

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA O DESENVOLVI- MENTO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS

Trabalho submetido por

Bernardo Pereira Martins Dias Lopes

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA O DESENVOLVIMENTO
DE NOVOS ANTIBIÓTICOS**

Trabalho submetido por

Bernardo Pereira Martins Dias Lopes

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Carla Ascenso

novembro de 2023

AGRADECIMENTOS

“Finalmente” é a única palavra que descreve todo este processo. Parece que a ouço em eco na minha cabeça, ouço-a no miar das minhas gatas e no farfalhar das folhas das árvores ao vento. Com este trabalho, encerro um capítulo da minha vida e começo um novo. Este capítulo não foi algo que fiz sozinho, muito pelo contrário.

Antes de mais, queria agradecer à minha fantástica orientadora, a Prof^a Carla Ascenso. Sem a orientação dela provavelmente estaria na posição fetal no chão do meu quarto a repensar todas as escolhas que fiz na vida. Foi a orientação da Prof^a Carla que me motivou, desafiou e impulsionou. Um “puxão de orelhas” quando precisei, e um “está quase” quando mereci.

Gostaria também de agradecer à minha família: aos meus pais, aos meus tios, à minha irmã e aos meus sobrinhos lindos e maravilhosos. Sempre me impulsionam para dar o meu melhor. Um obrigado especial para os meus avós, que infelizmente já não estão cá para ver, mas sei que ficariam orgulhosos.

Gostaria de agradecer também a todos os meus professores que me deram o conhecimento e as ferramentas necessárias para eu lidar com todas as situações que possam surgir. Sinto que saí deste curso extremamente bem preparado para o meu futuro.

Um enorme beijinho às amigas que me acompanharam nas trincheiras, não vou esquecer as sessões de estudo virtual em preparação para os testes. De certa forma já tenho saudades delas.

Por último, obrigado Egas Moniz, foste uma casa longe de casa.

Obrigado.

RESUMO

Cada vez mais surgem novas estirpes bacterianas multirresistentes, resistentes ao arsenal de antibióticos disponíveis para as combater (Huemer et al., 2020), constituindo uma das maiores ameaças para a saúde pública da atualidade (Hess, 2021). É estimado que até 2050 o número de infecções provocadas por estirpes multirresistentes ultrapassará os 10 milhões mundialmente e que estas levarão a um aumento significativo de mortes, ultrapassando o número de mortes provocadas por cancro (The Review, 2014).

Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento de resistências, como a utilização incorreta de antibióticos, o que inclui a utilização em excesso de antibióticos de largo espectro, a aquisição de resistências devido a transferência horizontal de genes específicos como também um processo evolutivo por parte das bactérias (Courvalin, 2016).

No lado da indústria, o *pipeline* para novos antibióticos encontra-se escasso por diversos motivos, como o elevadíssimo custo de pesquisa e desenvolvimento. A ausência de novos antibióticos deixa poucas opções para o combate contra o aparecimento destas estirpes (Lewis, 2015). Por este motivo é essencial o desenvolvimento de novos antibióticos como também desenvolver estratégias para a ideação de novos antibióticos que se alarguem para além dos convencionais utilizados até hoje.

Estas estratégias têm incluído a pesquisa de novos alvos terapêuticos (Lewis, 2015), a inibição dos mecanismos de resistência antibiótica microbiana (Wetzel et al., 2021), a adoção do conceito *multi-target* (Wetzel et al., 2021), a utilização de péptidos antimicrobianos (Boparai & Sharma, 2019), o desenvolvimento de antibacterianos inorgânicos ou/e organometálicos (Hess, 2021) e a aplicação de bacteriófagos (Song & Chung, 2010).

PALAVRAS-CHAVE: novos antibióticos, resistências, alvos, antimicrobiano

ABSTRACT

New multidrug-resistant bacterial strains are emerging, resistant to the arsenal of available antibiotics used to treat them (Huemer et al., 2020), this constitutes one of the greatest threats to public health (Hess, 2021). It's estimated that by 2050 the number of infections caused by multidrug-resistant strains will exceed 10 million worldwide, and these will result in a significant increase in deaths, surpassing the number of deaths caused by cancer (The Review, 2014).

Several factors can contribute to the development of antibiotic resistance, like the incorrect use of antibiotics which includes the excessive use of broad-spectrum antibiotics, the acquisition of resistance due to the horizontal gene transfer as well as evolutionary processes by bacteria (Courvalin, 2016).

On the industry side, the pipeline for new antibiotics is scarce for several reasons, such as the extremely high cost of research and development. The absence of new antibiotics leaves few options to combat the emergence of these drug-resistant strains (Lewis, 2015).

For this reason, it is essential to develop new antibiotics, as well as to develop strategies for the creation of new antibiotics that go beyond the conventional ones used currently.

These strategies include the search for new therapeutic targets (Lewis, 2015), the inhibition of microbial antibiotic resistance mechanisms (Wetzel et al., 2021), the implementation of a multi-target concept (Wetzel et al., 2021), the use of antimicrobial peptides (Boparai & Sharma, 2019), the development of inorganic and/or organometallic antibacterials (Hess, 2021) and the application of bacteriophages (Song & Chung, 2010).

KEYWORDS: novel antibiotics, drug-resistant, targets, antimicrobial

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Enquadramento Histórico.....	11
1.2 Resistências aos Antibióticos	13
1.3 Falta de Inovação	14
2. DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Novos Alvos Terapêuticos.....	17
2.2 Inibição dos Mecanismos de Resistência.....	20
2.3 Multi-Target Drugs.....	24
2.4 Combinações Inovadoras	28
2.5 Péptidos Antimicrobianos	29
2.6 Fármacos Organometálicos	31
2.7 Bacteriófagos.....	34
3. CONCLUSÃO	39
4. BIBLIOGRAFIA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da síntese do peptidoglicano (adaptado de Galinier et al., 2023).....	17
Figura 2. Representação esquemática de um <i>riboswitch</i> ligado (adaptado de Caron et al., 2012)	19
Figura 3. Representação esquemática de um <i>riboswitch</i> desligado (adaptado de Caron et al., 2012).....	19
Figura 4. Famílias de bombas de efluxo (adaptado de Blair, Richmond et al., 2014).....	21
Figura 5. Representação de um antibiótico e a proteína alvo (adaptado de Alav et al., 2018)	23
Figura 6. Representação da modificação da Proteína Y e a sua consequência (adaptado de Alav et al., 2018).....	23
Figura 7. Representação da abordagem <i>one target, one molecule</i> (adaptado de Talevi, 2015).	24
Figura 8. Representação da abordagem de <i>Multi-Target Drugs</i> (adaptado de Talevi, 2015). 25	
Figura 9. Representação dos locais de ação da oritavancina. Oritavancina representada pela seta laranja (a) Ligação ao peptidoglicano “template”. (b) Ligação a D-alanil-D-alanina. (c) inserção na membrana celular (adaptado de Brade et al., 2016; Patti et al., 2009).....	27
Figura 10. Comparação entre estereoisómeros (adaptado de Meggers, 2009).....	32
Figura 11. Representação do ciclo lítico de bacteriófagos (adaptado de Adesanya et al., 2020)	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABC – Superfamília de proteínas transportadoras dependentes de ATP (do inglês *ATP-Binding Cassette Superfamily*)
- ABR – Resistência a antibióticos (do inglês *antibiotic resistance*)
- aPDT – Fototerapia dinâmica antimicrobiana (do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*)
- ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine tri-phosphate*)
- CDI – Infecção por *Clostridioides difficile* (do inglês *Clostridioides difficile infection*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
- EMA – Agência Europeia de Medicamentos (do inglês *European Medicines Agency*)
- FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)
- FMT – Transplante de microbiota fecal (do inglês *Fecal microbiota transplant*)
- GlmM – Fosfoglucosamina mutase
- GlmS – Glucosamina-6-fosfato sintetase
- GlmU – Glucosamina-1-fosfato acetiltransferase/N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferase
- LFU – Terapia de ultrassons a baixa frequência (do inglês *low frequency ultrasound therapy*)
- MATE – Família de proteínas de extrusão multi-antimicrobianas (do inglês *Multi Antimicrobial Extrusion Protein Family*)
- MFS – Superfamília dos Facilitadores Maioritários (do inglês *Major Facilitator Superfamily*)
- mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro (do inglês *messenger ribonucleic acid*)
- MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (do inglês *methicilin resistant Staphylococcus aureus*)
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- RND – Superfamília de Divisão Celular de Nodulação de Resistência (do inglês *Resistance-Nodulation-Cell Division Superfamily*)
- RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)
- rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal (do inglês *ribosomal ribonucleic acid*)
- SMR – Família de resistência a múltiplos fármacos (do inglês *Small Multidrug Resistance Family*)
- UDP-GlcNAc – Uridina Difosfato N-Acetilglucosamina
- VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina (do inglês *Vancomycin resistant Enterococcus*)

WOAH – Organização mundial de saúde animal (do inglês *World Organization of Animal Health*)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento Histórico

A introdução de antibióticos na clínica é considerada uma das maiores conquistas do século XX (Hutchings et al., 2019). É estimado que, desde a introdução do primeiro antibiótico, o salvarsan, a esperança média de vida aumentou, em média, 23 anos (Adadeji, 2016). Os antibióticos não só revolucionaram o tratamento de infeções bacterianas como também possibilitaram a realização de outros procedimentos médicos como o transplante de órgãos, e as cirurgias invasivas que seriam impensáveis anteriormente (Hutchings et al., 2019 e Huemer et al., 2020).

Embora o salvarsan seja considerado o primeiro antibiótico, não foi o primeiro agente antimicrobiano a ser utilizado em atos curativos. Existem registos da utilização de cataplasmas tradicionais preparados a partir de pão com bolor usados no tratamento de feridas abertas. Esta prática foi exercida na Grécia, China e Egito há mais de dois mil anos. O Papiro Ebers, que é considerado o documento médico mais antigo ainda preservado, relata a utilização de pão com bolor como também solo “medicinal” na sua lista de remédios (Hutchings et al., 2019).

Relativamente ao salvarsan, este foi sintetizado por Alfred Bertheim em 1907 no laboratório de Paul Ehrlich (Williams, 2009). A ideia de Ehrlich era encontrar o que chamava de “bala mágica”, ou seja, encontrar um composto capaz de matar os agentes causadores de doença sem causar danos ao corpo do paciente. Ehrlich estava a explorar vários compostos à base de arsénio até que encontraram a arsfenamina, na altura com o nome de composto 606, mais tarde salvarsan. Foi Sahachiro Hata, que trabalhava com Ehrlich, que descobriu a potencialidade do salvarsan, em 1909. O salvarsan mostrava bons resultados contra a bactéria causadora da sífilis e Ehrlich teorizou que os seus efeitos secundários eram devidos à sua manipulação indevida e não ao composto em si, o que hoje se sabe não ser verdade. Em 1912, Ehrlich desenvolveu o neosalvarsan que era estruturalmente semelhante, mas mais solúvel em água e menos tóxico. A utilização do salvarsan e do neosalvarsan para o tratamento da sífilis foi descontinuada após a introdução da penicilina.

Após a descoberta do salvarsan, um dos grandes avanços na quimioterapia antimicrobiana foi a descoberta de um pró-fármaco da sulfonamida, o prontossil, por Gerhard Domagk, em 1932 (Hutchings et al., 2019). Domagk era um bacteriologista e patologista que trabalhava na Bayer testando compostos para determinar se tinham potencial como fármacos. Domagk e

os seus colegas continuaram o trabalho de Ehrlich, o que levou ao desenvolvimento das sulfonamidas, que são consideradas a primeira classe de antimicrobianos eficazes e de espectro mais alargado (Hutchings et al., 2019). O prontossil é considerado o primeiro antibiótico comercialmente disponível e foi largamente utilizado durante a Segunda Guerra Mundial. Domagk chegou a utilizar o prontossil para salvar o braço da filha de ser amputado e em 1939 ganhou o prémio Nobel da Medicina, embora dadas as condições durante a Segunda Guerra Mundial, só o pôde receber em 1947 (Nobel Prize Outreach AB, n.d.).

A penicilina foi descoberta em 1928 quando Sir Alexander Fleming, um microbiologista escocês, regressou de férias e deparou-se com as placas de Petri que tinha inoculado com *Staphylococcus aureus*. As placas tinham sido indevidamente seladas levando à sua contaminação por um fungo mais tarde identificado como *Penicillium notatum* (atualmente *Penicillium rubens*). Fleming notou que em redor à colónia do fungo não havia qualquer crescimento do *S. aureus* levando Fleming a descobrir que o fungo tinha a capacidade de matar a bactéria (Wainwright, 1993). Esta descoberta despoletou uma era de desenvolvimento de antibióticos à base de produtos naturais que atingiu o seu auge em meados da década de 50. Após a descoberta inicial da penicilina por Fleming, esta foi purificada por Howard Florey, Norman Heatly, Ernst Chain e outros colegas de Oxford. Este desenvolvimento foi crucial para o desenvolvimento da penicilina como um fármaco. A estrutura da penicilina ainda não era totalmente compreendida, havia pessoas como Robert Robinson que acreditavam numa estrutura completamente diferente da realidade, mas foi Dorothy Hodgkin em 1945 que finalmente apurou que a estrutura era beta-lactâmica.

