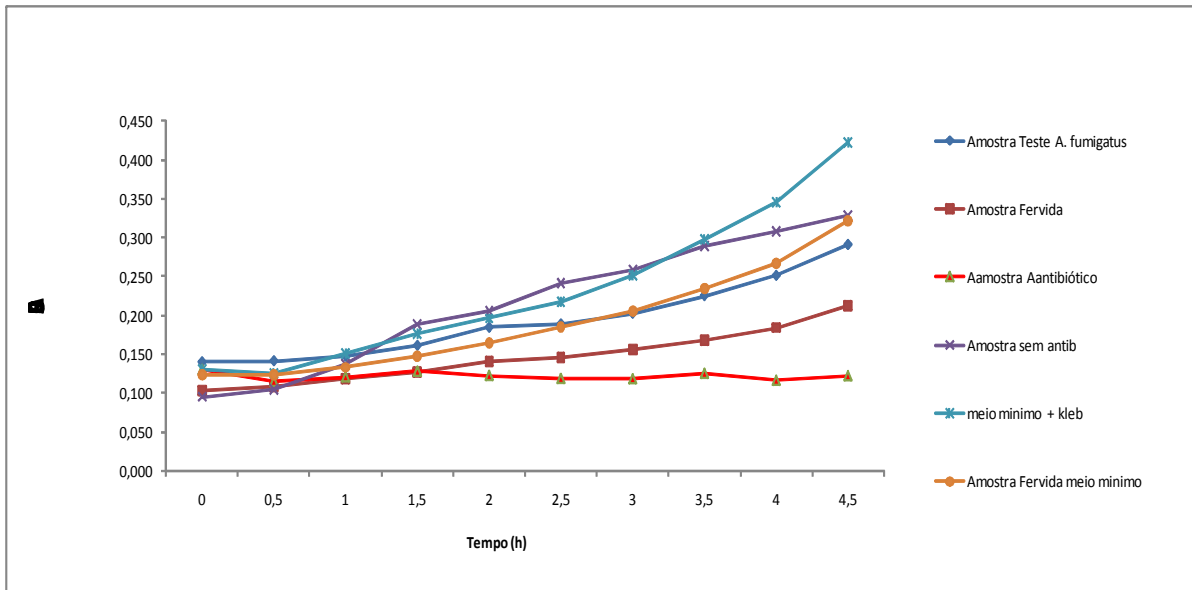


Figura 7 Atividade inibitória do *Aspergillus fumigatus* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* utilizando amostra liofilizada.

