

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

BRUNO LEAL ALVES FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBIÓTICA E RELAÇÃO ESTRUTURA-
ATIVIDADE DE MOLÉCULAS DE ORIGEM
SINTÉTICA E ANIMAL**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM NEUROIMUNOLOGIA**

**Orientadora: Dr^a Helena Carla Castro C. de Almeida
Co-orientação: Dr^a Dilvani Oliveira Santos**



**NITERÓI
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BRUNO LEAL ALVES FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA E RELAÇÃO
ESTRUTURA-ATIVIDADE DE MOLÉCULAS DE
ORIGEM SINTÉTICA E ANIMAL**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e
Modelagem Molecular (LABioMol) do Departamento de Biologia
Celular e Molecular, Instituto de Biologia – UFF

Dissertação de mestrado
submetida à Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre
em Neuroimunologia.

Orientadora: Dr^a HELENA CARLA CASTRO C. DE ALMEIDA
Co-orientação: Dr^a DILVANI OLIVEIRA SANTOS

NITERÓI
2007

BRUNO LEAL ALVES FERREIRA

**Identificação da Atividade Antibiótica e Relação
Estrutura-Atividade de Moléculas de Origem
Sintética e Animal**

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em
Neuroimunologia.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Magaly Girão Albuquerque (IQO-UFRJ)

Dra. Alice Rolim Bernardino (IQ-UFF)

Dra. Valeria Laneuville Teixeira (IB-UFF)

Dr. Carlos Rangel Rodríguez (revisor e suplente – Fac. Farmacia UFRJ)

**NITERÓI
2007**

Alves Ferreira, Bruno Leal

Identificação da atividade Antibiótica e relação Estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal / Bruno Leal Alves Ferreira – Niterói: [s. n.], 2007.

f.

Dissertação (Mestre em Neuroimunologia). – Universidade Federal Fluminense, 2007.

1. 2. 3. 4. 5. I. Título.

CDD:

**“UM HOMEM PODE SER MEDIDO PELO TAMANHO DE SEUS SONHOS”
(FERNANDO PESSOA)**

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha esposa Liliam.

A meus pais, Vilma e Delly.

A minha tia Corina.

Aos meus irmãos Alex e Márcio.

A toda a minha família.

A minha orientadora, Dra. Helena C. Castro e Co-orientadora, Dra. Dilvani Santos.

Ao Professor Dr Cícero Carlos de Freitas.

A todos os amigos do laboratório (LABioMol).

Aos amigos do laboratório de Química Orgânica da UFF.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 BACTÉRIAS E INFECCÃO.....	12
1.2 BACTÉRIAS VERSUS ANTIBIÓTICOS.....	14
1.2.1 PENICILINA.....	20
1.2.2 CEFALOSPORINAS.....	21
1.2.3 CARBAPENEMAS.....	22
1.2.4 AMINOGLICOSÍDEOS.....	23
1.2.5 GLICOPEPTÍDEOS.....	23
1.2.6 TETRACICLINAS.....	24
1.2.7 CLORANFENICOL.....	24
1.2.8 QUINOLONAS.....	24
1.2.9 SULFONAMIDAS.....	25
1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS E METABOLISMO BACTERIANO.....	25
1.3.1 A AÇÃO ANTIBIÓTICA SOBRE A PAREDE CELULAR.....	26
1.3.2 A AÇÃO ANTIBIÓTICA SOBRE A MEMBRANA CELULAR.....	29
1.3.3 A AÇÃO ANTIBIÓTICA SOBRE A SÍNTESE DE PROTEÍNAS E METABÓLITOS.....	30
1.3.4 A AÇÃO ANTIBIÓTICA SOBRE A REPLICAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO.....	31
1.4.1 CONCEITOS.....	32
1.4.2 RESISTÊNCIA - ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO.....	36
1.4.3 RESISTÊNCIAS SIMPLES, MÚLTIPLA E CRUZADA.....	37
1.4.4 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DA RESISTÊNCIA.....	38
1.4.5 MECANISMOS GENÉTICOS DE TRANSFERÊNCIA DA RESISTÊNCIA.....	40
1.4.5.1 MUTAÇÃO.....	40
1.4.5.2 TRANSFORMAÇÃO.....	41
1.4.5.3 TRANSDUÇÃO.....	41
1.4.5.4 CONJUGAÇÃO.....	42
1.4.5.5 TRANSPOSIÇÃO.....	43
1.4.6 SITUAÇÃO ATUAL DA RESISTÊNCIA.....	43
1.5.1 MOLÉCULAS DE ORIGEM SINTÉTICA.....	45
1.5.2 SISTEMAS TIENOPIRIDINA E PIRAZOLOPIRIDINA.....	45
1.5.3 MOLÉCULAS DE ORIGEM ANIMAL.....	48
2 OBJETIVO.....	52
2.1 GERAL.....	52
2.2 ESPECÍFICO.....	52
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1 BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	53
3.2 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES-ESTOQUE DOS MATERIAIS.....	54
3.2.1 MATERIAL DE ORIGEM ANIMAL.....	54
3.2.2 MATERIAL DE ORIGEM SINTÉTICA.....	54
3.3 ANTIBIOGRAMA QUALITATIVO - TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO.....	56
3.3.1 PREPARAÇÃO DOS DISCOS DE PAPEL.....	56

	3.3.1.1 MATERIAL DE ORIGEM ANIMAL.....	56
	3.3.1.2 MATERIAL DE ORIGEM SINTÉTICA.....	56
3.3.2	CONTROLES EXPERIMENTAIS.....	56
3.3.3	PROCEDIMENTO COMPLETO DO TESTE DE SENSIBILIDADE.....	57
3.4	ANTIBIOGRAMA QUANTITATIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI).....	58
4	RESULTADOS.....	60
4.1	MATERIAL DE ORIGEM SINTÉTICA.....	60
4.1.1	SISTEMA TIENOPIRIDINA.....	60
	4.1.1.1 DERIVADOS ÁCIDOS 4-(FENILAMINO)TIENO[2,3- <i>b</i>] PIRIDINA -5- CARBOXÍLICOS.....	60
	4.1.1.2 DERIVADOS.4-(FENILAMINO)TIENO[2,3- <i>b</i>]PIRIDINA-5- CARBONITRILAS.....	61
	4.1.1.3 DERIVADOS.5-(4,5-DIIDRO-1 <i>h</i> -IMIDAZOL-2-IL)-4-(FENIL AMINO) TIENO[2, 3- <i>b</i>]PIRIDINAS.....	63
	4.1.1.4 DERIVADOS BENZO[<i>b</i>]TIENO[2, 3- <i>h</i>]-1,6-NAFTIRIDINAS.....	63
4.1.2	SISTEMA PIRAZOLOPIRIDINA.....	66
	4.1.2.1 DERIVADOS 3 <i>h</i> BENZO- <i>b</i> -PIRAZOLO[3,4 <i>h-h</i>]1,6- NAFTIRIDINAS.....	66
	4.1.2.2 DERIVADOS ÁCIDOS DO SISTEMA 1 <i>H</i> -PIRAZOLO[3,4- <i>b</i>] PIRIDINAS.....	66
4.1.3	ANTIBIOGRAMA QUANTITATIVO E COMPARAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS CLÍNICOS PARA A VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO.....	69
4.2	MATERIAL ORIGEM ANIMAL.....	70
	4.2.1 ANTIBIOGRAMA QUALITATIVO -TESTES DE DIFUSÃO EM DISCO.....	72
	ANTIBIOGRAMA QUANTITATIVO E COMPARAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS	
	4.2.2 CLÍNICOS PARA A VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO.....	72
5	DISCUSSÃO.....	74
5.1	MATERIAL ORIGEM SINTÉTICA.....	74
5.2	MATERIAL ORIGEM ANIMAL.....	79
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
7	REFERÊNCIAS	86
8	ANEXO.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE – Enzima conversora de angiotensina.

ATCC – Coleção de Cepas Tipo Americana.

CD14 – Receptor do fator de estimulação de colônias de granulócitos.

CMB – Concentração Mínima Bactericida.

CMI – Concentração Mínima Inibitória.

HUAP – Hospital Universitário Antônio Pedro.

IL-1 – Interleucina 1.

LPS – Lipopolissacarídeo.

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina.

MuRSA – *Staphylococcus aureus* Multiresistente.

PBP – Proteína Ligadora de Penicilina.

SNC – Sistema Nervoso Central.

TNF – Fator de Necrose Tumoral.

TSST – Toxina da Síndrome do Choque Tóxico.

VDE – Enterococos Dependentes de Vancomicina.

VRE – Enterococos Resistentes a Vancomicina.