Na década dos anos 30, Selman Waksman estudou microrganismos para identificar outros potenciais produtores de antibióticos, como tinha sido o caso da penicilina. Waksman identificou actinomicetes como tal, e definiu antibióticos como compostos produzidos por um micróbio para destruir outros micróbios (Hutchings et al., 2019). A equipa liderada por Waksman identificou vários antibióticos produzidos por actinomicetes como a neomicina e a estreptomicina. A estreptomicina foi considerada o primeiro composto eficaz contra a tuberculose. O trabalho de Waksman identificou o genus *Streptomyces* como um candidato ideal para a produção de produtos naturais e eficazes contra vários agentes patogénicos como: fungos, bactérias, vírus, e até insetos (Newman & Cragg, 2016). Estes progressos iniciaram a designada “Era Dourada” de descoberta de antibióticos. Muitos dos antibióticos descobertos nessa altura ainda são utilizados atualmente, embora cada vez menos devido à aquisição de resistências. A “Era Dourada” é considerada entre 1940 a 1960, e adquiriu essa alcunha pois é estimado que cerca de

metade dos antibióticos descobertos nessa altura ainda estão em utilização atualmente (Davies, 2016).

Após a “Era Dourada”, houve um desinvestimento progressivo na descoberta de novos antibióticos. Portanto, a crise atual de antibióticos tem duas vertentes associadas: a rápida aquisição de resistências por parte das bactérias e a falta de novos antibióticos para corresponder a essas necessidades (Hitchings et al., 2019).

1.2 Resistências aos Antibióticos

A primeira resistência documentada foi à penicilina, em 1940. Na altura, a solução era descobrir novos antibióticos para substituir as classes mais antigas, esta prática provou ser insustentável a longo prazo, contribuindo para o problema das resistências (Spagnolo et al., 2021). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a resistência aos antibióticos (ABR) ocorre quando as bactérias se modificam em resposta ao uso dos mesmos (World Health Organization, 2020b). Por outras palavras, as bactérias desenvolvem mecanismos que as permitem viver na presença de agentes que anteriormente as matariam. O impacto destas resistências na saúde é severo. É estimado que são responsáveis por cerca de 700,000 morte anuais mundialmente e em 2050, infeções provocadas por bactérias resistentes irão resultar em mais de 10 milhões de mortes (The Review, 2014).

A OMS alerta que as ABR são uma das maiores ameaças à saúde mundial levando a um elevado número de infeções como a tuberculose, pneumonia e gonorreia se tornarem cada vez mais difíceis de tratar devido a antibióticos ineficazes (World Health Organization, 2020b). Estas infeções resultam em estadias prolongadas em hospitais, a um aumento dos custos associados ao tratamento, e a um aumento da mortalidade.

O impacto das resistências não se sente só na saúde, mas também noutros setores como a agricultura. Os antibióticos são largamente utilizados em criação de gado e de acordo com a World Organisation for Animal Health (WOAH) o seu uso é essencial para prevenir e tratar doenças e garantir a produção de proteína animal suficiente para consumo (La Hamaide, 2012). Por outro lado, o abuso de antibióticos em animais leva ao aparecimento de ABR e pôr em causa a eficácia dos mesmos. Bernard Vallat da WOAH realçou a importância de gerir o uso de antibióticos em animais, treinar os veterinários e terminar com o tráfico ilegal de antibióticos em países em desenvolvimento (La Hamaide, 2012).

O motivo pelo desenvolvimento de resistência aos antibióticos tem dois fatores fortemente associados: O uso incorreto de antibióticos e a aquisição natural de resistências (Huemer, 2020). O uso incorreto engloba: a aplicação de antibióticos em doses inadequadas (doses sub-terapêuticas), a automedicação e o tratamento de infecções não bacterianas com antibióticos. Foi demonstrado que independentemente da adequabilidade de uso, quanto mais se utiliza um antibiótico em particular, mais rapidamente surgem resistências (Machowska et al., 2018). As bactérias podem ter resistência inata a certos antibióticos por ausência de estruturas que seriam alvo de antibióticos. Também podem adquirir resistência por mutações genéticas, transferência horizontal de cromossomas ou transferência de plasmídeos que conferem resistência (Huemer et al., 2020). O facto de todos os antibióticos usados até agora resultarem no aparecimento de resistências, sugere que as resistências são inevitáveis (Spagnolo et al., 2021).

1.3 Falta de Inovação

Durante o período entre 1980 a 1984 registaram-se 20 novos antibióticos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), um número que contrasta com apenas três novos antibióticos aprovados entre 2005 e 2009 (May, 2014). Existe um défice de novos antibióticos face às necessidades. A ausência do desenvolvimento e de lançamento de novos antibióticos para o mercado é atribuído principalmente a três fatores: económicos, científicos e regulamentares (Rello et al., 2016).

O fator económico para o défice de novos antibióticos é devido aos baixos lucros. O processo desde a descoberta à comercialização tem uma duração média de 14 anos, isto resulta em pouco tempo em que a empresa tem para recuperar os custos que investiu antes que a patente expire e entrem no mercado medicamentos genéricos (Payne et al., 2006). Os custos associados ao lançamento de um novo fármaco são elevados e podem ascender até os 1,7 biliões de dólares (Sharma & Towse, 2010). Estes fatores fomentam um ambiente desfavorável para empresas investirem na investigação, desenvolvimento e comercialização de novos antibióticos. Por este motivo, existe maior incentivo financeiro para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças crónicas e do cancro (Bax & Green, 2015).

Pelo lado científico, é desafiante encontrar novas moléculas com atividade contra as bactérias multirresistentes ou atividade contra novos alvos e simultaneamente seguras para o paciente. A maioria de antibióticos utilizados atualmente são derivados químicos de antibióti-

cos descobertos durante a “Era Dourada” (Rello et al., 2016). Passaram seis décadas sem qualquer progresso significativo do ponto de vista clínico, por parte da indústria farmacêutica (Lewis, 2012), tendo-se registado um desinvestimento na área do desenvolvimento de antibióticos. Isto deixa médicos com poucos recursos para tratar infeções que não respondem a antibioterapia. O modelo empregue durante a “Era Dourada” de encontrar produtos naturais capazes de interferirem com o crescimento de outras bactérias é algo que atualmente é menos eficaz, pois são continuamente encontrados os mesmos compostos (Lewis, 2012). Outra abordagem, sem enveredar pelos produtos naturais, seria desenvolver novos produtos sintéticos com poder antimicrobiano, esta estratégia é mais complexa pois muitos dos alvos são intracelulares e é difícil os compostos penetrarem as células (Payne et al., 2006).

Foram enumeradas cinco razões pelo qual o processo de aprovação de novos antibióticos é difícil (Rello et al., 2016). Primeiro, é complicado reunir o número necessário para um estudo clínico de fase III, visto que são necessários aproximadamente 1000 participantes. Segundo, o consentimento informado não é facilmente obtido em pacientes que estejam em condição crítica devido a uma infeção bacteriana. Terceiro, o modelo de aprovação pelos corpos regulamentares exige um estudo de não inferioridade, o que exige que o novo antibiótico seja não inferior à seleção atual. Quarto, nos Estados Unidos da América a FDA aprova os antibióticos com base na sua indicação, não pelo espectro que estes apresentam. Por último, existe uma falta de coordenação entre a FDA e a European Medicines Agency (EMA) sobre os processos de licenciamento. Para tentar incentivar o desenvolvimento de novos antibióticos foram propostas políticas destinadas a facilitar como o *Generating Antibiotics Incentives Act* que foi aprovado pelo congresso dos EUA, em 2012, e visa aumentar o período de patente em novos antibióticos. De acordo com um estudo da Pew (2021) estavam em desenvolvimento em dezembro de 2020, 43 novos antibióticos.

A importância de antibióticos para a saúde pública é imensurável. De momento, a procura de novos antibióticos está elevada devido ao surgimento de resistências à seleção atual. A pesquisa para novos antibióticos está dificultada por fatores económicos, científicos e regulamentares o que resulta em menos antibióticos chegarem ao mercado ano após ano. Por estes motivos, estratégias inovadoras são necessárias para satisfazer as necessidades da saúde.

2. DESENVOLVIMENTO

Os antibióticos do futuro necessitam de uma abordagem inovadora. A prática de descobrir novos antibióticos para substituir as classes já existentes foi a prática empregue até a atualidade. É importante definir novas estratégias para combater infecções bacterianas multirresistentes e simultaneamente reduzir ao máximo a nova aquisição de resistências. Uma revisão da literatura revelou várias abordagens inovadoras para realizar este objetivo tais como a pesquisa de novos alvos terapêuticos, a inibição de mecanismos que conferem resistência, o uso de *multi-target drugs* (fármacos de múltiplos alvos), combinações inovadoras, o uso de péptidos antimicrobianos, o uso de fármacos organometálicos, e o uso de bacteriófagos.

2.1 Novos Alvos Terapêuticos

Os antibióticos atuam sobre as bactérias com o objetivo de as matar (bactericida) ou de impedir o seu crescimento (bacteriostático). É necessário explorar para além dos alvos conhecidos para definir novos recetores e encontrar moléculas seguras que os possam modular.

O peptidoglicano é o principal constituinte da parede celular bacteriana. É responsável pela integridade e forma da célula como também confere proteção do meio ambiente. A síntese do peptidoglicano (figura 1) é uma via metabólica essencial no ciclo de vida das bactérias, sendo fundamental para a divisão e alongamento celular. É uma via complexa que tem início no citoplasma e finaliza no exterior da membrana citoplasmática, envolvendo diferentes enzimas e constituintes, os quais são potenciais candidatos como recetores de novos antibióticos.

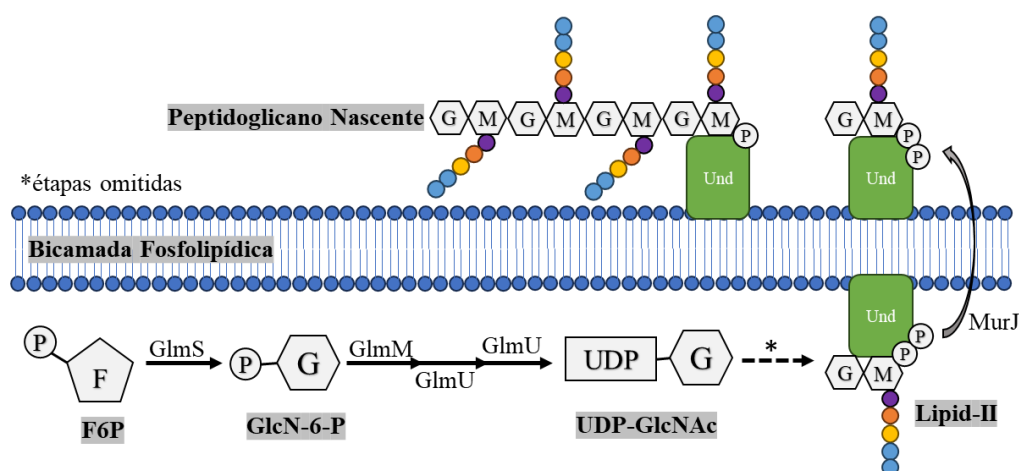


Figura 1. Esquema simplificado da síntese do peptidoglicano (adaptado de Galinier et al., 2023)

De facto, vários antibióticos comercializados atuam nesta via, quer como inibidores enzimáticos (e.g. penicilinas e cefalosporinas), quer como bloqueadores estéreis (e.g. vancomicina) (Garde et al., 2021).

Uma estratégia proposta é o bloqueio da síntese do peptidoglicano inibindo a síntese de uridina difosfato *N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), um nucleótido precursor formado intracelularmente na primeira fase da síntese do peptidoglicano (Wyllie et al., 2022). De acordo com os autores, apenas uma fração de compostos envolvidos no processo da biossíntese do peptidoglicano foram explorados como potenciais alvos. Muitos destes alvos incluem enzimas que estão diretamente envolvidos na biossíntese de UDP-GlcNAc, as enzimas propostas podem ser visualizadas na figura 1. A UDP-GlcNAc também está presente em eucariotas, mas a sua função e biossíntese são diferentes. Enquanto em procariotas a função é para a síntese do peptidoglicano, que é essencial para a formação da parede celular bacteriana, em eucariotas a sua função é como precursor de biomoléculas como quitina e glicoproteínas. A biossíntese de UDP-GlcNAc é diferente em procariotas e eucariotas e envolve enzimas diferentes, estas enzimas são alvos atraentes para novos antibióticos. As enzimas em procariotas são Glucosamina-6-Fosfato Sintetase (GlmS), Fosfoglucoamina Mutase (GlmM), e Glucosamina-1-Fosfato Acetiltransferase/*N*-Acetilglucosamina-1-Fosfato Uridiltransferase (GlmU). Estruturalmente, as enzimas foram estudadas e comparadas às suas homólogas eucariotas para determinar diferenças e concluíram que havia diferenças significativas, embora também bastantes semelhanças. Foram propostas diversas moléculas com capacidade de inibir a atividade de cada uma das enzimas e estudou-se a sua viabilidade como potencial antibiótico. Embora os autores tenham observado atividade na inibição *in vitro* das enzimas GlmS, GlmM e GlmU, registaram dificuldades com bactérias inteiras. Algumas das moléculas propostas não foram capazes de atravessar a membrana celular bacteriana com eficiência, o que impediu que elas exercessem a sua função, o que levou à proposta de coadministrar o inibidor das enzimas juntamente com um adjuvante de permeabilidade (Wyllie et al., 2022).