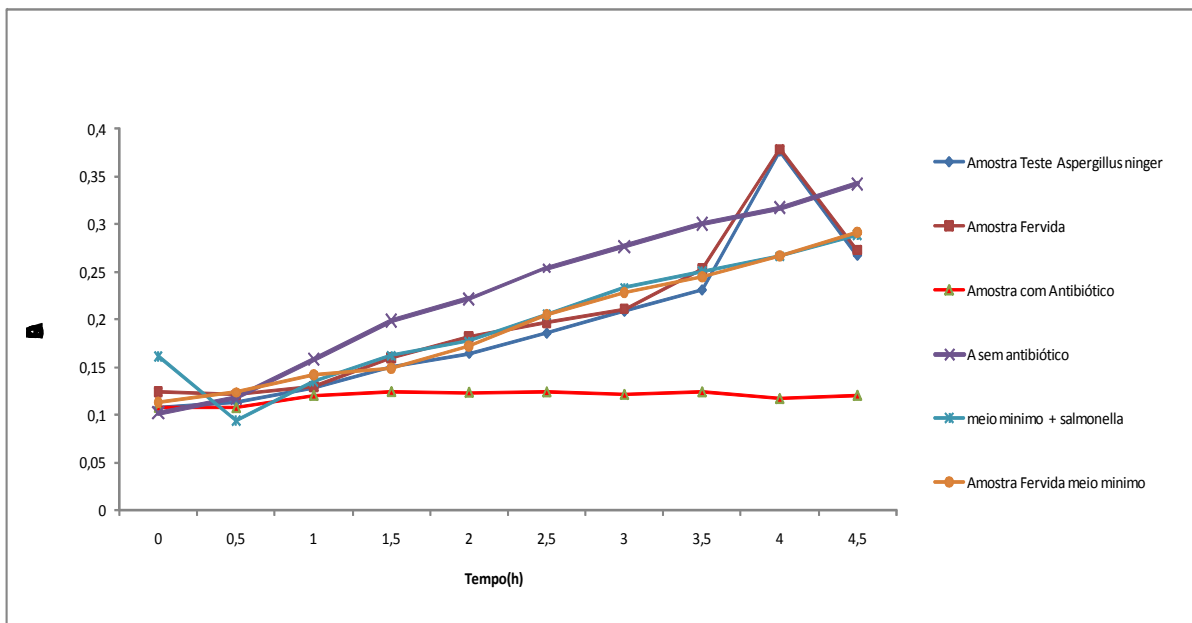


Figura 8 Atividade inibitória do fungo *Aspergillus niger* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Salmonella sp* utilizando amostra liofilizada.

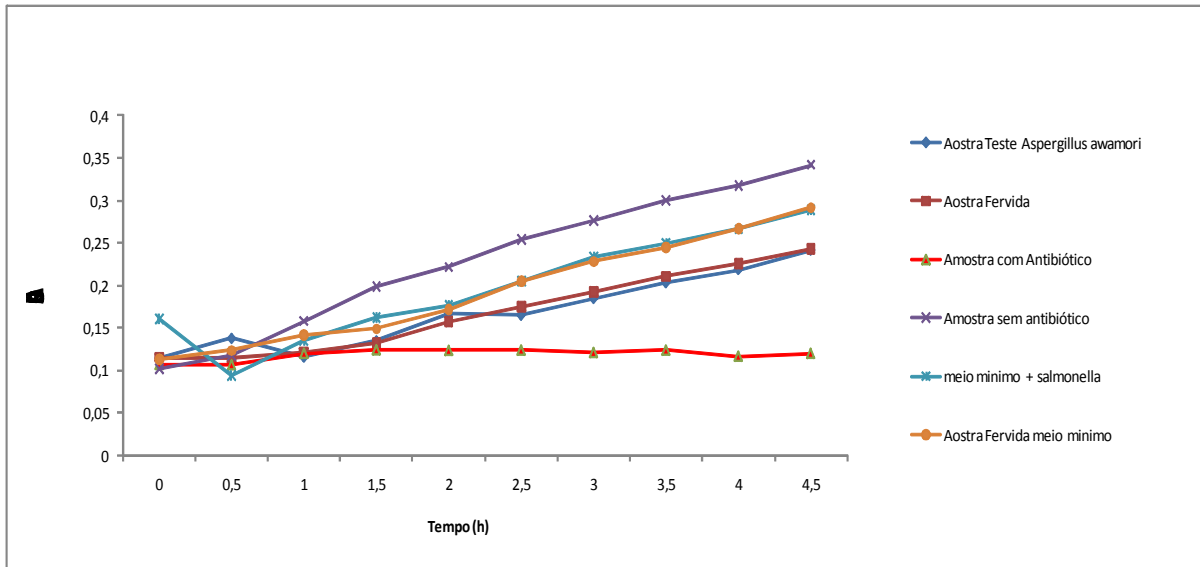


Figura 9 Atividade inibitória do fungo *Aspergillus awamori* cultivado em meio mínimo por 96h contra a bactéria *Salmonella sp* utilizando amostra liofilizada.

As amostras (96 horas de cultivo e liofilizadas) dos filtrados das culturas dos fungos *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. awamori* não inibiram o crescimento bacteriano, quando comparados ao antibiótico cloranfenicol (Figuras 7, 8 e 9). Por isto, estes ensaios foram realizados com os filtrados das culturas dos tempos de cultivo de 48h e 72h, mesmo assim estas amostras não apresentaram inibição sobre o crescimento bacteriano (Figuras 8 e 9).