RESUMO

A preocupação crescente com mortes causadas por infecções bacterianas envolvendo cepas resistentes torna indispensável identificar novas fontes de origem sintética e animal para protótipos de antibióticos. Neste trabalho, compostos sintéticos (derivados dos sistemas tienopiridina e pirazolopiridina) e animal (venenos de serpentes da família **Viperidae** - *Agkistrodon rhodostoma*, *Bothrops jararaca*, *B. atrox* e *Lachesis muta*) foram analisados em antibiogramas qualitativos e quantitativos contra bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*) de pacientes do Hospital Universitário Antonio Pedro da Universidade Federal Fluminense. Dentre os compostos sintéticos testados contendo as seis séries sintetizadas com modificações estruturais nas posições *meta* e *para* (67 derivados), cinco compostos com os substituintes CH₃, OCH₃, Cl, F e Br em *meta* apresentaram atividade antibacteriana contra cepas de *S. epidermidis*. A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) mostrou que esses derivados apresentam valores (CMI=16µg/ml) próximos aos encontrados para drogas de uso clínico, como por exemplo a vancomicina, oxacilina e o cloranfenicol (CMI=1-32µg/ml). Estes resultados indicam que os derivados do sistema pirazolopiridina testados têm um potencial significativo para continuação dos estudos envolvendo avaliações farmacológicas e toxicológicas *in vitro* e *in vivo*. A análise da relação estrutura-atividade dos compostos avaliados mostram que sistema pirazolopiridina, a liberdade conformacional no anel fenila, a posição *meta* e a polaridade dos substituintes são requisitos característicos estruturais importantes para a atividade biológica destes compostos.

Dentre os materiais de origem animal, todos os venenos testados demonstraram uma atividade antibacteriana apenas para as bactérias Gram-positivas, com exceção do veneno de *Lachesis muta*, que não mostrou qualquer atividade. Os venenos de *A. rhodostoma* e *B. atrox* (CMI = 4 µg/ml) mostrou uma atividade maior contra *S. epidermidis* e *E. faecalis* enquanto o de *B. jararaca* (CMI = 13 µg/mL) foi ativo contra a cepa de *S. aureus*. Todos os venenos foram tão promissores quanto os controles utilizados, vancomicina, oxacilina e o cloranfenicol (CMI=1-32µg/ml), o que sugere que estes venenos são fontes em potencial para desenvolvimento de novos antimicrobianos.

ABSTRACT

The current concern with the deaths caused by the bacterial infections related to resistant strains requires the identification of new sources of antibiotics prototypes from animal or synthetic origins. In this work, synthetic compound (derivatives from thienepyridine end pyrazolepyridine systems) and animal (four **Viperidae** venoms - *Agkistrodon rhodostoma*, *Bothrops jararaca*, *B. atrox* and *Lachesis muta*) origins tested by quantitative and qualitative antibiograms against Gram-positive (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*) clinical bacteria from patients of Hospital Antonio Pedro of Federal Fluminense University. Among the materials of synthetic origin tested with six series synthesized with structural modifications in *meta* and *para* positions (67 derivatives), five compounds with the substituents CH₃, OCH₃, Cl, F e Br in *meta* showed a antibacterial activity against *S. epidermidis* strains. The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) showed that these derivatives present values (MIC=16µg/ml) close to those found for drugs of clinical use such as vancomycin, oxacillin and chloramphenicol (MIC=1-32mg/ml). These results indicate that the pyrazolepyridine derivatives tested present a significant potential for continuing the *in vitro* and *in vivo* pharmacological and toxicological evaluation. The analysis of the structure-activity relationship of the derivatives evaluated showed that the pyrazolopyridine system, the conformational freedom of the phenyl ring, the *meta* position and the polarity of the substituents are structural requirements for the active biological profile of these compounds.

Among the materials of animal origin, all snake venoms tested showed an antibacterial profile against Gram-positives except for *Lachesis muta*, which showed no activity. *A. rhodostoma* and *B. atrox* (MIC = 4µg/mL) showed the higher activity against *S. epidermidis* and *E. faecalis* while *B. jararaca* (MIC = 13µg/mL) was active against *S. aureus*. All venoms were promising as the controls used, vancomycin, oxacillin and chloramphenicol (MIC=1-32µg/ml), pointing them as a new source for the development of potential antimicrobial molecules.

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Bactérias e infecção

O ser humano apresenta vários mecanismos de defesa contra diversos agentes com potencial infeccioso, que incluem a pele, as mucosas, células e proteínas especializadas como os anticorpos (Cardoso *et al.*, 2007). Entretanto, apesar destas defesas, o corpo humano ainda é suscetível a patógenos como as bactérias, que podem invadir e liberar toxinas, comprometendo seriamente a saúde do indivíduo (Riley *et al.*, 2002; Bukharin *et al.*, 2003). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007), as bactérias estão entre os patógenos que mais afetam de forma significativa a saúde da população mundial (Tabela 1).

Tabela 1: As dez maiores causas de morte no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde. Em vermelho as patologias relacionadas com bactérias (WHO, 2007).

Doenças	Mortes em milhões	Mortes (%)
Doenças coronárias	3, 10	10, 8
Infecções do trato respiratório	2, 86	10, 0
HIV/AIDS	2, 14	7, 5
Condições perinatais	1, 83	6, 4
Doenças cerebrovascular e AVC	1, 72	6, 0
Diarréias e doenças entéricas	1, 54	5, 4
Tuberculose	1, 24	4, 4
Malária	1, 10	3, 8
Doenças Pulmonares obstrutivas	0, 88	3, 1
Acidentes de Trânsito	0, 53	1, 9

A capacidade de um patógeno de superar as defesas do organismo humano, conseguir colonizá-lo e manifestar a sua patogenicidade são os fatores responsáveis pela variação no quadro de sinais e sintomas que caracterizam as patologias (Cardoso *et al.*, 2007; Rouveix, 2007). A patogenicidade das bactérias é determinada pelo desenvolvimento de mecanismos que contribuem para o aumento de sua capacidade de infecção e que ajudam a burlar o sistema imunológico do hospedeiro (Chopra *et al.*, 2002).

As bactérias patogênicas são classificadas em primárias, que causam infecções em indivíduos normais e oportunistas que atuam em indivíduos com o sistema imunológico comprometido (Tortora *et al.*, 2005; Trabulsi e Altherthum, 2005). Várias dessas bactérias desenvolveram a capacidade de invasão celular usando proteínas da parede celular (invasinas).

A célula epitelial ainda é o principal alvo das bactérias invasoras, que podem chegar à corrente sanguínea (Chopra *et al.*, 2002). A bactéria também pode induzir a sua própria fagocitose, a fim de invadir a célula hospedeira rompendo o vacúolo, alcançando o citoplasma e podendo se disseminar para células vizinhas (ex.: *Shigella*) (Riley *et al.*, 2002). Algumas bactérias são intracelulares obrigatórias, pois necessitam de moléculas sintetizadas por essas células, para crescerem e se multiplicarem (exs.: *Rickettsia sp*, *Chlamydia*, *Coxiella* e *Mycobacterium leprae*). Devido a sua localização, estas bactérias estão protegidas das ações antibacterianas dos anticorpos,

complemento, fagocitose e de alguns antibióticos. Bactérias intracelulares facultativas (exs.: *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Legionella pneumophila*) podem viver tanto dentro quanto fora das células enquanto outras desenvolvem-se exclusivamente na forma extracelular (exs.: *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bordetella sp.*, *Neisseria sp.* e *Víbrio sp.*) (Chopra *et al.*, 2002).

De forma interessante, algumas bactérias podem aderir ao tecido do hospedeiro formando uma camada (microcolônias) em sua superfície (Donelli *et al.*, 2007). Esses agregados são envolvidos por uma película de exopolissacarídeos denominados de biofilmes, que servem como uma fonte constante de infecções para os diferentes tecidos e órgãos. Assim, as bactérias encontram-se relativamente protegidas das defesas do sistema imunológico e da ação de antibióticos nesses biofilmes, que podem ser formados tanto em próteses, nas mucosas (fibrose cística), nos dentes (placa dentária), dentre outros (Riley *et al.*, 2002; Chopra *et al.*, 2002; Donelli *et al.*, 2007).

1.2 – Bactérias Versus Antibióticos

Desde os primórdios da existência humana, o homem vem sendo acometido por doenças de origem microbiana (Cleveland *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2002). Embora na história da humanidade só recentemente descobrimos a

natureza infecciosa de algumas doenças, a luta contra infecções causadas por microrganismos existe há mais de 50.000 anos. Chineses, hindus, babilônios, sumérios e egípcios empregavam produtos de origem animal (gordura, toucinho e mel) e mineral (sal, cobre, antimônio e chumbo) como antimicrobianos (McDermott *et al.*, 2003; Pages, 2004) No início, utilizando-se de conhecimentos empíricos, buscava-se, na natureza, a cura para todos os tipos de doenças onde se usava inclusive extratos vegetais e venenos de animais (White, 2002; Pages, 2004).