Um componente celular que tem vindo a ganhar mais atenção como potencial alvo terapêutico são os *riboswitches*. *Riboswitches* são segmentos de mRNA que não codificam para proteínas, mas que atuam como reguladores de expressão de genes (Blanco & Blanco, 2022). São compostos por um aptâmero e a plataforma de expressão. O aptâmero liga-se diretamente a pequenas moléculas específicas que reconhece e esta ligação provoca uma alteração conformational na plataforma de expressão (figura 2). A plataforma de expressão regula a região codificante (Blount & Breaker, 2006).

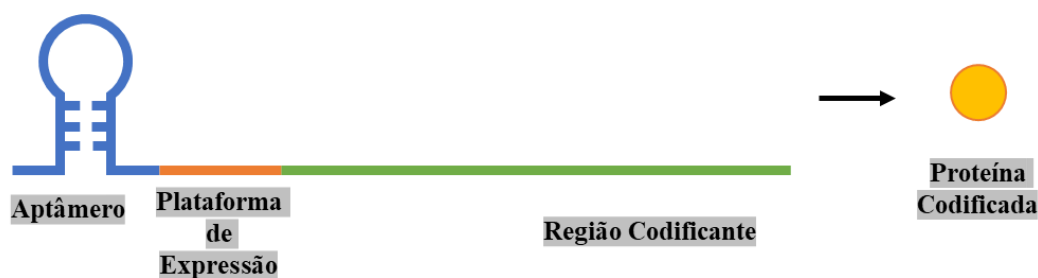


Figura 2. Representação esquemática de um *riboswitch* ligado (adaptado de Caron et al., 2012)

Nos últimos 20 anos descobriram-se mais de 55 tipos distintos de *riboswitches*, cada um com afinidade a diferentes moléculas (Kavita & Breaker, 2022). Os *riboswitches* exercem uma função reguladora na biossíntese de vários constituintes intracelulares, num sistema de *feed-back* negativo. Por outras palavras, o mRNA que tenha presente um *riboswitch* irá ligar a uma molécula específica, esta ligação irá alterar a produção da proteína resultante, logo este mRNA tem uma função de autorregulação na produção da proteína que codifica. Muitos *riboswitches* codificam para proteínas que são o próprio metabolito regulador: na ausência de metabolito na região de reconhecimento (aptâmero), ocorre tradução de proteína (figura 2); quando esta proteína se encontra em quantidades suficientes, atua como metabolito de ligação ao aptâmero e bloqueia a tradução, num processo de autorregulação a sua própria tradução (figura 3).

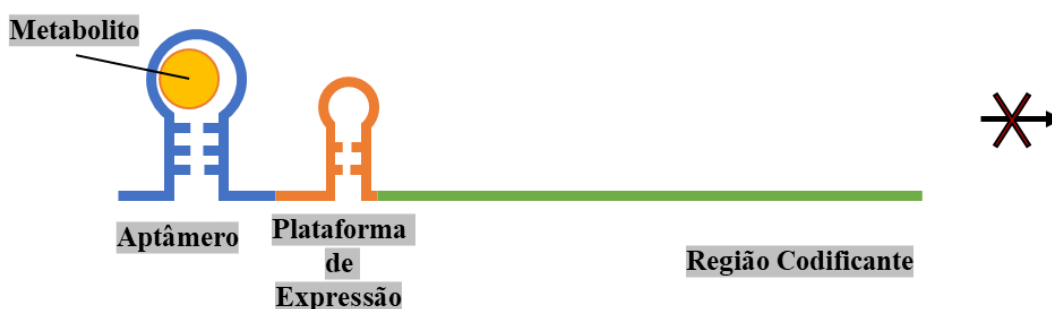


Figura 3. Representação esquemática de um *riboswitch* desligado (adaptado de Caron et al., 2012)

Inicialmente considerados exclusivos de células procariotas, os *riboswitches* foram mais tarde encontrados em eucariotas (Blanco & Blanco, 2022). A relevância dos *riboswitches* como alvos terapêuticos no desenvolvimento de novos antibióticos foi demonstrada em estudos (Aghdam et al., 2016). Por um lado, os *riboswitches* são compostos por 35 a 200 nucleótidos e

apresentam elevada seletividade na formação de complexos com ligandos específicos (pequenas moléculas) (Blount & Breaker, 2006) o que faz deles recetores terapêuticos com maior potencial do que o RNA ribossomal (rRNA) (Penchovsky & Stoilova, 2012). Por outro lado, como a maioria dos *riboswitches* se encontram em procariotas, isto reduz a possibilidade de interferir com o funcionamento celular dos eucariotas (Cheah et al., 2007). O potencial dos *riboswitches* procariotas como alvos terapêuticos começou já a ser investigado (Aghdam et al., 2016). Foram utilizados análogos de lisina para inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* e determinou-se que os *riboswitches* serviam como mediadores de crescimento (Blount et al., 2006). Isto foi devido ao facto de três dos 12 análogos identificados interferiam com a taxa de crescimento.

Para além da necessidade de desenvolver novas moléculas antibióticas para tratar infeções multirresistentes, é igualmente necessário pesquisar e definir novos alvos terapêuticos. A síntese do peptidoglicano é uma etapa crucial no ciclo de vida das bactérias e alguns dos antibióticos atuais atuam nesta etapa, mais ainda existem muitos intervenientes que poderiam ser explorados como potenciais alvos para desenvolver novos antibióticos. Os *riboswitches* também são alvos apelativos para novos antibióticos, sendo um alvo mais comumente encontrado em bactérias e cuja inibição impacta o crescimento bacteriano. A totalidade dos *riboswitches* ainda não foi determinada, deste modo ainda existe o potencial para descobrir novas formas de erradicar infeções bacterianas multirresistentes.

2.2 Inibição dos Mecanismos de Resistência

Estudos sugerem que a aquisição de resistências é inevitável (Spagnolo et al., (2021). Uma estratégia para superar estas resistências é determinar formas de as suprimir. Os principais mecanismos de resistências, encontrados na literatura podem resumir-se em três categorias diferentes: redução das concentrações intracelulares de antibiótico, modificação do alvo, e a inativação do antibiótico (Blair, Webber et al., 2015). Um dos exemplos mais proeminentes de superar um mecanismo de resistência foi a introdução de compostos beta-lactâmicos, compostos que, embora sem atividade antimicrobiana, inibem eficazmente beta-lactamases. Um exemplo é o ácido clavulânico. As beta-lactamases são enzimas do metabolismo bacteriano que têm os antibióticos beta-lactâmicos como substrato e catalisam a reação de abertura do anel que lhes dá o nome, com consequente perda de atividade antibiótica. Atualmente sabe-se existirem

perto de 2800 enzimas diferentes, que emergiram de forma natural (Bush, 2018). O ácido clavulânico inibe a atividade das beta-lactamases, ligando-se a estas enzimas e impedindo que estas inativem o antibiótico, desta forma o antibiótico consegue realizar a sua função (Uto & Gerriets, 2023). A descoberta de novos inibidores de beta-lactamases, particularmente inibidores de carbapenemases, é essencial. A resistência a carbapenemos foi já declarada pela OMS como um problema sério a nível mundial e sendo estes antibióticos normalmente administrados para o tratamento de infeções resistentes, resistências aos mesmos é realmente preocupante (Nordmann & Poirel, 2019). Inibidores de carbapenemases lançados nos últimos anos (vaborbactam e relebactam) mostram ser promissores no combate a infeções multirresistentes (Bou Zerdan et al., 2022).

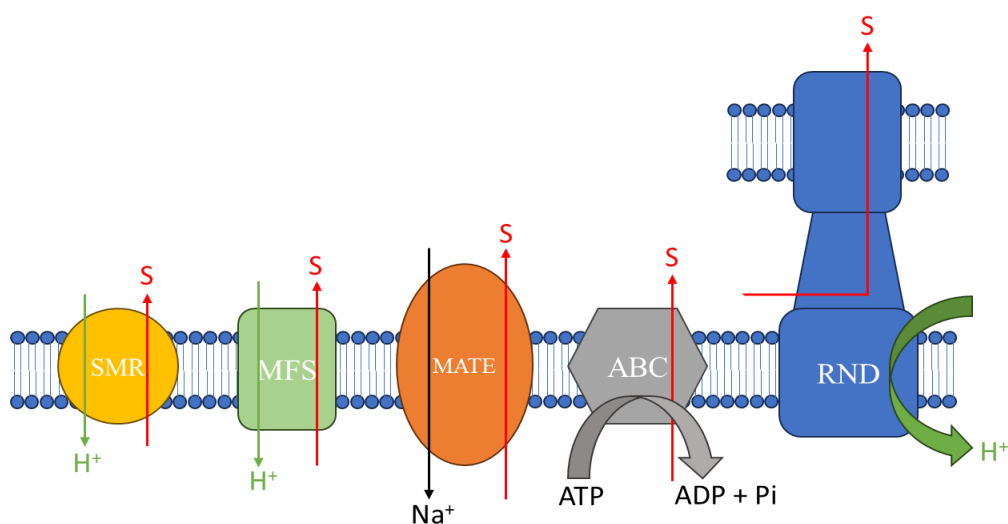


Figura 4. Famílias de bombas de efluxo (adaptado de Blair, Richmond et al., 2014)

Um mecanismo de ação comum a bactérias Gram-negativo e Gram-positivo é a utilização de bombas de efluxo. Bombas de efluxo são proteínas responsáveis pela remoção de certos conteúdos do interior de células bacterianas. Estes conteúdos podem incluir antibióticos, poluentes orgânicos, metabolitos bacterianos e metais pesados (Blanco et al., 2016). As bombas de efluxo podem ser classificadas em cinco superfamílias distintas mediante a sua sequência de aminoácidos e a sua fonte de energia. Existe a *Major Facilitator Superfamily* (MFS), a *ATP-Binding Cassette superfamily* (ABC), a *Small Multidrug Resistance family* (SMR), a *Resistance-Nodulation-Cell Division superfamily* (RND) e a *Multi Antimicrobial Extrusion protein family* (MATE). A família RND é a única exclusiva para bactérias Gram-negativo, as famílias e a sua fonte de energia estão representadas na figura 4. (Delmar et al., 2014). Na sua essência, as bombas de efluxo conferem resistência às bactérias removendo antibióticos do

interior das células para o exterior. Uma estratégia adequada para superar esta resistência seria determinar uma maneira de inativar as bombas de efluxo bacterianas para permitir a acumulação de antibiótico no citoplasma. Vários mecanismos de ação foram propostos para atingir este objetivo como: interferir com a fonte energética da bomba de efluxo, ligar à bomba de efluxo no local onde o fármaco se ligaria, bloquear o funcionamento da bomba ou regular negativamente a expressão de bombas (Si et al. 2023).

Num estudo realizado para avaliar os efeitos de minociclina em monoterapia e em combinação com loperamida, um antidiarreico, em bactérias suscetíveis (Ejim et al., 2011) verificou-se que, embora a loperamida não tenha qualquer atividade antimicrobiana, a loperamida foi capaz de dissipar os componentes elétricos responsáveis pela fonte de energia das bombas de efluxo. A minociclina sozinha revelou-se um bactericida eficaz, mas quando administrado juntamente com a loperamida foi possível administrar uma dose de minociclina 32 vezes inferior para obter resultados iguais (Ejim et al., 2011).

A modificação de um alvo terapêutico é um processo complexo. Estruturas bacterianas que são utilizadas como alvo terapêutico têm o seu papel no crescimento bacteriano. Por este motivo, a modificação destes alvos pode comprometer a sobrevivência da bactéria. Para uma bactéria adquirir resistência a um determinado antibiótico por modificação de uma estrutura celular, esta modificação terá de simultaneamente preservar a sua função biológica e reduzir a sua suscetibilidade de inibição por um antibiótico (Lambert, 2005).

Usando o modelo chave-fechadura para exemplificar (figura 5), onde a chave representa um fármaco (neste caso um antibiótico) e a fechadura representa o alvo terapêutico, observa-se que o antibiótico X apresenta um farmacóforo compatível com o recetor da proteína Y, a interação dos dois resulta num efeito. No caso de um antibiótico, este poderá inibir a proteína Y. Havendo uma alteração no centro ativo da proteína Y, como resultado por exemplo de uma mutação durante a divisão celular, forma-se uma variante da proteína Y com a particularidade de não formar complexos com o antibiótico X (figura 6). Neste caso, o antibiótico X deixa de conseguir interagir com o alvo, logo, deixa de ser ativo. A alteração estrutural do alvo terapêutico exige novos estudos de caracterização do “novo” recetor, nova avaliação farmacodinâmica com diferentes compostos, pelo que a literatura tem um défice de como superar este modo de aquisição de resistência.