Cabe ressaltar que a capacidade de um composto de apresentar atividade inibitória não é suficiente para sua utilização na formulação de antibióticos, é importante considerar também a sua toxicidade e dosagem necessária. Existem alguns antibióticos que quando utilizados causam lesões teciduais tão grandes que mesmo que a infecção seja contida compromete a saúde do paciente em função dos seus efeitos colaterais. O grande problema de uma infecção bacteriana é o início do uso de algum antibiótico de forma inadequada, que impede que o antibiótico atinja os níveis de concentração desejados para matar as bactérias podendo levar a morte da microbiota normal e o predomínio da bactéria causadora da infecção. Esse mau uso tem diminuído muito a atividade de importantes antibióticos, o que ressalta a importância da busca de novas drogas, associações ou esquemas terapêuticos.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o extrato do fungo *A. flavus*, são apenas uma fração do que se pode obter com mais pesquisas nesta área. Mesmo que essas moléculas não possam ser utilizadas “in vivo” no combate destas bactérias, elas podem ser utilizadas para a formulação de produtos para limpeza de superfície de materiais cirúrgicos, e até mesmo nas salas de cirurgias em hospitais. O emprego desses resultados pode ser de grandes aplicações comerciais e industriais. A continuidade na identificação da molécula responsável pelos resultados de inibição neste trabalho deve continuar visto que a atividade inibitória abrangeu várias bactérias causadoras de enfermidades em humanos e que estão entre as bactérias portadoras de genes de resistência.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – ONOFRE, S. B; RIVEIROS, R; COSTA, S. O. P; BARROS, N. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Sanson. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 3(1): 29-33, 1999.
- 2 - PEREIRA, A. L; PITA, J. R. Alexandre Fleming (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel (1945). *Revista da faculdade de letras. Porto Alegre, III série, volume 6, PP. 129-151*, 2005.
- 3 - GLECKMAN R. Selected issues in antibiotic resistance. *Infect Med.*, 21(3):114-122, 2004.
- 4 - JUNIOR, M.A.S, FERREIRA, E.S, CONCEIÇÃO, G.C. Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL), um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico p. 152-174 *NewsLab - edição 63* – 2004.
- 5 – GOOSSENS, H.; FERRECH, M.; VANDER STICHELE, R.; ELSEVIERS, M. For the ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a crossnational database study. *Lancet*, 365: 579– 87, 2005.
- 6 – LOPES, H. V. Antibiotics, resistance and a new action mechanisms. *Rev. Panam. Infectol.*, 11(2): 67-68, 2009.
- 7 - ALI, M. F.; SOTO, A. M.; KNOOP, F. C. E CONLON, J. M. "Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae)". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, v.1550, n.1, p.81-89-2001.
- 8 - ALMEIDA, H. O. ; [MATTOS, E. C.](#); [BARBOSA, MEIRE DE OLIVEIRA](#) ; [TEIXEIRA, FELIPE R](#) ; MAGALHÃES, R. D. M. ; [ROMEIRO, SILVA. R](#) ; [BATISTA .E. P](#) ; PEREIRA, M. C; Peptide-Fraction Inhibiting Plant-Pathogen Growth Predominated in Cell-Wall Extracts from Young Plants or in Soluble-Cell Fraction from Expanded-Leaves from Eggplants. *Journal of Phytopathology*. v. 155, p. 735-737, 2007.
- 9- ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F. e ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Dep. de Fitopatologia/Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, RAPP – Volume 13*, 2005.
- 10 – VENDRUSCOLO, E.C.G. Silenciamento Gênico e Transgênico. *Revista Biotecnologia* 31: 8-13, 2003.
- 11- LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, LONDRINA, PR, BRASIL; Epigenética e neo-oogênese: novos conceitos em foliculogênese; *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte*, v.33, n.3, p.111-117, jul./set. 2009.
- 12 - ARISH, A. A; KRISPIN, D. F; FRICKE, T; TZFIRA, T; CITOVSKY, V; WOLF, S. G; ELBAUM, M. Three-dimensional Reconstruction of Agrobacterium VirE2 Protein with Single-stranded DNA. *Vol. 279, No. 24, Issue of June 11, pp. 25359–25363*, 2004.