Ao longo do tempo, devido ao desenvolvimento tecnológico, foram descobertas as primeiras substâncias com atividade antimicrobiana, algumas produzidas por seres vivos (antibióticos naturais), outras modificadas em laboratório a partir dessas moléculas (semi-sintéticos) ou ainda, sintetizadas inteiramente em laboratórios (quimioterápicos ou sintéticos). Em 1910, Paul Ehrlich, um médico alemão, após testar centenas de substâncias encontrou um agente quimioterápico efetivo no combate a sífilis chamado *salvarsan*, um derivado de arsênico (Mcdermott *et al.*, 2003).

Em 1929, o primeiro antibiótico (a penicilina G) foi descoberto por Fleming, seguido pelo surgimento de derivados sulfonamídicos na década de 30 e novas classes de antibióticos nos anos seguintes (Chopra *et al.*, 2002; Buynak *et al.*, 2004) (Tabela 2).

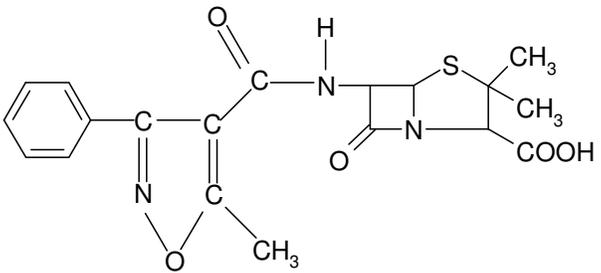
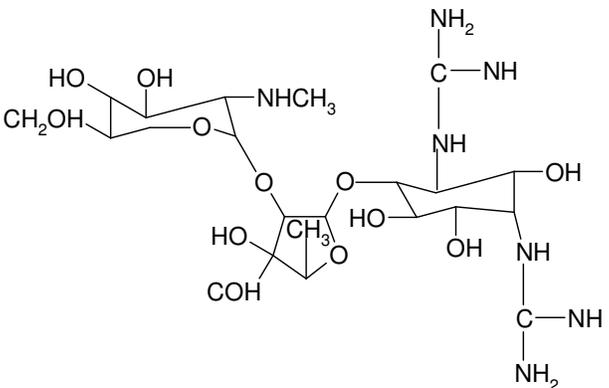
Tabela 2 – Antibióticos comumente utilizados no tratamento de infecções bacterianas.

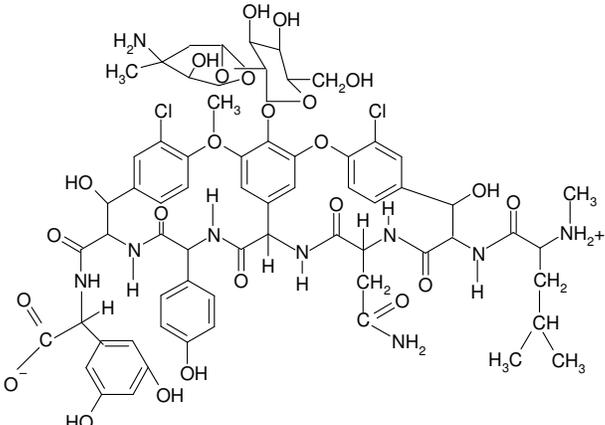
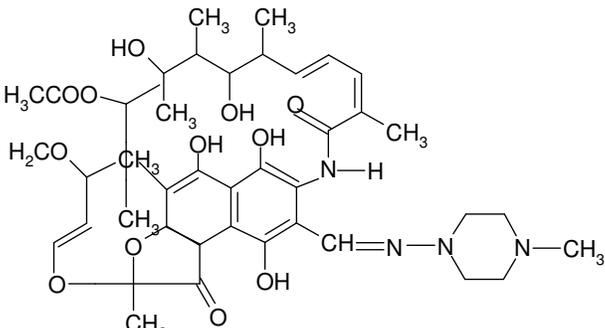
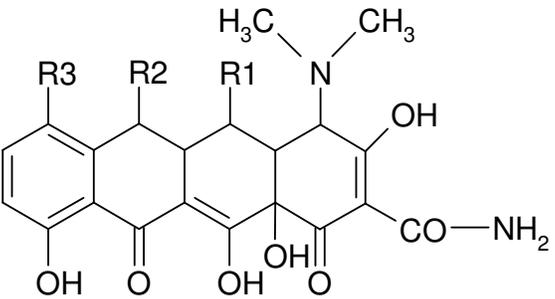
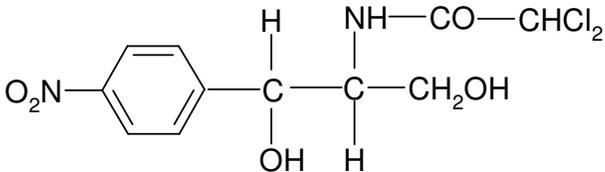
ANTIBIÓTICO	ALVOS	PRINCIPAIS INDICAÇÕES
Penicilinas	Bacilos Gram-positivos e negativos	Gonorréia; infecções estafilocócicas
Cefalosporinas	Pneumococos; Gram-negativos resistentes a beta-lactamase; enterobactérias; dentre outras.	Infecções estafilocócica com cepas sensíveis a penicilina
Carbapenemas	Bacilos Gram-positivos e negativos; aeróbios; anaeróbios; micobactérias; estafilococos resistentes a oxacilina	Infecções estafilocócicas com cepas resistentes a oxacilina
Aminoglicosídeos	Gram-negativos aeróbios; estafilococos; <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Brucelose; cancróide; gonorréia; tuberculose
Glicopeptídeos	Gram-positivos	Utilizado principalmente em infecções estafilocócicas com cepas resistentes
Tetraciclina	Parasitas intracelulares	Cancróide; cólera; granuloma inguinal
Cloranfenicol	Gram-positivas e negativas	Febre tifóide; meningite; cólera
Quinolonas	Gram-negativos	Infecções respiratórias e urinárias
Sulfonamidas	<i>Nocardia asteroides</i>	Brucelose; infecções urinárias

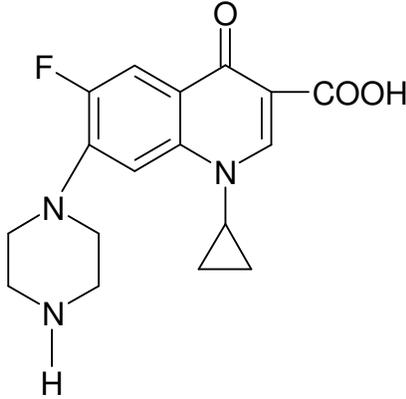
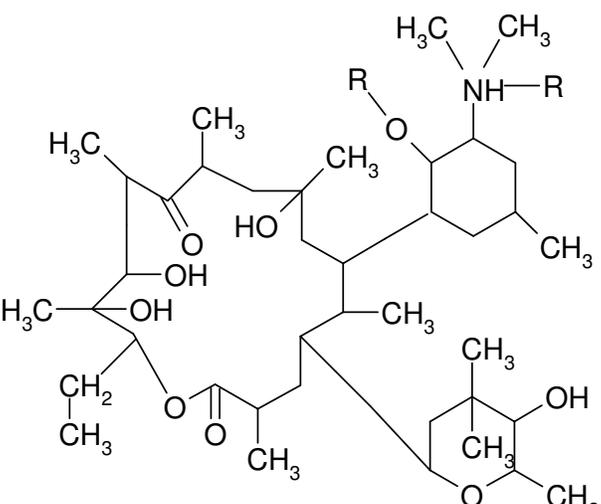
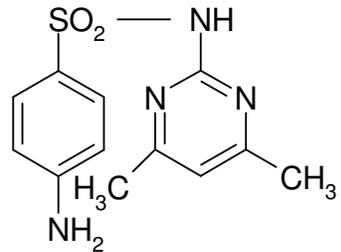
Embora tenham surgido inúmeras classes de antibióticos, observa-se atualmente que existe pelo menos uma cepa resistente a esses fármacos, seja na comunidade ou em hospitais (Fluit e Schmitz, 2004). Isto se deve à competência genético-bioquímica destes agentes infecciosos que desenvolveram estratégias de defesa contra as diferentes classes de

antimicrobianos colocados à disposição da medicina (Barbola e Levy, 2000)(Tabela 3).

Tabela 3: Classes de antibióticos e quimioterápicos.