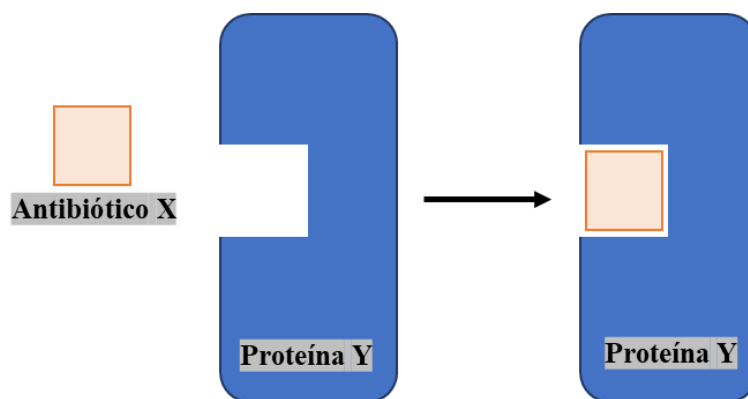


Figura 5. Representação de um antibiótico e a proteína alvo (adaptado de Alav et al., 2018)

Estudar o modo em que as bactérias adquirem resistência é crucial para analisar como conseguem-se modificar e adaptar. Com este conhecimento é possível desenvolver estratégias para conseguir superar estes mecanismos e manter as bactérias suscetíveis aos antibióticos por mais tempo.

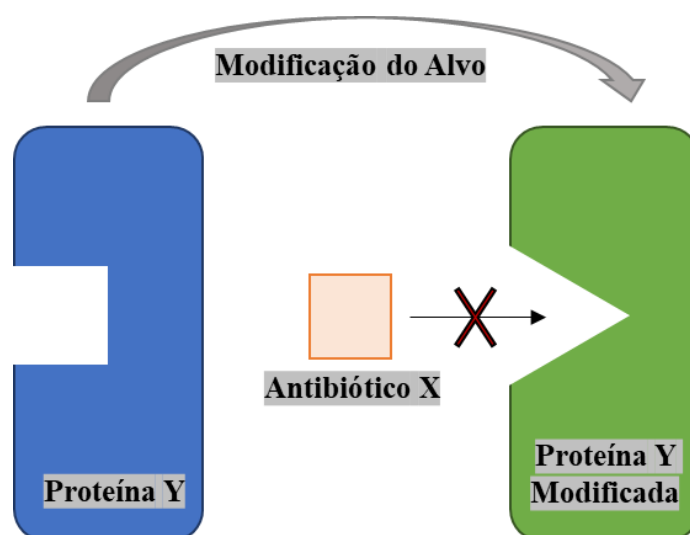


Figura 6. Representação da modificação da Proteína Y e a sua consequência (adaptado de Alav et al., 2018)

2.3 Multi-Target Drugs

O conceito de um *multi-target drug* é uma antítese de práticas anteriores, ou seja, em vez de um fármaco ter um único alvo, tem vários. Diversos estudos expressam que as necessidades para novos antibióticos não têm sido satisfeitas com abordagem atual de um alvo-uma molécula (*one target-one molecule*) e referem haver a necessidade de desenvolver fármacos que tenham efeito sinérgico e mecanismo de ação que atuem sobre múltiplos alvos (Wetzel et al., (2020). A figura 7 mostra uma representação esquemática da abordagem *one target-one molecule*, onde um fármaco só tem uma única zona de interação com o recetor alvo.

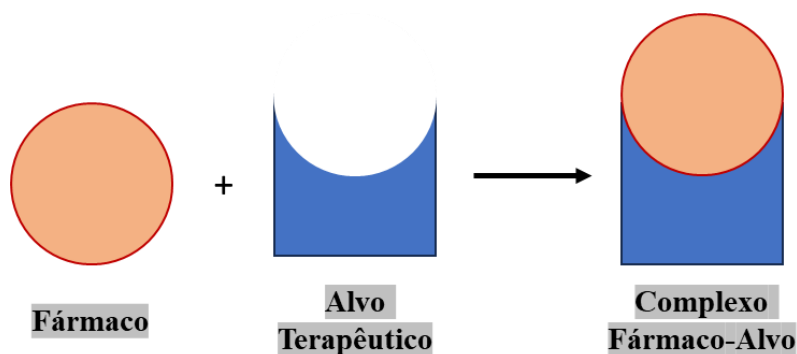


Figura 7. Representação da abordagem *one target, one molecule* (adaptado de Talevi, 2015).

O conceito *multi-target drugs*, também denominado como polifarmacologia, é diferente de politerapia. A politerapia refer-se ao uso de múltiplos fármacos seletivos para o combate de diversas condições como a diabetes e hipertensão (Ryszkiewicz et al. 2023). Dentro da polifarmacologia existem níveis distintos importantes. um fármaco *multi-target* pode ser verdadeiramente *multi-target*, multi-eficaz ou multifuncional (Gray & Wenzel, 2020). Um fármaco multi-eficaz é aquele que atua sobre um alvo que é interveniente de vários processos, pelo que a sua modulação interfere com todos os processos associados. Um fármaco multifuncional tem um alvo específico, mas também outras propriedades indiretas, como é caso da clindamicina que para além de ser antibiótico também possui atividade anti-inflamatória (Weinkle et al.,

2015). Um antibiótico verdadeiramente *multi-target* é aquele que apresenta mais de um recetor (entidade, molécula ou estrutura celular) com o qual forma complexos e do qual resulta uma atividade farmacológica, como representado na figura 8.

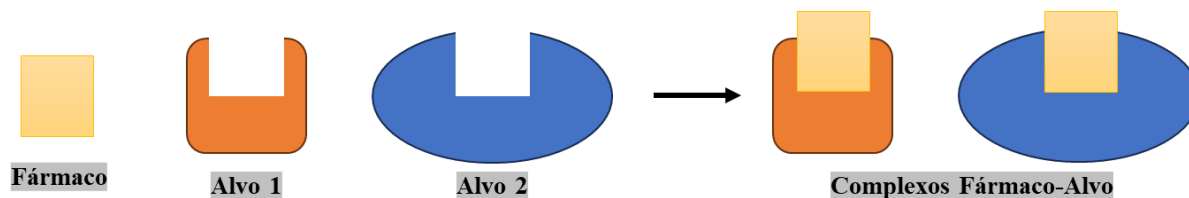


Figura 8. Representação da abordagem de *Multi-Target Drugs* (adaptado de Talevi, 2015).

Estima-se que cerca de 99% das bactérias não conseguem ser cultivadas em meios de cultura tradicionais (Nichols et al., 2010). Estas bactérias representam uma maioria ao qual não há acesso nem conhecimento suficiente e podem ser fontes de informação e produtos para uma nova geração de antibióticos. O desenvolvimento de novos e inovadores meios de cultura como o iChip permitiram o isolamento e crescimento de bactérias anteriormente desconhecidas (Nichols et al., 2010).

Ling et al., (2015) isolaram uma bactéria desconhecida a que deram o nome provisório de *Eleftheria terrae*, que mais tarde descobriram ser produtora de um antibiótico novo, designado por teixobactin. Este antibiótico mostrou ação bactericida contra bactérias Gram-positivo como a *Staphylococcus aureus* e atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* e é um exemplo de um fármaco verdadeiramente *multi-target*. O teixobactin atua por ligação a biomoléculas precursoras da parede celular, o Lipid II e o Lipid III, este último precursor do ácido teicóico da parede celular. Os ácidos teicóicos são glicopolímeros aniônicos presentes em bactérias Gram-positivo com função fundamental na determinação da forma da célula e na regulação de divisão celular (Brown et al., 2013). A ligação do teixobactin a estes componentes compromete a formação da parede celular (Ling et al., 2015), mas também apresenta um mecanismo de ação de duas frentes (Shukla et al., 2022). A porção enduracidina estabelece uma forte ligação com o grupo pirofosfato-açúcar do Lipid II enquanto, simultaneamente, o terminal-N catiónico estabelece ligação com pirofosfato de outra molécula Lipid II, desta forma destabilizado a formação da parede celular. Estudos preliminares sobre a aquisição de resistências foram efetuados e após 27 dias em concentrações abaixo da mínima inibitória não houve qualquer mutação

das bactérias (Ling et al., 2015) De momento, o teixobactin ainda se encontra em estudos pré-clínicos (Novobiotic Pharmaceuticals, 2023).

De acordo com a OMS, a tuberculose, é uma doença que embora tratável ainda resulta na morte de um milhão e meio de pessoas por ano (World Health Organization, 2020a). O tratamento requer o uso de quatro antibióticos utilizados num período de seis meses, no caso de não se detectarem resistências. Estudos realçam a importância de uma abordagem *multi-target* no tratamento da tuberculose, uma vez que se verificou começarem a surgir estirpes resistentes aos antibióticos de primeira e segunda linha (Viana et al., 2018). As cumarinas são uma família de compostos derivadas de diversas plantas e fungos. Os derivados da cumarina foram estudados e concluiu-se que estes têm interesse farmacológico devido às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-tumorais, antibacterianas e antifúngicas (Viana et al., 2018). Por poderem ser obtidos sinteticamente, foram desenvolvidos laboratorialmente novos derivados e avaliada as suas atividades antituberculosas através de estudos de relação estrutura-atividade (SAR). Um novo candidato foi sintetizado com a capacidade de inibir a proteína FadD32, esta é essencial na biossíntese do ácido micólico e, consequentemente, para a replicação bacteriana do agente causador da tuberculose, a *Mycobacterium tuberculosis* (Kuhn et al., 2016 e Kawate et al., 2013). Viana et al., 2018) acreditam no potencial antimicrobiano *multi-target* dos derivados da cumarina. Embora ainda não exista um derivado que tenha dois alvos em simultâneo, estudos *in silico* e *in vitro* mostraram a possibilidade de derivados de cumarina sintetizados adquirirem atividade inibitória contra diferentes alvos.

As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* são causadoras de infeções nosocomiais e a aquisição de resistências aos antibióticos destas bactérias são um problema cada vez com maior dimensão. A *S. aureus*, mais especificamente a variante resistente à metilina (MRSA) tem uma prevalência significativa em Portugal, representando entre 25 a 50% dos isolados (Silva et al., 2022). No caso do *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), em 2005 Portugal representava o país com maior prevalência (Novais et al., 2005). A necessidade de fármacos eficazes contra estas bactérias e aos seus mecanismos de resistência é de extrema importância. Estudos relatam que a oritavancina, um novo antibiótico estruturalmente semelhante à vancomicina, tem tido resultados promissores contra infeções de bactérias Gram-positivas (Brade et al., 2016). A oritavancina é um lipoglicopéptido semissintético aprovado pelo FDA e pela EMA para infeções da pele e tecidos moles, provocadas por bactérias Gram-positivo (Brade et al., 2016). Semelhante aos glicopéptidos, a oritavancina liga-se ao terminal D-alanil-D-alanina do Lipid II e impede que a enzima transglicosilase utilize o Lipid II para a

formação da parede celular. Estirpes resistentes à vancomicina sofrem uma alteração no terminal D-alanina para D-lactato ou D-serina, diminuindo a afinidade da vancomicina e outros glicopéptidos. A oritavancina, no entanto, apresenta mecanismos de ação secundários, capazes de superar estas resistências (Brade et al., 2016). A oritavancina apresenta dois resíduos 4-epi-vancosamina com capacidade de se ligarem a péptidos diferentes do terminal D-alanil-D-alanina, logo, mesmo se houver modificação do terminal, a oritavancina consegue estabelecer a ligação (figura 9b) (Patti et al., 2009). Na figura 9 encontram-se resumidos os mecanismos de ação exibidos pela oritavancina, representada pela seta laranja: (figura 9a) efeito inibitório a nível da polimerização do peptidoglicano, por impedimento da atividade da transpeptidase na formação das ligações cruzadas entre cadeias de peptidoglicano que compromete a formação da parede celular (Patti et al., 2009); (figura 9c) devido à sua cauda hidrofóbica, a oritavancina consegue inserir-se na membrana celular bacteriana, enfraquecendo a sua estrutura (Brade et al., 2016).

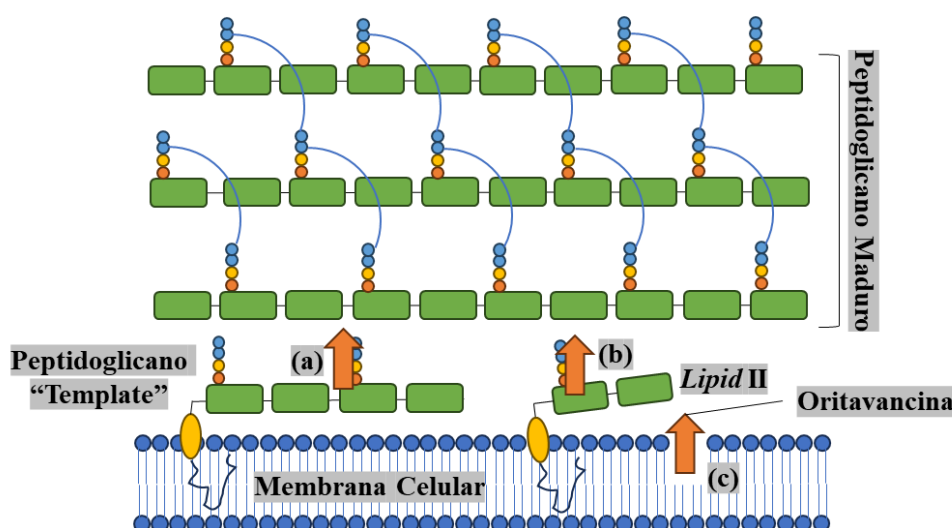


Figura 9. Representação dos locais de ação da oritavancina. Oritavancina representada pela seta laranja (a) Ligação ao peptidoglicano “template”. (b) Ligação a D-alanil-D-alanina. (c) inserção na membrana celular (adaptado de Brade et al., 2016; Patti et al., 2009)

Fármacos *multi-target* representam uma estratégia ousada para o futuro de antibióticos. Estudos sugerem que estes antibióticos serão mais eficazes do que antibióticos com um único alvo (Kahne et al., 2005). Devido aos seus mecanismos de ação múltiplos, a possibilidade de virem a provocar aquisição de resistências é estatisticamente improvável.