- 13 – SCOTT, E. BAKER. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the Future. *Medical Mycology* 44, S17\_S21, September 2006.
- 14 – NIERMAN. W. C; MAY.G; KIM.H.S; ANDERSON.M.J; CHEN.D; DENNING D. W; What the *Aspergillus* genomes have told us; *Medical Mycology Supplement 1*, 43, S3-S5, 2005.
- 15- SCOTT E. BAKER; *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the Future; *Medical Mycology* 44, S17-S21, September 2006.
- 16- VICTOR, O.T; OGBE, S. B; ERIOLA, B. KOLAWOLE, L. K; BAMIKOLE, A. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (6), pp. 150–152, June 2003.
- 17- ROCHA,M. D; MAIA,P.P; RODRIGUES, M. A. C; MARTINS, I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. *Revista Brasileira de Toxicologia* 21, n.1, 15 – 19, 2008.
- 18- G. A. PAYNE, W. C. NIERMAN, J. R. WORTMAN, B. L. PRITCHARD, D. BROWN, R. A. DEAN, D BHATNAGAR, T. E. CLEVELAND, MASAYUKI MACHIDA & J. YU; Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*; *Medical Mycology* 44, S9-S11, September 2006.
- 19 - MENDONCA, N., LEITAO, J., MANAGEIRO, V., FERREIRA, E. E CANICA, M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1946-1955 - 2007.
- 20 – NOIA, A. S; Cefalosporinas e suas interações medicamentosas: abordagem para a equipe de enfermagem; *Prática hospitalar ano IX n° 54*, nov-dez/2007.
- 21 – VUJAKLIJA.D; ABRAM.M; IVANA.L; JASENKA P; *Streptomyces rimosus* GDS(L) Lipase: Production, Heterologous Overexpression and Structure-Stability Relationship; D. VUJAKLIJA et al.: *Streptomyces rimosus* GDS(L) Lipase, *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 89–93, 2003.
- 22 – EDUARDO. E. R; Vancomicina; *Rev. Panam. Infectol.* 6(7):70-71, 2008.
- 23 - LOPES, H. V. The current role of vancomycin in the staphylococcal infections. *Rev. Panam. Infectol.* 9(3):70-71, 2007.
- 24 - HOFMANN, H. A. Antimicrobial peptides: *Nature Reviews Microbiology*, v.4, n.7, p.248-260 – 2006.
- 25- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria". *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n.3, p.238-250 – 2005.
- 26 – DAFFRE.S; MIRANDA.A; TERESA M. M; BULET.P; Peptídeos antibióticos; *Biociência & Desenvolvimento* - n° 23 - novembro/dezembro 2001.