CLASSES DE ANTIBIÓTICOS	EXEMPLOS	ESTRUTURA
BETA-LACTÂMICOS	penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems	<p style="text-align: center;">OXACILINA</p> 
AMINOGLICOSÍDEO	amicacina, canamicina, estreptomicinas	<p style="text-align: center;">ESTREPTOMICINA</p> 

<p>GLICOPEPTÍDEOS</p>	<p>teicoplanina e vancomicina</p>	<p>VANCOMICINA</p> 
<p>RIFAMICINAS</p>	<p>rifamicina SV, rifamicina M e rifampicina</p>	<p>RIFAMPICINA</p> 
<p>TETRACICLINA</p>	<p>doxiciclina, limeciclina, minociclina</p>	<p>TETRACICLINA</p> 
<p>CLORANFENICOL</p>	<p>-</p>	<p>CLORANFENICOL</p> 

<p>QUINOLONAS</p>	<p>ciprofloxacina esparfloxacina, levofloxacina, norfloxacina</p>	<p>CIPROFLOXACINA</p>  <p>The structure shows a quinolone core with a fluorine atom at position 6, a cyclopropyl group at position 8, a piperazine ring at position 4, and a carboxylic acid group at position 3.</p>
<p>MACROLÍDIOS</p>	<p>azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina</p>	<p>ERITROMICINA</p>  <p>The structure shows a 14-membered macrolide ring with multiple methyl groups, hydroxyl groups, and a side chain containing a dimethylamino group and a piperidine ring.</p>
<p>SULFONAMIDAS</p>	<p>sulfonamida, sulfapiridina, sulfametoxazol sulfadimidina</p>	<p>SULFADIMIDINA</p>  <p>The structure shows a benzene ring with a sulfonamide group (SO₂NH-) at position 1, a methyl group at position 3, and an amino group (NH₂) at position 4. It is linked to a pyridine ring with methyl groups at positions 2 and 6.</p>

Alguns destes antibióticos são produzidos por microorganismos, como as bactérias do gênero *Streptomyces* (estreptomicina) e os fungos dos gêneros

Penicillium (penicilina) e *Cephalosporium* (cefalosporina) (Freitas, 1983; Fauci, 2001; Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006), sendo alguns deles utilizados como controle positivo neste trabalho de dissertação.

1.2.1 – Penicilinas

A penicilina é uma molécula caracterizada pela presença do anel β -lactâmico. Atualmente existem vários tipos de penicilinas onde a diferença estrutural está na variação do radical R (Figura 1) (Noga e Silphaduang, 2003; Brown, 2004; Buynak, 2004). As penicilinas G e V são penicilinas naturais, sintetizadas por fungos do gênero *Penicillium*, enquanto outras são semi-sintéticas sendo classificadas como: *amino-penicilinas* (ampicilina e amoxicilina); *carboxi-penicilinas* (carbenicilina, ticarcilina, meticcilina, cloxacilina, flucloxacilina e oxacilina) e *ureido-penicilinas* (azlocilina, mezlocilina e piperacilina) (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006; Zhanel *et al.*, 2007).

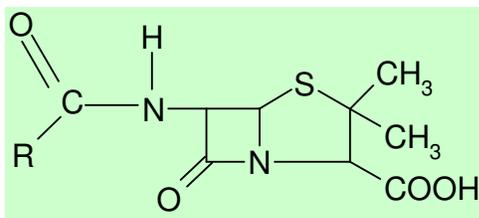


Figura 1 – Estrutura das Penicilinas.

As penicilinas semi-sintéticas apresentam uma melhor atividade em consequência das modificações estruturais (Brown, 2004; Buynak, 2004). A ampicilina e a amoxicilina são penicilinas de amplo espectro que agem sobre bacilos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo estas sensíveis aos mecanismos de resistência das bactérias (ex.: beta-lactamase). A oxacilina é um antibiótico de espectro reduzido, não tendo efeito sobre bacilos Gram-negativos, mas é resistente a beta-lactamase (Bomono e Szabo, 2006; Eggertson, 2007; Schindler, 2007).

1.2.2 – Cefalosporinas

Assim como as penicilinas, as cefalosporinas são classificadas como antibióticos beta-lactâmicos e podem ser de origem natural (fungo *Cephalosporium*) ou de origem semi-sintética (Barcenilla *et al.*, 2001; Glauser *et al.*, 1983). Existem vários tipos de cefalosporinas que variam nos radicais R1 e R2 (Figura 2).

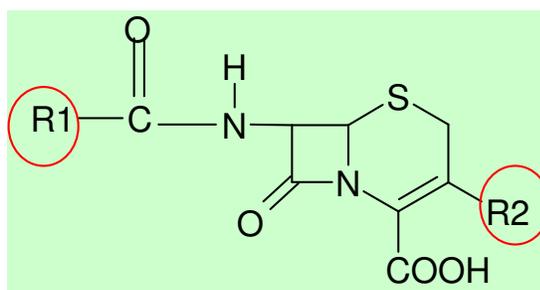


Figura 2 - Estrutura das Cefalosporinas.

Atualmente as cefalosporinas são divididas em 4 grupos:

Cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxil e cefradina), sendo indicadas para infecções estafilocócicas com cepas sensíveis a oxacilina, infecções respiratórias por *Haemophilus influenzae* e pneumococos sensíveis a penicilina, dentre outras (Hooper, 2005; Bomono e Szabo, 2006).

Cefalosporina de 2ª geração (cefexitina, cefamandol, cefaclor e cefuroxima), resistentes a beta-lactamase, produzida por Gram-negativos e que apresentam uma boa atividade frente as cepas anaeróbias estritas e algumas enterobactérias (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae*) (Hooper, 2005; Bomono e Szabo, 2006).

Cefalosporinas de 3ª geração (ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona, ceftazidima, cefpodoxima e cefixima), são ainda mais resistentes a inativação pela beta-lactamase, sendo indicadas no caso de infecções por Gram-negativos resistentes como as cepas intra-hospitalares e no caso de meningite causada por *Haemophilus influenzae*, dentre outras (Bomono e Szabo, 2006).

Cefalosporina de 4ª geração (cefepima e cefipiroma) são resistentes a beta-lactamase de enterobactérias e podem agir sobre alguns cocos Gram-positivos e bactérias anaeróbias (Bomono e Szabo, 2006).

1.2.3 – Carbapenens

Os carbapenens são beta-lactâmicos de amplo espectro, estáveis frente a beta-lactamase. Estes antibióticos possuem atividade sobre cocos e bacilos Gram-positivos e negativos, aeróbios e anaeróbios (Zhanel *et al.*, 2007). Alguns bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose, micobactérias e estafilococos resistentes a oxacilina são resistentes também aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem). Estes antibióticos sofrem hidrólise renal por ação de enzimas hidrolíticas, que devem ser neutralizadas por uso de inibidores (cilastina sódica) (Zhanel *et al.*, 2007).

1.2.4 – Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (estreptomicina, kanamicina, gentamicina, neomicina, tobramicina, amicacina e metilmicina) são drogas bactericidas com ação sobre bactérias Gram-negativas aeróbias, alguns estafilococos e *M. tuberculosis* (Atakan *et al.*, 2002; Severino e Magalhães, 2002; Atakan *et al.*, 2002). O aminoglicosídeo pode ser ministrado com sinergismo com a penicilina que age sobre a síntese de parede celular, facilitando a entrada dos aminoglicosídicos em tratamentos contra estafilococos (Bomono e Szabo, 2006).

1.2.5 – Glicopeptídeos

Este grupo é composto por dois antimicrobianos de importância terapêutica (vancomicina e teicoplanina) tendo atividade sobre Gram-positivos,

principalmente contra *S. aureus* e *S. epidermidis* (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006; Nettey *et al.*, 2007). A vancomicina apresenta uma alta toxicidade renal que denota, apesar de sua eficiência, a necessidade de outras opções na antibioticoterapia (Bomono e Szabo, 2006; Nettey *et al.*, 2007).

1.2.6 – Tetraciclinas

Essas moléculas são antibacterianos de largo espectro (doxiciclina, limeciclina, minociclina), que apresentam como principal característica a boa difusão para o interior da célula. Elas podem ser utilizadas no tratamento de infecções provocadas por clamídeas, riquetsias, micoplasmas, brucelas, dentre outras (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006).

1.2.7 – Cloranfenicol

Esse antibacteriano de largo espectro é uma das principais drogas utilizadas contra bactérias anaeróbias, sendo a droga de primeira escolha no tratamento da febre tifóide (Potrykus *et al.*, 2002). Ele também é indicado no caso de meningite provocada por *H. influenzae* (Smith *et al.*, 2007).

1.2.8 – Quinolonas

Esse antibacterianos com principal atividade contra Gram-negativos que são classificados de acordo com seu espectro de ação: 1ª geração (Ácido

Nalidíxico, Cinoxacina e Ácido Oxolínico); 2ª geração (Norfloxacin, Ciprofloxacina, Lomefloxacina e Ofloxacina); 3ª geração (Levofloxacina e Trovafloxacina) e 4ª geração (Moxifloxacina e Gatifloxacina) (Severino e Magalhães, 2002). Eles são indicados contra agentes de infecções urinárias, gastrintestinais, *Neisseria gonorrhoeae* e bacilos Gram-negativos multirresistentes a beta-lactâmicos e aminoglicosídeos (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006).