2.4 Combinações Inovadoras

Combinações de antimicrobianos ou de um antimicrobiano com um não-antimicrobiano tem vindo a receber cada vez mais atenção face à emergência das resistências. Combinando antibióticos poderá aumentar o espectro de ação da antibioterapia ou poderá resultar em sinergismo, ou seja, os antibióticos resultam significativamente melhor em conjunto do que individualmente. As combinações de antibióticos nem sempre resultam num efeito sinérgico, podendo só alcançar efeito aditivo ou pior, antagónico (Bremner, 2023). Um estudo feito com *Staphylococcus aureus* demonstrou que certas combinações são bactericidas menos eficazes comparando com administração individual dos mesmos agentes (Lázár et al., 2022). É necessário observar primeiro como um antimicrobiano atua por si só antes de pensar como se poderá comportar numa combinação. O uso de mais agentes antimicrobianos poderá aumentar o risco de efeitos adversos que poderão comprometer a eficácia da antibioterapia (Cai et al., 2016).

A sinergia foi alcançada num estudo onde avaliaram a eficácia de polimixina B e a amicacina individualmente e em combinação, contra *Pseudomonas aeruginosa* (Hussein et al., 2019). A polimixina B atua ligando-se à membrana bacteriana externa das bactérias Gram-negativo provocando a destabilização da mesma, enquanto a amicacina liga-se à subunidade 30S ribossomal desregulando a produção de proteínas essenciais. Esta combinação foi testada em estirpes suscetíveis e estirpes resistentes a polimixina B. Os resultados demonstraram o efeito sinérgico entre os dois antimicrobianos em estirpes suscetíveis. No caso da estirpe resistente, os resultados não foram tão promissores: a estirpe não só era resistente à polimixina B como também conseguia inativar a amicacina, limitando a sua resposta à combinação de antimicrobianos (Hussein et al., 2019).

O uso de carbapenemos aumentou como resultado do incremento de bactérias capazes de produzir beta-lactamases. Como resultado, já existem bactérias capazes de inativar os carbapenemos com carbapenemases, como o *Acinetobacter baumannii*. *A. baumannii* é um patógeno perigoso associado à aquisição de pneumonia nosocomial que leva a taxas elevadas de mortalidade (World Health Organization, 2021). Um estudo realizado avaliou a eficácia de combinação duplas e triplas *in vitro* e *in vivo* (Al-Madboly, 2022). O estudo combinou o antibiótico imipenemo com compostos sem atividade antibiótica como o ascorbato de sódio e/ou apotransferrina. Os testes *in vitro* utilizaram discos de difusão em placas colonizadas com isolados específicos. Foram utilizados para determinar a combinação capaz de originar melhores resultados e conferir sinergismo no tratamento, tendo-se determinado que ao utilizar os três compostos em conjunto havia uma inibição maior nas placas do que qualquer composto em

monoterapia ou combinação dupla. Os testes *in vivo* realizados em murganhos modelo com pneumonia também apresentaram resultados promissores. Estes estudos mostraram que a estrutura e a função pulmonar é restaurada oito horas após a administração tripla (Al-Madboly, 2022).

Diversos estudos apresentaram uma combinação fora do vulgar (Cai et al., 2017). Propuseram a combinação de antibioterapia com terapia de ultrassons a baixa frequência com base em estudos *in vivo*. No passado, estudos anteriores haviam já mostrado que a terapia de ultrassons de baixa frequência (LFU) sozinha leva a um decréscimo no número de culturas bacterianas, e sugeriram que a associação com antibioterapia tivesse um efeito sinérgico (Pitt et al., 1994). Verificou-se que a utilização de gentamicina e LFU a uma frequência de 67 kHz aumenta a atividade bactericida contra *P. aeruginosa* e *E. coli*, tendo provocado uma redução nas concentrações mínimas inibitórias de um quarto com *P. aeruginosa* e de metade com *E. coli* (Cai et al., 2017). Outros autores utilizaram frequências e tempos de exposição diferentes, logo para LFU ser um complemento viável para antibioterapia é necessária haver uma padronização destes parâmetros como também avaliar o impacto destas frequências no corpo humano.

Combinações de antibióticos com outros antibióticos ou com adjuvantes poderão aumentar a sua eficácia através de sinergia, aumentar o espectro de ação e reduzir a possibilidade do surgimento de novas resistências. Por estes motivos, é essencial descobrir novas combinações entre antibiótico e/ou adjuvantes que possam potenciar os efeitos de antibióticos e melhorar os resultados em saúde.

2.5 Péptidos Antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos consistem em cadeias curtas de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Tipicamente, os péptidos possuem entre dois a 50 aminoácidos na sua cadeia (Forbes & Krishnamurthy, 2022). A produção de péptidos antimicrobianos está presente em vertebrados, invertebrados, bactérias e plantas, faz parte do sistema imunitário inato e estes péptidos têm normalmente um espectro de ação alargado. Estruturalmente, os péptidos antimicrobianos são catiónicos e têm um grande número de resíduos hidrofóbicos. A carga positiva confere ao péptido seletividade para as membranas bacterianas que são carregadas negativamente, enquanto os resíduos hidrofóbicos auxiliam a interação com a cadeias lipídicas aciladas (Nguyen et al., 2011). Os péptidos são ferramentas promissoras em várias áreas terapêuticas e existe bastante pesquisa para a sua aplicação em áreas como a oncologia e a virologia

(Li et al., 2021 e Zahir Essa et al., 2022). Mais recentemente a sua aplicação em antibioterapia tem vindo a receber mais atenção.

Como potenciais antimicrobianos, os péptidos podem conferir algumas vantagens como a possibilidade de prevenir a formação de biofilmes ou de promover a decomposição de biofilmes existentes (Bechinger & Gorr, 2016). Os biofilmes são agregados de bactérias envolvidos numa matriz composta por componentes celulares como água, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e polissacáridos. As bactérias presentes nesta estrutura agregam-se umas às outras e aderem a superfícies. A presença de biofilmes é um risco para a saúde pois bactérias patogénicas tornam-se mais difícil de erradicar como também os antibióticos empregues têm maior dificuldade em penetrar estas estruturas (Yin et al., 2021). Os péptidos podem também apresentar propriedades anti-inflamatórias, como também propriedades anticancerígenas (Rajasekaran et al., 2018 e Tornesello et al., 2020). Outros estudos acrescentam que os péptidos são específicos para o seu alvo, têm baixas interações fármaco-fármaco, possuem toxicidade reduzida e apresentam reduzida suscetibilidade ao desenvolvimento de resistências (Boparai & Sharma, 2019). Estas vantagens tornam péptidos ferramentas atraentes para o combate contra infeções multirresistentes, mas também têm as suas desvantagens. Devido à sua estrutura proteica, estão sujeitos a lise e inativação por enzimas proteolíticas cuja concentração perto de tecidos infetados encontra-se normalmente mais elevada. A sua estabilidade físico-química é limitada, logo terá uma curta semivida de distribuição plasmática (Wang et al., 2021). Por estes motivos, grande parte do desafio dos péptidos é uma veiculação apropriada para melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade, e muita da pesquisa envolve isto. Entre as diversas estratégias já testadas para melhorar as propriedades dos péptidos encontram-se a encapsulação, a conjugação covalente, a ciclização e alteração dos resíduos de aminoácidos (Wang et al., 2021).

Devido à ubiquidade dos péptidos antimicrobianos, é possível identificar novas moléculas a partir de inúmeras fontes. As aplicações de péptidos provenientes de espécies diferentes de anfíbios foram avaliadas (Conlon & Sonnevend, 2011). A partir de nove espécies diferentes de sapos, o estudo identificou nove péptidos antimicrobianos, que eram naturalmente ocorrentes nas espécies e eram potentes, não-tóxicos, e mostravam ação antimicrobiana contra diferentes estirpes multirresistentes como a *A. baumannii*, a *K. pneumoniae*, a *E. coli*, a *S. aureus*, e *P. aeruginosa* (Conlon & Sonnevend, 2011). Adicionalmente, um dos péptidos identificados mostrou atividade contra a levedura resistente ao fluconazol, *Candida spp.*. Os autores sugerem que a falha do pexiganan em se tornar mais utilizado em prática clínica terá levado a um decréscimo no interesse em péptidos provenientes de anfíbios, mas acreditam que quando houver mais aplicações destes péptidos, haverá maior interesse por parte da indústria farmacêutica.

Foi estudado o efeito da associação de antibióticos com um péptido antimicrobiano sintético designado por *P4-9* sobre uma estirpe multirresistente de *P. aeruginosa* (Rázquin-Olazarán et al., 2020). O estudo mostrou que o péptido foi capaz de provocar danos a nível das membranas bacterianas, e tornou a bactéria mais sensível aos antibióticos. Mesmo em estirpes que expressam bombas de efluxo e beta-lactamases, o péptido mostrou-se eficaz a sensibilizar a bactéria aos antibióticos. O estudo sugere que uma bactéria multirresistente pode ficar sensível a antibióticos, mesmo em concentrações subterapêuticas, após exposição a um péptido antimicrobiano. Adicionalmente, no mesmo estudo verificou-se que o efeito antimicrobiano se prolongou mais de 20 horas após a remoção do péptido, um fenómeno que os autores designaram por *post-antibiotic effect associated permeabilization* (PAEP).

Os péptidos antimicrobianos são pequenas moléculas de origem proteica que têm ação contra infeções, inflamação e o cancro. São provenientes de diversas fontes biológicas, e têm ação demonstrada contra infeções multirresistentes. Dada a disseminação de estirpes multirresistentes e um arsenal reduzido para as combater, é estimado que o mercado global de péptidos antimicrobianos chegará a 6,6 mil milhões de dólares em 2030 (Grand View Research, 2021).

2.6 Fármacos Organometálicos

Os compostos contendo metais não são uma novidade na antibioterapia. O primeiro antibiótico utilizado, o salvarsan, continha o metaloide arsénio na sua estrutura, sendo então o primeiro antibiótico organometálico desenvolvido e utilizado. Aplicações para fármacos organometálicos foram já estudadas, sendo a área com maior volume de pesquisa a da oncologia. Os fármacos à base de platina são largamente utilizados em quimioterapia (Makovec, 2019) e trabalhos mais recentes exploram a utilização de complexos de ouro (Zhang et al., 2022), de cobre (Denoyer et al., 2018) e de ferro (Mojžišová et al., 2014) como agentes quimioterapêuticos. Alguns compostos organometálicos têm igualmente atividade antiparasitária (Hess, 2021). Desde a sua introdução em 1949, o melarsoprol permanece um medicamento essencial para o tratamento da tripanossomíase humana africana provocada pelo protozoário *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Centers for Disease Control and Prevention, 2022). Tal como o salvarsan, o melarsoprol apresenta um metaloide arsénio na sua estrutura. Embora há já bastante tempo existam registos de investigação desenvolvida com metalofármacos e com fármacos inorgânicos para aplicação em diferentes áreas da saúde, é relativamente recente o interesse nestes compostos para aplicação antimicrobiana (Frei et al., 2020).

O interesse renovado em antibióticos organometálicos e/ou inorgânicos surgiu em resposta à crise atual de resistências aos antibióticos. Os compostos antimicrobianos atualmente em desenvolvimento são baseados em fármacos já existentes, mas com pequenas modificações (Hess, 2021). Os compostos organometálicos e inorgânicos são uma abordagem fora do convencional. As aplicações dos metais em metalofármacos antibacterianos podem ser classificadas de formas diferentes, uma delas sendo a utilização de metais como estrutura base de novos compostos de modo a expandir e explorar novas geometrias.

Um complexo de metal octaédrico com seis ligandos pode ter 30 estereoisómeros diferentes comparando com um carbono com quatro substituintes, que só apresenta dois enantiómeros distintos, como pode ser visto na figura 10. A construção de novos compostos com base em complexos metálicos confere uma maior variedade de conformações como também a construção de moléculas numa conformação tridimensional, algo que é mais difícil em moléculas orgânicas (Hess, 2021). Esta diversidade inerente aos complexos de metal permite o *design* de farmacóforos, que foi explorado mais aprofundadamente e levou ao desenvolvimento de inibidores de cinase com complexos de metal na sua estrutura. As cinases foram escolhidas como potencial alvo devido à dimensão da família de enzimas e o papel que desempenha em diversas doenças (Meggers, 2009). O estudo explica também que a enzima possui um local de ligação ao ATP que é conservado, e o *design* de compostos orgânicos com este alvo tem sido desafiante. No final, conseguiram desenvolver uma molécula que incluía um complexo de metal à base de ruténio que foi inspirado na estrutura da estaurosporina. A molécula mostrou afinidade com o centro ativo da enzima em ensaios *in vitro* (Meggers 2009).