- 27 - TAVARES, LS; RETTORE, JVP; SINGULANI, JL; DUQUE, APN; SILVA, ON; FRANCO, OL; SANTOS, MO; Atividade antimicrobiana do Pg-AMPrecombinante, um peptídeo rico em glicina, isolado de goiaba (*Psidium guajava* L.); *Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética* • 30 de agosto a 02 de setembro de 2009.
- 28 – MOLAND.J, E. ET AL. Plasmid-mediated, carbapenemhydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, n. 3, p. 711-4, 2003.
- 29 – MARÍN.R.Z; REGATEIRO.A.A; GUNDIÁN.J; MANRESA.R.; SÁNCHEZ.J SIRGADO.R.M; Cefalosporinas; *Acta Medica* 8(1):40-7, 1998.
- 30 - [http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct\\_recursos\\_biologicos.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf) Acessado em 2 de março de 2010.
- 31 – OLIVEIRAI. A.C; SILVA.R.S; Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana; *Revista Eletrônica de Enfermagem*. 10(1):189-197, 2008.
- 32 - WALTER TAVARES; Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(3):281-301, mai-jun, 2000.
- 33 – ANDRADE. D; LEOPOLDO. V.C; HAAS.V.J; Occurrence of Multi-Resistant Bacteria in the Intensive Care unit of a Brazilian Hospital of Emergencies; *Revista Brasileira Terapia Intensiva Volume 18 - Número 1 - Janeiro/Março* 2006.
- 34 - ELISA M. JUKEMURA, MARCELO N. BURATTINI, CARLOS A.P. PEREIRA, ALFÉSIO L.F. BRAGA; EDUARDO.A.S. MEDEIROS1; Control of Multi-Resistant Bacteria and Ventilator-Associated Pneumonia: Is It Possible with Changes in Antibiotics; *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11(4):418-422, 2007.
- 35 – MOTA. R. A; SILVA. K. P. C; FREITAS. M. F. L; Wagner José Nascimento PORTO1; Leonildo Bento Galiza da SILVA; Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana; *Braz J vet Res anim Sci, São Paulo*, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- 36 – ROSA.S.R.G; SILVA. M. R; A História da Ciência nos Livros Didáticos de Biologia do Ensino Médio: uma análise do conteúdo sobre o episódio da transformação bacteriana; *Revista de Educação em Ciência e Tecnologia*, v.3, n.2, p.59-78ISSN 1982-5153, jul. 2010.
- 37 – ELAINE. C; SANDRA. E; CALUZI. J. J ; As interpretações dos estudos de Avery, MacLeod e McCarty sobre a natureza química do “fator transformante” em bactérias; *Filosofia e História da Biologia*, v. 3, p. 71-94, 2008.
- 38 - ROCHA, M.J.S.P. - Caracterização do perfil cinético da gentamicina e vancomicina em recém-nascidos prematuros. Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra, Portugal, 2006. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/handle/10316/545>. Acesso em 20/03/2010.

- 39 – CHOI. K. H; KANG-JU. K; Applications of Transposon-Based Gene Delivery System in Bacteria ; J. Microbiol. Biotechnol. (2009), 19(3), 217–228 doi: 10.4014/jmb.0811.669 First published online 23 January 2009.
- 40 – FERREIRA. H; PERES. E. L; *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde; *Rev Panam Infectol* 12(2):44-50, 2010.
- 41 - TIBA, M. R; NOGUEIRA. G; LEITE. D ; Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(1):58-62, jan-fev, 2009.
- 42 - TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 33(3):281-301, 2000.
- 43 - BATISTA, C. V. F.; SCALONI, A.; RIGDEN, D. J.; SILVA, L. R.; RODRIGUES ROMERO, A.; DUKOR, R.; SEBEN, A.; TALAMO, F. E BLOCH, C. "A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*". *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.494, n.1-2, p.85-89 – 2001.
- 44 - AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J. E SUBRA, G."Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis". *Molecular Biotechnology*, v.33, n.3, p.239-254- 2006.
- 45 - SMITH MOLAND, E. et al. Plasmid-mediated, carbapenemhydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob Chemother*, v. 51, n. 3, p. 711-4, 2003.
- 46 – GILIO, A. E. e LO, D. S. Uso de macrolídeos nas infecções de vias aéreas superiores da criança; *Pediatrics (São Paulo)* 25(3):81-3, 2003.
- 47 - YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 4, p. 1151-61, 2001.
- 48 - MALTEZOU, H. C., GIAKKOUI, P., MARAGOS, A., BOLIKAS, M., RAFTOPOULOS, V., PAPAHAZAKI, H., VROUHOS, G., LIAKOU, V. E VATOPOULOS, A. C. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect* , 58: 213-9 - 2009.
- 49 - GRÄF,T.; FUENTEFRIA, D. B. e CORÇÃO, G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>SPM-1</sub> em amostras clínicas; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(3):306-308, mai-jun, 2008.
- 50 - FURTADO. A. R; Atividade antibacteriana do *Aspergillus flavus*; Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.41 nº 1 Rio de Janeiro Aug. 1944.