1.2.9 – Sulfonamidas

As “sulfas” (Sulfonamida, Sulfapiridina, Sulfametoxazol, dentre outras) são drogas de largo espectro de ação, mas com o uso clínico bastante limitado atualmente, devido principalmente, a disponibilidade de drogas mais eficazes (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Patel *et al.*, 2004). As sulfonamidas têm sido indicadas no tratamento de diversas infecções incluindo as causadas por *N. asteroides* (Bomono e Szabo, 2006).

1.3 – Mecanismo de Ação dos Antibióticos e o Metabolismo Bacteriano

Os antibióticos podem agir sobre bactérias patogênicas susceptíveis a partir da interrupção de seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático) e/ou indução da morte bacteriana (efeito bactericida, bacteriolítico) (Chopra *et al.*, 2002; McDermott *et al.*, 2003; Harris e Thorarensen, 2004). Estes efeitos

ocorrem através da interferência sobre as vias metabólicas desses agentes infecciosos que podem alterar desde a permeabilidade (membrana externa) até a síntese (parede celular, ácido fólico, DNA, RNA e proteínas) dessas bactérias (Figura 3) (Neu,1992; Nikaido, 2001; Chopra *et al.*, 2002; Pages, 2004).

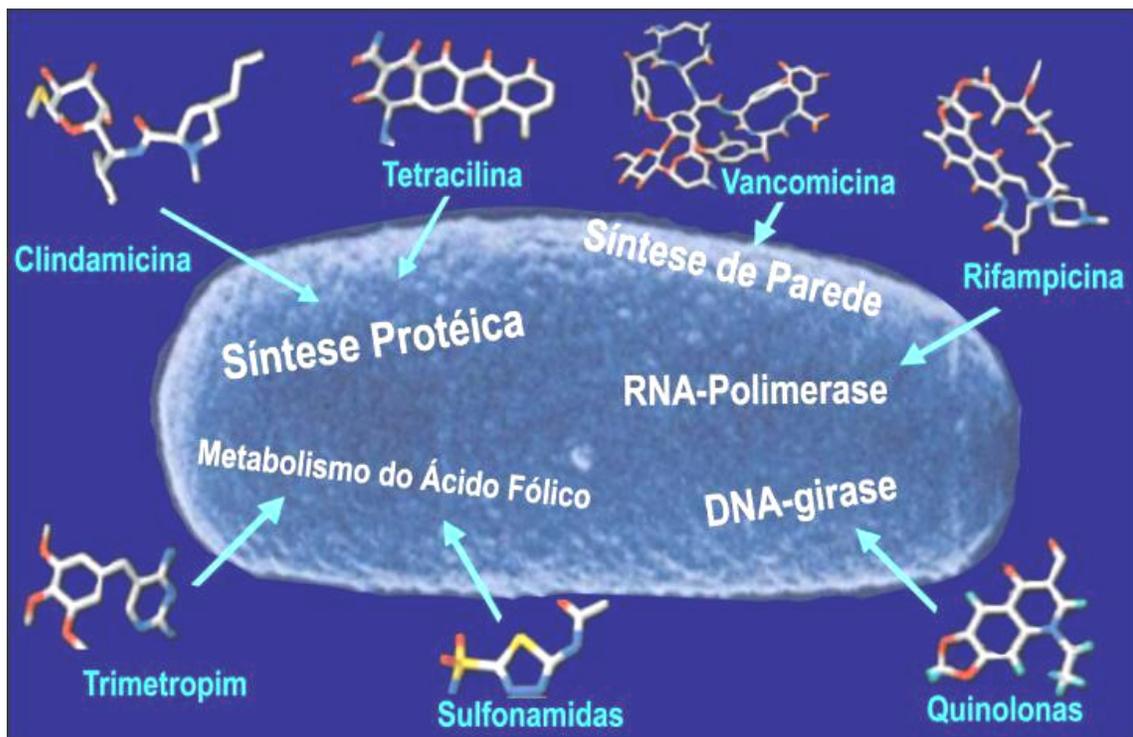


Figura 3 – Sítios de ação dos principais antibióticos e quimioterápicos, freqüentemente empregados em clínica.

1.3.1 - A Ação Antibiótica sobre a Parede Celular

A composição química da parede celular de bactérias Gram-positivas inclui o polipeptideoglicano, carboidratos, ácido teóico e o ribonucleato de magnésio (Riley *et al.*, 2002). Os processos de síntese e a lise da parede

celular das bactérias em crescimento estão continuamente em equilíbrio. No caso de ocorrência da inibição da síntese de algum constituinte da parede celular, como, por exemplo, o polipeptideoglicano, poderá ocorrer um desequilíbrio e a ação de autolisinas destruindo as bactérias (Chopra *et al.*, 2002; McDermott *et al.*, 2003; Harris e Thorarensen, 2004).

Antibióticos como a penicilina, cefalosporina, fosfomicina, vancomicina, ristocetina e bacitracina inibem a síntese da parede celular competindo ou inibindo as enzimas participantes desta síntese (Majiduddin *et al.*, 2002; Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Patel *et al.*, 2004; Bomono e Szabo, 2006) (Figura 4).

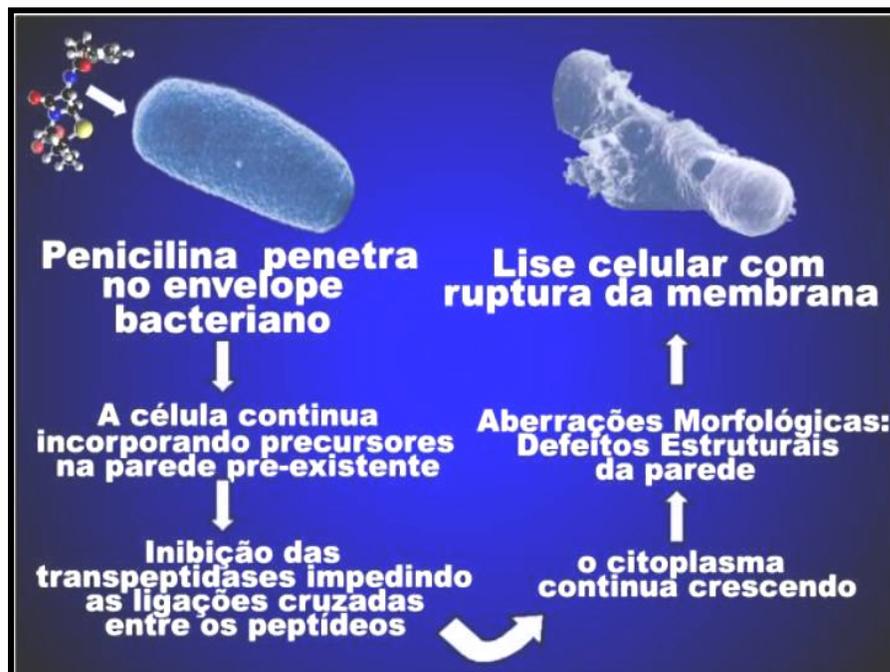


Figura 4: Etapas da ação da penicilina sobre a parede celular.

A bacitracina age impedindo a ação do transportador fosfolipídico, enquanto a ristocetina, penicilina e a vancomicina interrompem a reação de transglicosilação envolvidas na síntese do polipeptidoglicano, fazendo com que ocorra um acúmulo de precursores de peptidoglicano no interior da célula, podendo ocasionar a lise celular (Figura 4). A bacitracina, vancomicina e ristomicina atuam ainda na membrana plasmática sendo tóxicas para as células do hospedeiro (Chopra *et al.*, 2002; Harris e Thorarensen, 2004).

Os antibióticos beta-lactâmicos (penicilina, cefalosporina, carbapenemas, etc.) podem se ligar de forma irreversível as proteínas fixadoras de penicilina (PBPs) impedindo a síntese da parede celular. Desta forma, os precursores da parede celular se acumulam no espaço periplasmático, por inibição das transpeptidases, ocasionando a lise celular (Figura 4) (Rolinson, 1998; Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006; Zhanel *et al.*, 2007).

Alguns antibióticos como a meticiclina e a oxacilina são inativos frente a cepas Gram-negativas, pois não conseguem ultrapassar a membrana externa destas bactérias, impedindo a difusão dos antibióticos para o seu alvo no interior celular ao qual se constitui em um fator primordial para a ação antibiótica (Brown, 2004; Buynak, 2004). A composição da parede varia de acordo com o tipo de bactéria e origina diferenças de permeabilidade aos compostos, influenciando diretamente na ação do antibiótico. O tamanho molecular e a estrutura química do antibiótico também determinam e

influenciam no seu modo de ação (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006).