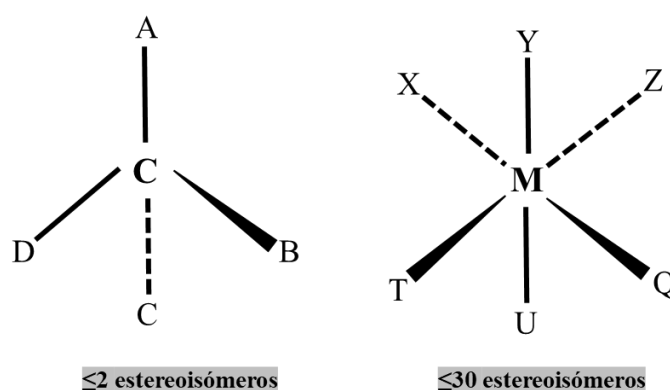


Figura 10. Comparação entre estereoisómeros (adaptado de Meggers, 2009)

Na década de 70 houve tentativas de sintetizar análogos de antibióticos existentes, como as penicilinas e as cefalosporinas, com grupos ferroceno. (Patra et al., 2011). Nenhum dos compostos sintetizados conseguiu alcançar a potência dos antibióticos originais, embora não se tenham realizado estudos para determinar as concentrações inibitórias destes novos compostos. De igual modo, não foi estabelecido se estes novos metalofármacos apresentavam mecanismos de ação idênticos aos análogos orgânicos (Patra et al., 2011). Apesar dos resultados pouco promissores, a transformação de antibióticos estabelecidos com porções organometálicas continua a ser estudado (Patra et al., 2011). A síntese de novos beta-lactâmicos com porções organometálicas continua a ser importante investigar, havendo duas possíveis abordagens no seu desenvolvimento: incorporar a porção metálica num derivado beta-lactâmico natural ou existente, ou construir o anel de quatro membros beta-lactâmico incorporando simultaneamente o complexo metálico (Sierra et al., 2019). Os autores acreditam que a segunda abordagem resulta numa maior diversidade estrutural. Revisitar antibióticos existentes com a intenção incorporar porções organometálicas é uma estratégia que parece originar “novos” antibióticos, mas é necessária mais pesquisa nesta área para determinar se estes “novos” antibióticos têm características de eficácia e segurança comparáveis aos homólogos orgânicos.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é uma alternativa não antibiótica para o tratamento de infeções microbianas, incluindo bacterianas e fúngicas. Envolve a utilização de um composto fotossensibilizante que consegue absorver energia proveniente de luz e transferir esta energia para moléculas de oxigénio, gerando espécies reativas de oxigénio (Hamblin & Hasan, 2004). Este tipo de terapia, já explorado para outras áreas da saúde como o cancro (Plaetzer et al., 2009), requer a acumulação do agente fotossensibilizante no interior das células bacterianas. Foram propostos dois modelos para explicar como a aPDT leva à morte celular: um considera que os danos ocorrem diretamente no DNA bacteriano; o outro que os danos ocorrem ao nível da membrana citoplasmática bacteriana (Hamblin & Hasan, 2004). Vários estudos foram efetuados para determinar a eficácia da aPDT. Lei et al. (2011) utilizaram complexos de rubídio em culturas de *E. coli* para determinar a eficácia *in vitro* da aPDT e concluíram que, com uma radiação acima de 450 nm durante cinco minutos, ocorre uma redução de cerca de 70% no número de unidades formadoras de colónias. Embora a aPDT seja uma área promissora que utiliza metalofármacos, tem ainda pouca aplicação e necessita de haver uma normalização para ser uma alternativa viável contra infeções bacterianas.

Tendo em consideração os desafios de metalofármacos antibacterianos, já existem medicamentos organometálicos em ensaios clínicos, como o *Pravibismane*, também conhecido como MBN 101. O *pravibismane* é um composto desenvolvido pela Microbion que tem na

sua composição grupos bismutotiol e é um agente antimicrobiano de largo espectro (Hess, 2021). O seu mecanismo de ação envolve a desregulação da bioenergia bacteriana e também impacta a biossíntese de ácidos gordos. A sua segurança e atividade foi já avaliada e confirmada. Atualmente foi testado com sucesso para aplicações em infeções ósseas, no tratamento do pé diabético como também no tratamento da fibrose cística (Baker, 2020).

Embora a maior área terapêutica que utiliza fármacos organometálicos seja a oncologia, a necessidade de novos antibióticos permanece, metalofármacos antibacterianos são uma fonte de potenciais novos antibióticos.

2.7 Bacteriófagos

Uma alternativa inovadora para lidar com infeções multirresistentes consiste na observação de como outros organismos lidam com bactérias potencialmente patogénicas. Um organismo com a capacidade de erradicar bactérias é o bacteriófago. Os bacteriófagos, também conhecidos como fagos, são vírus que infetam e replicam em bactérias. É estimado que são mais abundantes do que qualquer outro organismo, havendo mais de 10^{31} bacteriófagos no planeta (McGrath & Van Sinderen, 2007). São compostos por proteínas que encapsulam o material genético, podendo este ser um genoma de DNA ou RNA, e podem também apresentar outras estruturas. Os bacteriófagos podem ter complexidade genómica variável: alguns apresentam um genoma com apenas quatro genes, outros um genoma com centenas de genes.

Em bacteriófagos foram observados dois diferentes ciclos de vida: o ciclo lítico (figura 11) e o ciclo lisogénico (Popescu et al., 2021). O ciclo lítico inicia com a adsorção do bacteriófago na superfície da bactéria alvo. De seguida, o DNA do bacteriófago é inserido no interior da bactéria onde utiliza os organitos celulares bacterianos para replicar o seu DNA e codificar as proteínas da cápside. Por último, há uma combinação destes componentes recém-formados que resulta em múltiplos bacteriófagos novos e consequentemente a bactéria hospedeira sofre lise libertando os bacteriófagos para o exterior. O ciclo lítico tem esta designação pelo facto de resultar na lise do hospedeiro. Por outro lado, o ciclo lisogénico inicia-se de forma idêntica ao ciclo lítico, mas a principal diferença ocorre quando o material genético entra na bactéria: enquanto no ciclo lítico o DNA é imediatamente utilizado para formar novos bacteriófagos, no ciclo lisogénico o DNA é incorporado no DNA bacteriano, formando um profago inativo. Neste caso o DNA é replicado mediante a divisão celular da bactéria hospedeira, embora os seus genes não sejam expressos, pelo que é considerado menos agressivo. Quando as condições são

certas, o DNA fágico é removido do cromossoma bacteriano e há uma transição para o ciclo lítico resultando na lise da bactéria (Molineux, 2006).

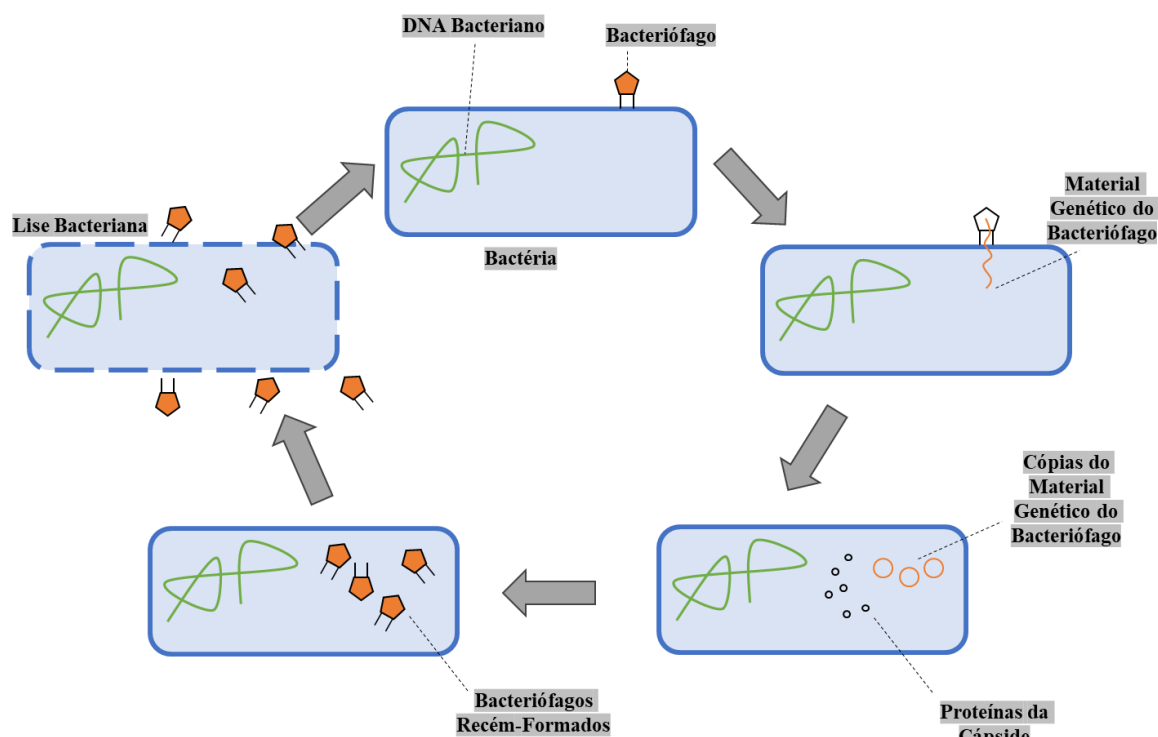


Figura 11. Representação do ciclo lítico de bacteriófagos (adaptado de Adesanya et al., 2020)

A existência de bacteriófagos foi contemplada em 1896 por Ernest Hanbury Hankin, que suspeitava haver algo presente nas águas do Rio Ganges, da Índia, com efeito antibacteriano contra o agente causador da cólera, o *Vibrio cholerae* (Hankin et al., 1896). Foi mais tarde, em 1915, que o bacteriologista inglês Frederick Twort descobriu os bacteriófagos (Twort., 1915). Em 1917, Félix d’Hérelle, que também foi creditado pela descoberta, deu o nome aos bacteriófagos e estudou as potenciais aplicações terapêuticas (Duckworth, 1976).

Os bacteriófagos têm sido aplicados em diversas áreas. As suas aplicações incluem a indústria alimentar, com o objetivo de prevenir a deterioração provocada por bactérias (O’Sullivan et al., 2019), e a área de diagnóstico, para determinar se culturas de *S. aureus* são suscetíveis ou resistentes à metilina (Food and Drug Administration, 2011). Uma área com grande

interesse é a área terapêutica. Apesar do seu potencial, o interesse em bacteriófagos como antimicrobianos diminuiu após a Segunda Guerra Mundial, com o aumento do uso de antibióticos (Sulakvelidze et al., 2001).

Como agentes antimicrobianos, os bacteriófagos possuem certas vantagens. Os bacteriófagos evoluíram juntamente com as bactérias e são extremamente específicos para as bactérias alvo. Só se conseguem ligar a bactérias específicas por reconhecimento dos recetores de superfície (Duckworth & Gulig, 2002). São considerados não tóxicos para humanos nem para o microbioma humano, logo poderão ser uma alternativa mais segura do que muitos dos antibióticos sintéticos empregues na atualidade. Num ensaio de Fase I, uma mistura de bacteriófagos funcionais contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* foi tão seguro como o soro fisiológico e não levou a diferenças estatísticas em termos de efeitos adversos entre os grupos (Rhoads et al., 2009). Adicionalmente, como o seu ciclo de vida inclui a autorreplicação, não requerem doses elevadas para se atingirem os níveis necessários ao eficaz combate de infeções bacterianas (Saha & Mukherjee, 2019).

Embora os bacteriófagos sejam específicos para uma bactéria em particular, isto confere um espectro de ação muito estreito, o que requer a identificação não só da bactéria causadora de infeção como também da estirpe, sendo que qualquer mutação que ocorra poderá impactar o sucesso do bacteriófago (Witzany, 2012). Como as bactérias conseguem adquirir resistência aos antibióticos, é possível que o mesmo se realize com bacteriófagos. Modificações a nível dos recetores que sejam reconhecidos podem tornar ineficazes os bacteriófagos. Os bacteriófagos como potenciais antimicrobianos ainda estão num estadio inicial, é necessária mais investigação para compreender os mecanismos, segurança e apurar as doses adequadas.

As infeções respiratórias provocadas por bactérias multirresistentes são um grave risco para a saúde pública, sendo a gama de antibióticos disponível para as neutralizar cada vez mais restrita (Song & Chung, 2010). Em 2018, Chang et al. propuseram a utilização de bacteriófagos veiculados para o combate de infeções respiratórias. Os bacteriófagos foram já veiculados de diversas formas com sucesso, incluindo na forma livre em suspensões líquidas ou encapsulados em lipossomas e como formulações de pó seco em formas sólidas. Diversos estudos utilizaram roedores como modelo de estudo para determinar a eficácia dos bacteriófagos em infeções respiratórias. Alguns destes estudos envolveram a indução de um estado de neutropenia nos roedores com o intuito de mimetizar infeções em pacientes imunocomprometidos. Num estudo foram administrados dois tipos de bacteriófagos ativos contra a bactéria *Burkholderia cepacia* pela via inalatória de ratos neutropénicos e foi observado uma redução significativa da carga bacteriana dois dias após o tratamento (Semler et al., 2014). Outro estudo observou que

uma mistura de bacteriófagos num modelo de rato com infecção pulmonar aguda por *P. aeruginosa* resultou em clearance bacteriano completo 24 e 48 horas após a administração (Pabary et al., 2016). O mesmo estudo permitiu ainda mostrar que uma administração tardia ou profilática produz resultados positivos, sendo que em nenhum dos casos foi observada a ocorrência de disseminação para doença sistêmica (Pabary et al., 2016).

Diarreia nosocomial proveniente de antibioterapia é uma infecção associada à *Clostridioides difficile*. As infecções por *C. difficile* (CDI) estão fortemente associadas a diarreias severas e consequentemente desidratação, colite pseudomembranosa, megacólon tóxico, infecções sistêmicas e recorrência de CDI (Song & Kim, 2019). Em casos menos severos é recomendada a cessação de antibioterapia de largo espectro, enquanto nos casos mais severos as abordagens mais eficazes envolvem terapias com vancomicina e fidaxomicina (Debast et al., 2014). Terapias alternativas como o transplante de microbiota fecal (FMT) tem uma elevada taxa de sucesso, sendo até mais eficaz em infecções recorrentes do que a antibioterapia (Terveer, 2016). Apesar do sucesso do FMT, esta prática pode levar à disseminação de bactérias multirresistentes (DeFilipp et al., 2019). Um estudo propôs o uso de bacteriófagos para o tratamento de CDI (Fujimoto & Uematsu, 2022). Apesar de vários bacteriófagos ativos contra a *C. difficile* terem sido investigados, todos possuem um ciclo lisogénico logo não levam à lise da bactéria. Como o *C. difficile* é uma bactéria anaeróbia com capacidade de esporular, torna-se mais complicado experimentalmente isolar um bacteriófago lítico. O estudo sugere o uso de endolisinas como potencial antimicrobiano (Fujimoto & Uematsu, 2022). Endolisinas são enzimas hidrolíticas codificadas por bacteriófagos e são utilizadas no final do ciclo lítico. Estas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar as ligações mureína do peptidoglicano bacteriano (Pérez-Dorado et al., 2007). Diversas endolisinas específicas para o *C. difficile* foram já identificadas, uma em particular apresenta características apelativas, a CD27L (Mayer et al., 2008). A CD27L tem a capacidade de lisar 30 estirpes de *C. difficile* e é inócua para a restante flora comensal do trato gastrointestinal, logo, não irá provocar disbiose (Mayer et al., 2011).

Os bacteriófagos são um potencial recurso no controlo e erradicação de bactérias multirresistentes. A sua especificidade para determinadas bactérias juntamente com a sua aparente ausência de toxicidade e efeitos adversos tornam os bacteriófagos uma ferramenta apelativa. Por outro lado, o défice de investigação juntamente com a sua veiculação mais complexa podem complicar o recurso a uma abordagem antimicrobiana envolvendo bacteriófagos. Por último, é necessário mitigar o potencial risco de aquisição de resistência aos bacteriófagos.

3. CONCLUSÃO

A necessidade de novas alternativas terapêuticas contra infecções bacterianas é elevada. Com o arsenal atual de antibióticos tem-se cada vez menos opções terapêuticas devido ao desenvolvimento de resistências. O impacto da ausência de novas terapias é severo com consequências a nível da morbidade como também na mortalidade.

As estratégias propostas envolvem a pesquisa de novos alvos terapêuticos para desenvolver novos fármacos, a inibição dos mecanismos de resistência expresso pelas bactérias de modo a prolongar a vida útil de antibióticos, a adoção de fármacos que tenham mais que um alvo, a pesquisa de combinações que se potenciem e que tornem a antibioterapia mais eficaz, a inclusão de péptidos antimicrobianos, o recurso a fármacos organometálicos ou a bacteriófagos.

As abordagens atualmente mais alcançáveis são a inibição dos mecanismos de resistência e combinações inovadoras. Ambas são estratégias já empregues. Já é possível inibir certos mecanismos de resistência e potenciar o efeito do antibiótico como foi verificado com beta-lactâmicos. Combinações também já são possíveis. Tendo em conta o número de antibióticos descobertos e o número de outros compostos comprovadamente seguros, é possível determinar combinações que tenham efeito sinérgico e que sejam potencialmente eficazes em antibioterapia. As estratégias que indiciam ser mais complexas são as *multi-target drugs* e os bacteriófagos. O grau de complexidade em encontrar múltiplos alvos que possam ser modulados por uma única molécula é consideravelmente superior ao de encontrar um alvo e uma molécula que com ele complexe. Todavia, é importante considerar que os benefícios da abordagem são inúmeros, nomeadamente maior eficácia e possibilidade estatística reduzida de aquisição de resistência. Por outro lado, os bacteriófagos estão ainda pouco estudados como potenciais sucessores de antibióticos, logo haverá um processo mais longo pela frente.

Não são só necessárias novas estratégias para o desenvolvimento de novos antibióticos com mecanismos de ação inovadores, como é essencial sensibilizar a população para os perigos do seu uso incorreto. É igualmente necessário fornecer incentivos às empresas farmacêuticas para que estas possam investir na pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos.

4. BIBLIOGRAFIA

- Adadeji, W. A. (2016). The Treasure Called Antibiotics. *Ann Ib Postgrad Med*, 14(2), 56–57.
- Adesanya, O., Oduselu, T., Akin-Ajani, O., M. Adewumi, O., & G. Ademowo, O. (2020). An exegesis of bacteriophage therapy: An emerging player in the fight against anti-microbial resistance. *AIMS Microbiology*, 6(3), 204–230. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020014>
- Aghdam, E. M., Hejazi, M. S., & Barzegar, A. (2016). Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene*, 592(2), 244–259. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.035>
- Al-Madboly, L. A. (2022). A Novel Triple Combination To Combat Serious Infections with Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Mouse Pneumonia Model. *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02710-21>
- Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- Baker, B. (2020). 1289. Pravibismane is a Potent, Broad Spectrum Anti-Infective Small Molecule that Rapidly Disrupts Bacterial Bioenergetics and Halts Bacterial Growth. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(Supplement_1), S659–S660. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa439.1472>
- Bax, R., & Green, S. (2015). Antibiotics: The changing regulatory and pharmaceutical industry paradigm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1281–1284. <https://doi.org/10.1093/jac/dku572>
- Bechinger, B., & Gorr, S.-U. . (2016). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

- Blair, J. M., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2022). Chapter 23 - Regulation of gene expression. In *Medical Biochemistry (Second Edition)* (pp. 569–581). Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91599-1.00001-8>
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M., & Martinez, J. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>
- Blount, K. F., & Breaker, R. R. (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1558–1564. <https://doi.org/10.1038/nbt1268>
- Blount, K. F., Wang, J. X., Lim, J., Sudarsan, N., & Breaker, R. R. (2006). Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches. *Nature Chemical Biology*, 3(1), 44–49. <https://doi.org/10.1038/nchembio842>
- Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2019). Mini review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein & Peptide Letters*, 27(1). <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>
- Bou Zerdan, M., Al Hassan, S., Shaker, W., El Hajjar, R., Allam, S., Bou Zerdan, M., Naji, A., & Zeineddine, N. (2022). Carbapenemase Inhibitors: Updates on Developments in 2021. *Journal of Clinical Medicine Research*, 14(7), 251–259. <https://doi.org/10.14740/jocmr4764>
- Brown, S., Santa Maria, J. P., & Walker, S. (2013). Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 313–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10). <https://doi.org/10.1128/aac.01076-18>
- Cai, Y., Bai, N., Liu, X., Liang, B., Wang, J., & Wang, R. (2016). Tigecycline: Alone or in combination? *Infectious Diseases*, 48(7), 491–502. <https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1155735>

- Cai, Y., Wang, J., Liu, X., Wang, R., & Xia, L. (2017). A Review of the Combination Therapy of Low Frequency Ultrasound with Antibiotics. *BioMed Research International*, 2017, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/2317846>
- Caron, M.-P. ., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Masse, E., & Lafontaine, D. A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), E3444–E3453. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214024109>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022, October 4). *Our Formulary | Infectious Diseases Laboratories | CDC*. [www.cdc.gov. https://www.cdc.gov/laboratory/drug-service/formulary.html#tmelarsoprol](https://www.cdc.gov/laboratory/drug-service/formulary.html#tmelarsoprol)
- Cheah, M. T., Wachter, A., Sudarsan, N., & Breaker, R. R. (2007). Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature*, 447(7143), 497–500. <https://doi.org/10.1038/nature05769>
- Conlon, J. M., & Sonnevend, A. (2011). Clinical Applications of Amphibian Antimicrobial Peptides. *Journal of Medical Sciences*, 4(2), 62–72. <https://doi.org/10.2174/1996327001104020062>
- Courvalin, P. (2016). Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), 405–407. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.012>
- Davies, J. (2006). Where have All the Antibiotics Gone? *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Medicale*, 17(5), 287–290. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>
- Debast, S. B., Bauer, M. P., & Kuijper, E. J. (2014). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 1–26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418>
- DeFilipp, Z., Bloom, P. P., Torres Soto, M., Mansour, M. K., Sater, M. R. A., Huntley, M. H., Turbett, S., Chung, R. T., Chen, Y.-B., & Hohmann, E. L. (2019). Drug-Resistant *E. coli* Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant. *New England Journal of Medicine*, 381(21). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910437>

- Delmar, J. A., Su, C.-C., & Yu, E. W. (2014). Bacterial Multidrug Efflux Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 43(1), 93–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022855>
- Denoyer, D., Clatworthy, S. A. S., & Cater, M. A. (2018). Copper Complexes in Cancer Therapy. *Metal Ions in Life Sciences*, 18, /books/9783110470734/9783110470734-022/9783110470734-022.xml. <https://doi.org/10.1515/9783110470734-022>
- Duckworth, D. H. (1976). "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriological Reviews*, 40(4), 793–802. <https://doi.org/10.1128/br.40.4.793-802.1976>
- Duckworth, D. H., & Gulig, P. A. (2002). Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 16(1), 57–62. <https://doi.org/10.2165/00063030-200216010-00006>
- Ejim, L., Farha, M. A., Falconer, S. B., Wildenhain, J., Coombes, B. K., Tyers, M., Brown, E. D., & Wright, G. D. (2011). Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature Chemical Biology*, 7(6), 348–350. <https://doi.org/10.1038/nchembio.559>
- Food and Drug Administration. (2011). 510(k) Premarket Notification. [Www.accessdata.fda.gov. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K102342](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpmn/pmn.cfm?ID=K102342)
- Forbes, J., & Krishnamurthy, K. (2022). *Biochemistry, Peptide*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562260/#:~:text=A%20peptide%20is%20a%20short>
- Frei, A., Zuegg, J., Elliott, A. G., Baker, M., Braese, S., Brown, C., Chen, F., G. Dowson, C., Dujardin, G., Jung, N., King, A. P., Mansour, A. M., Massi, M., Moat, J., Mohamed, H. A., Renfrew, A. K., Rutledge, P. J., Sadler, P. J., Todd, M. H., & Willans, C. E. (2020). Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chemical Science*, 11(10), 2627–2639. <https://doi.org/10.1039/c9sc06460e>
- Galinier, A., Clémentine Delan-Forino, Elodie Foulquier, Hakima Lakhal, & Pompeo, F. (2023). Recent Advances in Peptidoglycan Synthesis and Regulation in Bacteria. *Biomolecules*, 13(5), 720–720. <https://doi.org/10.3390/biom13050720>
- Garde, S., Chodiseti, P. K., & Reddy, M. (2021). Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0010-2020>

- Grand View Research. (2021). *Global Peptide Antibiotics Market Size & Share Report, 2030*.
 Www.grandviewresearch.com. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/peptide-antibiotics-market-report>
- Gray, D. A., & Wenzel, M. (2020). Multitarget Approaches against Multiresistant Superbugs. *ACS Infectious Diseases*, 6(6), 1346–1365. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00001>
- Gunjal, V. B., Thakare, R., Chopra, S., & Reddy, D. S. (2020). Teixobactin: A Paving Stone toward a New Class of Antibiotics? *Journal of Medicinal Chemistry*, 63. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00173>
- Hamblin, M. R., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(5), 436. <https://doi.org/10.1039/b311900a>
- Hankin, E., Institut Pasteur (Paris, France), & MBLWHOI Library. (1896). Annales de l'Institut Pasteur. In *Internet Archive*. Paris : Masson. <https://archive.org/details/annalesdelinstitut10inst/page/511/mode/1up?view=theater>
- Hess, J. (2021). Rational approaches towards inorganic and organometallic antibacterials. *Biological Chemistry*, 0(0). <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0253>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Hussein, M., Han, M.-L., Zhu, Y., Zhou, Q. (Tony), Lin, Y.-W., Hancock, Robert. E. W., Hoyer, D., Creek, D. J., Li, J., & Velkov, T. (2019). Metabolomics study of the synergistic killing of polymyxin B in combination with amikacin against polymyxin-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(1). <https://doi.org/10.1128/aac.01587-19>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, Present and Future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., & Walsh, C. (2005). Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2), 425–448. <https://doi.org/10.1021/cr030103a>

- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and Resistance Mechanisms of antibiotics: a Guide for Clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.joacp_349_15
- Kavita, K., & Breaker, R. R. (2022). Discovering riboswitches: the past and the future. *Trends in Biochemical Sciences*, 48(2), S0968-0004(22)002341. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.08.009>
- Kawate, T., Iwase, N., Shimizu, M., Stanley, S. A., Wellington, S., Kazyanskaya, E., & Hung, D. T. (2013). Synthesis and structure–activity relationships of phenyl-substituted coumarins with anti-tubercular activity that target FadD32. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(22), 6052–6059. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.035>
- Kuhn, M. L., Alexander, E., G. Minasov, Page, H. J., Z. Warwrzak, L. Shuvalova, Flores, K., Wilson, D. J., Shi, C., Aldrich, C. C., & Anderson, W. F. (2016). Structure of the Essential *Mtb* FadD32 Enzyme: A Promising Drug Target for Treating Tuberculosis. *ACS Infectious Diseases*, 2(8), 579–591. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00082>
- La Hamaide, S. de. (2012, January 11). Antibiotics for livestock vital to feed world: OIE. *Reuters*. <https://www.reuters.com/article/us-antibiotics-livestock/antibiotics-for-livestock-vital-to-feed-world-oie-idUSTRE80A1JF20120111>
- Lambert, P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>
- Lázár, V., Snitser, O., Barkan, D., & Kishony, R. (2022). Antibiotic combinations reduce *Staphylococcus aureus* clearance. *Nature*, 610(7932), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05260-5>
- Lei, W., Zhou, Q., Jiang, G., Zhang, B., & Wang, X. (2011). Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by Ru(II) complexes. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(6), 887. <https://doi.org/10.1039/c0pp00275e>
- Lewis, K. (2012). Recover the lost art of drug discovery. *Nature*, 485(7399), 439–440. <https://doi.org/10.1038/485439a>
- Lewis, K. (2020). The Science of Antibiotic Discovery. *Cell*, 181(1), 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>

- Li, C. M., Haratipour, P., Lingeman, R. G., Perry, J. J. P., Gu, L., Hickey, R. J., & Malkas, L. H. (2021). Novel Peptide Therapeutic Approaches for Cancer Treatment. *Cells*, 10(11), 2908. <https://doi.org/10.3390/cells10112908>
- Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, 53(2), 148–158. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>
- May, M. (2014). Drug development: Time for teamwork. *Nature*, 509(7498), S4–S5. <https://doi.org/10.1038/509s4a>
- Mayer, M. J., Garefalaki, V., Spoerl, R., Narbad, A., & Meijers, R. (2011). Structure-Based Modification of a Clostridium difficile-Targeting Endolysin Affects Activity and Host Range. *Journal of Bacteriology*, 193(19), 5477–5486. <https://doi.org/10.1128/jb.00439-11>
- Mayer, M. J., Narbad, A., & Gasson, M. J. (2008). Molecular Characterization of a Clostridium difficile Bacteriophage and Its Cloned Biologically Active Endolysin. *Journal of Bacteriology*, 190(20), 6734–6740. <https://doi.org/10.1128/jb.00686-08>
- McGrath, S., & Van Sinderen, D. (2007). *Bacteriophage : genetics and molecular biology*. Caister Academic.
- Meggers, E. (2009). Targeting proteins with metal complexes. *Chemical Communications*, 9, 1001. <https://doi.org/10.1039/b813568a>
- Mojžišová, G., Mojžiš, J., & Vašková, J. (2014). Organometallic iron complexes as potential cancer therapeutics. *Acta Biochimica Polonica*, 61(4). https://doi.org/10.18388/abp.2014_1826
- Molineux, I. J. (2006). Fifty-three years since Hershey and Chase; much ado about pressure but which pressure is it? *Virology*, 344(1), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.014>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>

- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2010). Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2445–2450. <https://doi.org/10.1128/aem.01754-09>
- Nobel Prize Outreach AB. (n.d.). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1939*. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1939/summary/>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Supplement 7), S521–S528. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
- Novais, C., Coque, T. M., Ferreira, H., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2005). Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3364–3368. <https://doi.org/10.1128/aem.71.6.3364-3368.2005>
- Novobiotic Pharmaceuticals. (2023, April 25). *Press Releases*. Novobiotic Pharmaceuticals. <https://www.novobiotic.com/news>
- O’Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2019). Bacteriophages in Food Applications: From Foe to Friend. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 151–172. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121747>
- Pabary, R., Singh, C., Morales, S., Bush, A., Alshafi, K., Bilton, D., Alton, E. W. F. W., Smithyman, A., & Davies, J. C. (2015). Antipseudomonal Bacteriophage Reduces Infective Burden and Inflammatory Response in Murine Lung. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 744–751. <https://doi.org/10.1128/aac.01426-15>
- Patra, M., Gasser, G., & Metzler-Nolte, N. (2012). Small organometallic compounds as antibacterial agents. *Dalton Transactions*, 41(21), 6350. <https://doi.org/10.1039/c2dt12460b>
- Patti, G. J., Kim, S. J., Yu, T.-Y., Dietrich, E., Tanaka, K. S. E., Parr, T. R., Far, A. R., & Schaefer, J. (2009). Vancomycin and Oritavancin Have Different Modes of Action in *Enterococcus faecium*. *Journal of Molecular Biology*, 392(5), 1178–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.064>

- Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., & Pompliano, D. L. (2006). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(1), 29–40. <https://doi.org/10.1038/nrd2201>
- Penchovsky, R., & Stoilova, C. C. (2012). Riboswitch-based antibacterial drug discovery using high-throughput screening methods. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(1), 65–82. <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.740455>
- Pérez-Dorado, I., Campillo, N. E., Monterroso, B., Heseck, D., Lee, M., Páez, J. A., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J. L., Mobashery, S., Menéndez, M., & Hermoso, J. A. (2007). Elucidation of the Molecular Recognition of Bacterial Cell Wall by Modular Pneumococcal Phage Endolysin CPL-1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 24990–24999. <https://doi.org/10.1074/jbc.m704317200>
- Pitt, W. G., McBride, M. O., Lunceford, J. K., Roper, R. J., & Sagers, R. D. (1994). Ultrasonic enhancement of antibiotic action on gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(11), 2577–2582. <https://doi.org/10.1128/aac.38.11.2577>
- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., & Kiesslich, T. (2008). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*, 24(2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>
- Popescu, M., Van Belleghem, J. D., Khosravi, A., & Bollyky, P. L. (2021). Bacteriophages and the Immune System. *Annual Review of Virology*, 8. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-074551>
- Rajasekaran, G., Dinesh Kumar, S., Nam, J., Jeon, D., Kim, Y., Lee, C. W., Park, I.-S., & Shin, S. Y. (2019). Antimicrobial and anti-inflammatory activities of chemokine CXCL14-derived antimicrobial peptide and its analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1861(1), 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.06.016>
- Razquin-Olazarán, I., Shahrour, H., & Martínez, G. (2020). A synthetic peptide sensitizes multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics for more than two hours and permeabilizes its envelope for twenty hours. *Journal of Biomedical Science*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00678-3>
- Rello, J., Bunsow, E., & Perez, A. (2016). What if there were no new antibiotics? A look at alternatives. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(12), 1547–1555. <https://doi.org/10.1080/17512433.2016.1241141>

- Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., & Sulakvelidze, A. (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of Wound Care*, 18(6), 237–243. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.6.42801>
- Ryszkiewicz, P., Malinowska, B., & Schlicker, E. (2023). Polypharmacology: promises and new drugs in 2022. *Pharmacological Reports*, 75(4), 755–770. <https://doi.org/10.1007/s43440-023-00501-4>
- Saha, D., & Mukherjee, R. (2019). Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy. *IUBMB Life*, 71(7). <https://doi.org/10.1002/iub.2010>
- Semler, D. D., Goudie, A. D., Finlay, W. H., & Dennis, J. J. (2014). Aerosol Phage Therapy Efficacy in Burkholderia cepacia Complex Respiratory Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 4005–4013. <https://doi.org/10.1128/aac.02388-13>
- Sharma, P., & Towse, A. (2010). New Drugs to Tackle Antimicrobial Resistance: Analysis of EU Policy Options. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.2640028>
- Shukla, R., Lavore, F., Maity, S., Derks, M. G. N., Jones, C. R., Vermeulen, B. J. A., Melcrová, A., Morris, M. A., Becker, L. M., Wang, X., Kumar, R., Medeiros-Silva, J., van Beekveld, R. A. M., Bonvin, A. M. J. J., Lorent, J. H., Lelli, M., Nowick, J. S., MacGillavry, H. D., Peoples, A. J., & Spoering, A. L. (2022). Teixobactin kills bacteria by a two-pronged attack on the cell envelope. *Nature*, 608(7922), 390–396. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05019-y>
- Si, Z., Pethe, K., & Chan-Park, M. B. (2023). Chemical Basis of Combination Therapy to Combat Antibiotic Resistance. *JACS Au*, 3(2), 276–292. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00532>
- Sierra, M. A., Casarrubios, L., & de la Torre, M. C. (2019). Bio-Organometallic Derivatives of Antibacterial Drugs. *Chemistry – a European Journal*, 25(30), 7232–7242. <https://doi.org/10.1002/chem.201805985>
- Silva, V., Monteiro, A., López, E., Maltez, L., Igrejas, G., & Poeta, P. (2022). MRSA in Humans, Pets and Livestock in Portugal: Where We Came from and Where We Are Going. *Pathogens*, 11(10), 1110–1110. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101110>
- Song, J. H., & Kim, Y. S. (2019). Recurrent Clostridium difficile Infection: Risk Factors, Treatment, and Prevention. *Gut and Liver*, 13(1), 16–24. <https://doi.org/10.5009/gnl18071>

- Song, J.-H., & Chung, D. R. (2010). Respiratory Infections Due to Drug-Resistant Bacteria. *Infectious Disease Clinics of North America*, 24(3), 639–653. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.04.007>
- Spagnolo, F., Trujillo, M., & Dennehy, J. J. (2021). Why Do Antibiotics Exist? *MBio*, 12(6). <https://doi.org/10.1128/mbio.01966-21>
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90351/>
- Talevi, A. (2015). Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00205>
- Terveer, E. M. (2016). Fecal microbiota transplantation, a novel therapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Nederlands Tijdschrift Voor Tandheelkunde*, 123(09), 406–409. <https://doi.org/10.5177/ntvt.2016.09.16146>
- The Pew Charitable Trusts. (2021, March 9). *Antibiotics Currently in Global Clinical Development*. Pewtrusts.org. <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development>
- The Review. (2014). *Home | Antimicrobial Resistance Review*. Amr-Review.org. <https://amr-review.org/>
- Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*, 25(12), 2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>
- Twort, F. W. (1915). An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. *The Lancet*, 186(4814), 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)20383-3)
- Uto, L. R., & Gerriets, V. (2023, January). *Clavulanic Acid*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545273/#:~:text=Clavulanic%20acid%20is%20an%20inhibitor>
- Viana, J., Ishiki, H. M., Scotti, M. T., & Scotti, L. (2018). Multi-Target Antitubercular Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(9), 750–758. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180528124414>

- Wainwright, M. (1993). The Mystery of the Plate: Fleming's Discovery and Contribution to the Early Development of Penicillin. *Journal of Medical Biography*, 1(1), 59–65. <https://doi.org/10.1177/096777209300100113>
- Weinkle, A. P., Doktor, V., & Emer, J. (2015). Update on the management of rosacea. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 8, 159–177. <https://doi.org/10.2147/CCID.S58940>
- Wetzel, C., Lonneman, M., & Wu, C. (2021). Polypharmacological drug actions of recently FDA approved antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209(1), 112931. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112931>
- Witzany G. (2012). *Viruses : Essential Agents of Life* (pp. 389–405). Springer.
- World Health Organization. (2020a). *Tuberculosis*. [Www.who.int](http://www.who.int); World Health Organization. https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1
- World Health Organization. (2020b, July 31). *Antibiotic Resistance*. World Health Organization; WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- World Health Organization. (2021, June 9). *Record response to WHO's call for antimicrobial resistance surveillance reports in 2020*. [Www.who.int](http://www.who.int). <https://www.who.int/news/item/09-06-2021-record-response-to-who-s-call-for-antimicrobial-resistance-surveillance-reports-in-2020>
- Wyllie, J. A., McKay, M. V., Barrow, A. S., & Soares, T. P. (2022). Biosynthesis of uridine diphosphate *N*-Acetylglucosamine: An underexploited pathway in the search for novel antibiotics?. *Iubmb Life*, 74(12), 1232–1252. <https://doi.org/10.1002/iub.2664>
- Yin, W., Xu, S., Wang, Y., Zhang, Y., Chou, S.-H., Galperin, M. Y., & He, J. (2020). Ways to control harmful biofilms: prevention, inhibition, and eradication. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(1), 57–78. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2020.1842325>
- Zahir Essa, R., Wu, Y.-S., Batumalaie, K., Sekar, M., & Poh, C.-L. (2022). Antiviral peptides against SARS-CoV-2: therapeutic targets, mechanistic antiviral activity, and efficient delivery. *Pharmacological Reports*, 74(6), 1166–1181. <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00432-6>
- Zhang, J., Li, Y., Fang, R., Wei, W., Wang, Y., Jin, J., Yang, F., & Chen, J. (2022). Organometallic gold(I) and gold(III) complexes for lung cancer treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.979951>