No caso de bactérias em isotonia com o meio (ex.: urina), não ocorre a lise celular e elas poderão sobreviver na forma de esferoplasto ou protoplasto. Essas bactérias não conseguirão se reproduzir enquanto durar a ação do antibiótico (Brown, 2004; Buynak, 2004). Em bactérias Gram-negativas, a lise osmótica pela inibição da síntese da parede é demorada, devido a menor pressão osmótica nestes microorganismos e diferença nos constituintes da parede celular (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Patel *et al.*, 2004)

1.3.2 – A Ação Antibiótica sobre a Membrana Celular

Os microorganismos Gram-positivos apresentam uma membrana celular semelhante a dos eucariontes cuja única diferença é a ausência de colesterol em sua constituição (Nikaido *et al.*, 2001). Neste microorganismo, a membrana fica situada logo abaixo da parede celular, criando um espaço na face externa da membrana, denominado espaço periplasmático. Nos microorganismos Gram-negativos existem duas membranas, uma na face externa da parede celular e outra na face interna. Assim drogas com baixa lipossolubilidade têm maior dificuldade em agir sobre as bactérias Gram-negativas por causa da membrana externa (Hashimoto *et al.*, 1997). Contudo existem proteínas na membrana externa das bactérias Gram-negativas, denominadas porinas, que podem facilitar a passagem de substâncias para o espaço periplasmático .

Alguns antibióticos passam livremente para o interior da célula bacteriana, como por exemplo a espiramicina e o cloranfenicol, enquanto outros penetram através de um sistema ativo de transporte, como ocorre com a fosfomicina e os aminoglicosídeos (Hashimoto *et al.*, 1997; Nikaido *et al.*, 2001) Existem antibacterianos (ex.: polimixinas) que se ligam aos constituintes normais da membrana causando uma desorganização funcional, já que modificações na permeabilidade podem comprometer o metabolismo da célula (Majiduddin *et al.*, 2002; Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Patel *et al.*, 2004; Lubeiski *et al.*, 2006; Bomono e Szabo, 2006). A membrana pode, ainda, sofrer alterações nos seus constituintes, como são observadas com o uso da estreptomicina e outros aminoglicosídeos. Tendo em vista que a membrana celular das bactérias é semelhante a membrana das células de mamíferos, os antibióticos que agem sobre a membrana podem ser tóxicos para as células humanas (Nikaido *et al.*, 2001).

1.3.3 –A Ação Antibiótica Sobre a Síntese de Proteínas e Metabólitos

Os antibióticos podem atuar sobre diversas etapas da síntese protéica bacteriana (Tabela 4). Dentre estas, o ribossomo é uma estrutura alvo que nas células eucarióticas são do tipo 80S enquanto nas células procarióticas são 70S (Da Silva, 2007). A diferença na estrutura do ribossomo é responsável pela toxicidade seletiva dos antibióticos. Entretanto, a mitocôndria humana

também possui ribossomos 70S podendo sofrer a ação de alguns destes antibióticos (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Patel *et al.*, 2004; Bomono e Szabo, 2006).

Tabela 4: Antibióticos que agem sobre a síntese protéica.

Antibiótico	Ação
<i>Cloranfenicol</i>	Inibição da formação das ligações peptídicas durante o alongamento da cadeia polipeptídica
<i>Eritromicina</i>	Interação com a subunidade 50S do ribossomo 70S
<i>Tetraciclina</i> s	Interferência na fixação do tRNA no ribossomo, impedindo assim, a adição de aminoácidos
<i>Estreptomicina</i> <i>Gentamicina</i>	Interferência no início da síntese protéica, alterando a conformação da subunidade 30S, no ribossomo 70S procaríoto, induzindo a leitura errônea do mRNA.
<i>Rifocinas</i>	Ligação irreversível ao RNA-polimerase das bactérias bloqueando a iniciação da cadeia de RNA

A atividade enzimática específica de um microorganismo pode ser inibida também competitivamente por antimetabólitos que se assemelham muito ao substrato normal da enzima como as sulfonas e o trimetoprim na síntese do ácido fólico (Bomono e Szabo, 2006) (Figura 3).

1.3.4 – A Ação Antibiótica Sobre a Replicação do DNA cromossômico

O DNA cromossômico é formado por duas cadeias de nucleotídeos em espiral onde o superespiramento é controlado por ação da DNA-girase (topoisomerase II) e a replicação pela DNA-polimerase (Harris e Thorarensen, 2002). A maioria dos antibióticos que agem sobre a replicação do DNA não apresenta toxicidade seletiva, afetando as células humanas, como é o caso da mitomicina (NIAID, 2006). Outros são empregados na terapêutica como griseofulvina, novobiocina e as quinolonas (Bomono e Szabo, 2006; NIAID, 2006)

1.4 - A Resistência Bacteriana aos Antibióticos e Quimioterápicos

1.4.1 – Conceitos Gerais

Devido aos diferentes mecanismos de patogenicidade bacteriana, uma infecção pode ser tratada por diversos antibióticos, devendo ser escolhido aquele ao qual a bactéria apresente sensibilidade (NIAID, 2006, WHO, 2007). Entretanto, a resistência aos antibióticos tem sido um sério problema para a medicina, desde a implantação da antibioticoterapia nos primórdios da década de 1940 (Bomono e Szabo, 2006; NIAID, 2006; WHO, 2007). Os problemas com cepas resistentes vêm se agravando ano após anos, em parte, como consequência do uso inadequado dessas drogas, além de diversos outros fatores (Dupont e Steele 1987; Teuber, 2001; White *et al.*, 2002; Jacoby, 2005; NIAID, 2006; WHO, 2007). Em pleno século XXI, esse desafio se mostra ainda

mais crítico, face ao crescente aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes e ocorrência de resistência entre as diferentes espécies de bactérias (Ex.: *E. faecalis*, *M. tuberculosis*, *N. gonorrhoeae*, *P. pneumoniae* e *S. aureus*) (Min *et al.*, 2007).

Uma bactéria é considerada resistente a um determinado antibiótico, quando é capaz de crescer, *in vitro*, em concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pela droga no sítio da infecção (Tortora *et al.*, 2005; Trabulsi e Altherthum, 2005). Esta resistência é determinada pelo genoma da bactéria, que codifica a expressão de mecanismos bioquímicos capazes de neutralizar os efeitos dos antibióticos (Saunders, 1984).

O conceito de resistência é relativo e é definido em função das concentrações terapêuticas possíveis de serem atingidas no sangue, que é bastante inferior àquela alcançada em certos fluidos, secreções e tecidos (Ang *et al.*, 2004). Assim, uma bactéria pode ser resistente à concentração da droga no sangue, mas ser morta por esta mesma droga ao se localizar, por exemplo, nas vias respiratórias, devido às mais altas concentrações alcançadas neste local. O contrário pode acontecer, quando uma bactéria sensível se localiza em uma área onde o antibiótico não atinge uma boa concentração (Jacob *et al.*, 2004). Por exemplo, o tratamento de uma meningoencefalite meningocócica com a eritromicina resulta em insucesso terapêutico, pelo fato desse macrolídeo não atravessar, adequadamente, a barreira hematoencefálica e, assim, não

alcançar a concentração suficiente para a cura da infecção (Erson, 2005; Rolain e Rault, 2005).

As bactérias adotam mecanismos, a fim de sobreviverem à ação letal dos antibióticos e quimioterápicos, que incluem a resistência, a tolerância e a persistência (Freitas *et al.*, 1989; Van Assett *et al.*, 1996). No caso da resistência, a bactéria continua proliferando, isto é, mantém a mesma velocidade de crescimento mesmo ao ser tratada com o antibiótico. Na tolerância, o crescimento é inibido, mas o número de bactérias viáveis não sofre alteração por longo período. De fato a bactéria desenvolve defesa apenas contra o efeito bactericida do antibiótico onde, o sucesso terapêutico somente será alcançado quando a concentração do antibiótico alcançar o valor da concentração mínima bactericida (CMB), definida como a menor concentração do antibiótico capaz de matar 99,9% das bactérias presentes. Finalmente, na persistência, uma pequena fração da população bacteriana submetida ao tratamento não sofre o efeito bactericida do antibiótico, independentemente de seu mecanismo de ação (Jacoby, 2005; Erson, 2005; Rolain e Rault, 2005).

Esses três mecanismos de defesa têm grande importância clínica, uma vez que, no caso da resistência, o fracasso terapêutico é total, restando, como única opção de tratamento, a substituição do antibiótico por outro ao qual a bactéria seja sensível (Min *et al.*, 2007). A persistência e a tolerância são críticas nos casos em que o combate à infecção envolve pacientes imunossuprimidos, como os aids, nos quais o sucesso da

antibioticoterapia depende, essencialmente, do efeito bactericida da droga. Assim cessado o efeito inibitório do antibiótico ao qual a cepa é persistente ou tolerante, a infecção recrudescer, face à inexistência das defesas do organismo (Jacoby, 2005).

1.4.2 – Resistência - Origem e Classificação

Quanto à origem, a resistência bacteriana aos antibióticos pode ser classificada como natural ou adquirida (Levy, 1998). Resistência natural, também dita intrínseca, está associada ao cromossomo da bactéria e tem, portanto, um caráter hereditário transmitido às células filhas. Esta resistência é, por conseguinte, uma característica transmitida, verticalmente, às bactérias descendentes, que são geradas sem a presença dos receptores do antibiótico ou com a presença de estruturas e mecanismos que impede à ação da droga (Murray e Moellering, 1978). Sabidamente, a resistência natural a uma determinada droga é uma característica indispensável à autodefesa dos microorganismos produtores desta droga, geralmente utilizado frente a competição com outras cepas pelo mesmo habitat (Aymes e Gemmell, 1997; De Lima *et al.*, 2005).

Se por um lado, a resistência natural não apresenta significado clínico relevante, por ser previsível e constante, bastando-se conhecer o espectro de ação do antibiótico para evitá-la; a resistência adquirida, ao contrário, é responsável por problemas médicos importantes, tendo em vista a larga participação de microorganismos com sensibilidade modificada aos antimicrobianos na etiologia das infecções (Freita. 1999; Rolain e Rault, 2005). A resistência bacteriana adquirida a um ou mais antibióticos consiste em uma característica nova, que é exibida por alguma célula da população de uma determinada espécie de bactéria. Estes exemplares (modificados) da

população bacteriana não respondem mais à ação de antibióticos que continuam ativos contra o restante das bactérias presentes (Suassuna e Suassuna, 1971).

1.4.3 - Resistências Simples, Múltipla e Cruzada

A resistência pode ser denominada como: a) simples, quando a bactéria resiste à ação de um único antibiótico; b) múltipla, quando há simultaneidade de resistência a dois ou mais antibióticos; e c) cruzada, quando o mecanismo bioquímico da resistência para um determinado antibiótico se estende também sobre outros (Jacob *et al.*, 2004). Um exemplo clássico da resistência cruzada é exibido pelo *S. aureus* à penicilina G, com a produção da enzima beta-lactamase, a qual hidrolisa o anel beta-lactâmico deste antibiótico, tornando-o inativo. Esta enzima, obviamente, também inativa outros antibióticos portadores do anel beta-lactâmico como as cefalosporinas, carbapenens, cefamicinas, oxacefens e monobactams (Rouveix, 2007).

Em sua grande maioria, os antibióticos, aparentemente, não têm poder mutagênico sobre cepas sensíveis ou resistentes. Entretanto, esses podem selecionar as cepas resistentes já presentes, ao matar as cepas sensíveis. Alguns desses antibióticos podem induzir a resistência em algumas espécies de bactérias, tendo sido observado principalmente com os novos beta-lactâmicos (cefalosporinas, carbapenens, etc.) (Majiduddin *et al.*, 2002). Isto resulta da inibição da repressão gênica e conseqüente produção e liberação de

enzimas inativadoras dos antibióticos. Dois tipos dessas enzimas são descritos na literatura: a) as constitutivas, cuja síntese independe da presença do antibiótico; e b) as induzidas, em que a sua síntese é desencadeada pela presença da droga (Murray e Morllering, 1978).

1.4.4 - Mecanismos Bioquímicos da Resistência Bacteriana

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibióticos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (Jacoby, 2005; Hooper, 2005; Bomono e Szabo, 2006; Min *et al.*, 2007) (Figura 5). Esses mecanismos incluem:

- a) modificação química do antibiótico, através de enzimas específicas;
- b) alteração do sítio de ligação do antibiótico;
- c) substituição do sítio de ligação da droga;
- d) diminuição da permeabilidade ao antibiótico;
- e) aumento da síntese de substrato com o qual a droga compete;
- f) efluxo do antibiótico, por intermédio de transporte ativo (Rouveix, 2007)
- g) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

Esses mecanismos podem coexistir em uma mesma cepa bacteriana que, ainda pode desenvolver resistência cruzada contra distintos antibióticos (Neu, 1992; Gold e Moellering, 1996; Russel, 2002; Chopra *et al.*, 2002). A resistência pode ser consequência da ação de outros fatores, como o sítio de infecção onde se encontra a cepa bacteriana e a concentração do antibiótico.

O uso inadequado de antibióticos e a sobrevivência de bactérias em indivíduos imunossuprimidos aumentam a exposição das bactérias a esses antibióticos, possibilitando também o surgimento de cepas resistentes (Chumpolkulwong *et al.*, 2004). Assim, dentre inúmeras bactérias, uma pode sofrer mutação gerando cepas resistentes que podem ser selecionadas pelos antibióticos. Estas cepas se multiplicam, podendo passar os seus genes de resistência através de diferentes mecanismos genéticos de aquisição (Figura 5 e Tabela 5) (Chumpolkulwong *et al.*, 2004; Fluit e Schmitz, 2004).

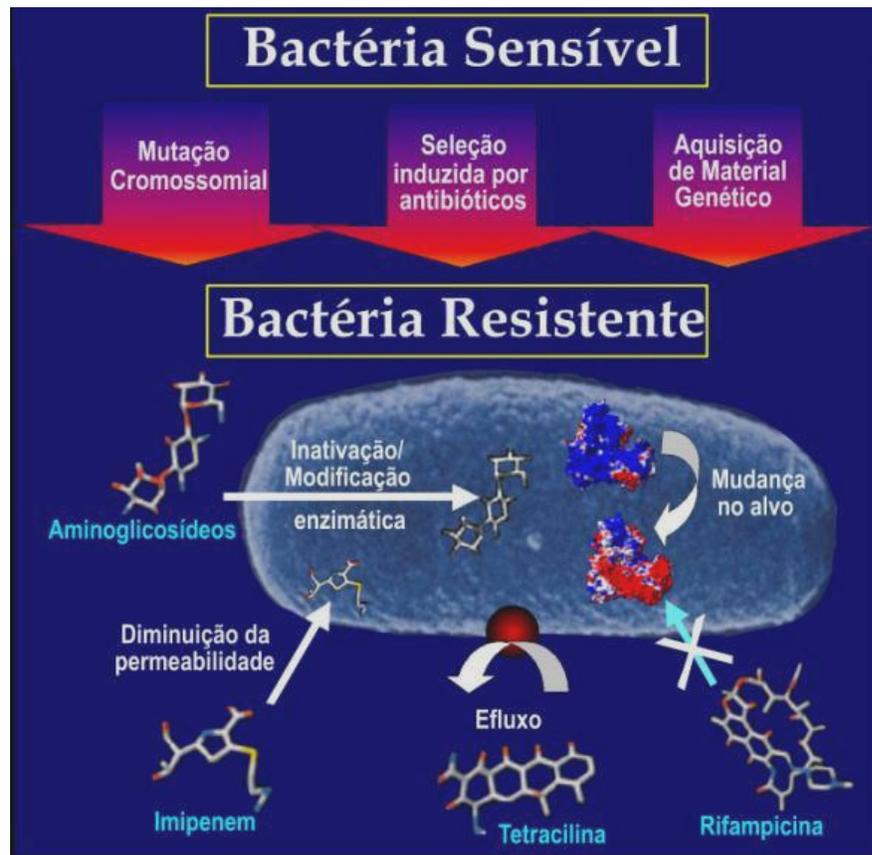


Figura 5 - Principais mecanismos envolvidos no processo de geração de bactérias resistentes.

1.4.5 - Mecanismos Genéticos de Transferência da Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana adquirida aos antibióticos é desenvolvida por meio de mecanismos genéticos-bioquímicos básicos (Tabela 5), como a mutação, transdução, transformação, transposição e conjugação (Saunders, 1975 e 1984; Hashimoto, 1997).

Tabela 5: Principais mecanismos de aquisição de resistência.

Mecanismo	Atuação	Tipo de resistência
Mutação	1 mutante a cada 100.000.000 células	simples
Transdução	Bacteriófago	simples
Conjugação	Plasmideo	Múltipla

1.4.5.1 - Mutação

A mutação é um fenômeno decorrente de um grande número de divisões da célula bacteriana em um tempo reduzido (Erson, 2005; Rolain e Rault, 2005). Essa alta velocidade de divisão pode levar à troca de bases no processo de síntese do DNA, resultando na modificação das características genéticas da bactéria, que pode adquirir resistência aos antibióticos. Neste tipo de fenômeno, a resistência é adquirida apenas para um tipo de antibiótico,

sendo a bactéria mutante selecionada pela ação do próprio antibiótico (Jacobs *et al.*, 2005).

1.4.5.2 - Transformação

Esse mecanismo consiste na captação, por uma bactéria receptora, do DNA proveniente do cromossomo ou de plasmídeo liberado pela bactéria doadora . Em condições naturais, a transformação acontece quando a bactéria doadora sofre uma lise e o seu DNA que é captado pela bactéria receptora (Jacoby, 2005; Erson, 2005; Rolain e Rault, 2005). A transformação, entretanto, é um mecanismo de pouca importância clínica e baixa relevância na transferência da resistência em condições naturais, pois, para ela acontecer, é necessário que a bactéria doadora apresente um estado de competência e condições ambientais adequadas (Rouveix, 2007). A transformação habitualmente só acontece entre bactérias da mesma espécie e tem sido constatada entre hemófilos, neissérias, estafilococos e estreptococos (Saunders, 1984; Tortora *et al.*, 2005).

1.4.5.3- Transdução

Esse mecanismo permite a transferência de genes da resistência de uma bactéria para outra com a mediação de bacteriófagos, sendo limitado a bactérias da mesma espécie (Jacoby, 2005). A transdução de genes cromossômicos da resistência não apresenta importância prática, visto que, apenas ocasionalmente, acontece a incorporação de fragmentos de DNA

cromossômico com genes de resistência no fago. Além disto, se o fragmento traduzido não se combinar corretamente com o cromossomo da nova bactéria infectada, ele poderá ser hidrolisado ou permanecer no citoplasma sem se replicar, vindo a desaparecer com a contínua multiplicação da bactéria (Rouveix, 2007).

A transdução por plasmídeo é o principal mecanismo de aquisição de resistência dos estafilococos, podendo, esta resistência, ser simples, quando o plasmídeo apresentar apenas um gene determinante desta característica (Ex.: contra a penicilina G); mas também poderá ser múltipla, desde que o plasmídeo carregue os genes mediadores correspondentes (Ex.: contra a canamicina, eritromicina, penicilina e tetraciclina). Além disto, os estafilococos podem incorporar diversos plasmídeos contendo genes diferentes, já tendo sido descrito casos de até 40 cópias de um pequeno plasmídeo em uma única célula (Saunders, 1984).

1.4.5.4 - Conjugação

Esse mecanismo de transferência de uma bactéria viável para outra, mediado por uma organela denominada fímbria sexual ou pili sexual (Srinivasan *et al.*, 2002). Na ausência do pili sexual, o contato célula-célula é feito através de proteínas especiais denominadas adesinas. O pili é parte da bactéria doadora, que possui um plasmídeo conjugativo, responsável pela resistência conferida à célula receptora . O plasmídeo é replicado na bactéria

doadora (F^+) e a sua cópia, que é filamento simples de DNA, é passada para a bactéria Receptora (F^-), assim denominada pela ausência do plasmídeo, formando uma célula filha (F^+) (Min *et al.*, 2007) (Tabela 5). A célula filha pode então incorporar o plasmídeo ao seu cromossomo em um processo de recombinação gênica e passar o plasmídeo incorporado com pedaços de cromossomo para outra bactéria (Neu, 1992).

1.4.5.5 - Transposição

Este mecanismo consiste na transferência de genes de um plasmídeo para outro, para o cromossomo ou para um bacteriófago (Srinivasan *et al.*, 2002). Esta transferência é feita por meio de uma molécula de DNA (plasmídeo ou cromossomo) para outra (plasmídeo ou fago). Ao contrário dos plasmídeos, os transposons não são auto-replicáveis, por isto, eles devem permanecer como parte de um replicon funcional (DNA que se auto-replica), como os plasmídeos, os bacteriófagos ou o cromossomo da célula (Saunders, 1975). Os transposons incorporados em plasmídeos ou no cromossomo bacteriano podem se manter estáveis e serem duplicados juntamente com o DNA receptor (Bomono e Szabo, 2006; Min *et al.*, 2007).

1.4.6 – Situação Atual da Resistência

A evolução das cepas de bactérias resistentes e multirresistentes, através da história tem sido rápida e preocupante. O surgimento destas cepas se iniciou em 1944, nos Estados Unidos, quando foi registrado o primeiro caso de

resistência à penicilina em *Staphylococcus* sp. em ambiente hospitalar (Erson, 2005; Rolain e Rault, 2005). Recentemente, a existência de uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA –meticillin resistant *S. aureus*), um dos antibióticos clínicos utilizados atualmente, foi descrita nos Estados Unidos (Srinivasan *et al.*, 2002). Esta resistência ocorre pelo processo de conjugação, em que houve a troca de genes com uma cepa de *Enterococcus* resistente ao glicopeptídio vancomicina (VRE – Vancomycin Resistant *Enterococcus*) dando origem a uma cepa multiresistente à meticilina e à vancomicina (MuRSA – Multiresistant *S. aureus*) (Srinivasan *et al.*, 2002; Rouveix, 2007) e de forma ainda mais crítica, a cepa de *Enterococcus* dependentes da vancomicina (VDE – Vancomycin Dependent *Enterococcus*) (Srinivasan *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2007).

Apesar da grande diversidade de estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação dos antibióticos, o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes tem sido cada vez mais difícil (Nettey *et al.*, 2007). Não há, atualmente, um único antibiótico em uso clínico, contra o qual não exista, pelo menos, uma cepa a ele resistente, sendo o sucesso no combate às infecções bacterianas e o controle sobre o aparecimento de bactérias resistentes, dependente do emprego criterioso dos antibióticos, quimioterápicos e da descoberta de novos medicamentos que possam ser disponibilizados para uso em hospitais e na comunidade (Erson, 2005; Rolain e Rault, 2005; De Lima *et al.*, 2005).

1.5 – Fontes de Novos Protótipos de Antibióticos

A busca por novos antibióticos pode permitir uma melhoria no tratamento de infecções por organismos patogênicos resistentes aos antibióticos convencionais, onde estas cepas são debilmente controladas por poucos antibióticos, contra os quais pode, rapidamente, surgir um processo de resistência. Com isto, novas fontes para a descoberta de protótipos de antibióticos, sejam essas de origem vegetal ou animal ou mesmo sintética, são de grande interesse para a comunidade mundial (WHO, 2007).

1.5.1 – Moléculas de Origem Sintética

1.5.1.1 - Sistemas Tienopiridina e Pirazolopiridina

A Linezolida (Zyvoxid) é uma droga de escolha médica para o tratamento de infecções associadas a *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina e na aquisição de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) (Figura 7). Entretanto, a toxicidade e emergentes casos de resistência, prolongam o tratamento, podendo torná-lo ineficaz (Lohray *et al.*, 2004). Recentes descobertas dão conta de que a fusão com anel tienopiridina origina derivados que apresentam atividade semelhante ao Linezolida contra *S. aureus in vitro* (Lohray *et al.*, 2004).

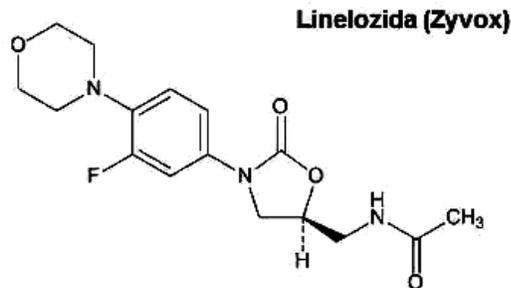


Figura 6: Estrutura do Linezolid.

A literatura sobre derivados tienopiridina também descreve diversas atividades biológicas incluindo a antimicrobiana (Klemm *et al.*, 1969, El-Abadelaha *et al.*, 1998; Lohray *et al.*, 2004; Al-Huniti *et al.*, 2007). Estes estudos incluem derivados do tetraidrotienopiridinil oxalidinona semelhante a Linezolid mostraram atividades antibacterianas contra *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *E. faecalis* (Lohray *et al.*, 2004). Alguns derivados do ácido 4-oxothienol[2,3-*b*]piridina-5-carboxílico também tem exibido boa atividade contra cepas de *S. aureus* ATCC, *S. faecalis* ATCC, *E. coli* ATCC, *K. pneumonia* ATCC, *E. cloacae* ATCC, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* ATCC (El-Abadelaha *et al.*, 1997).

Quanto ao sistema 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina, alguns artigos da literatura, que tratam da química e das aplicações biológicas do sistema, descrevem diversas atividades como inibidor da Xantina Oxidase (Chu *et al.*, 1975; Jacobson *et al.*, 1992) e na quimioterapia de alguns tumores (Bare *et al.*,

1989). Outros derivados se apresentam ainda eficazes como vasodilatadores e conseqüente potencial no tratamento da disfunção erétil (Yu *et al.*, 2001).

Com base em dados da literatura, vários sistemas heterocíclicos têm sido sintetizados pelo grupo da professora Dr^a Alice Bernardino do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, incluindo os sistemas tienopiridinas e pirazolo-piridinas (Figura 6), tendo gerado derivados com diferentes atividades incluindo a ação antiparasitária (De Mello, 1999; Schenone *et al.*, 2001). Os derivados do sistema 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina foram capazes ainda de inibir a atividade das enzimas transcriptase reversa (RT) do vírus HIV tipo 1 (Bernardino *et al.*, 1996), bem como apresentaram atividade frente aos vírus HSV e Vaccínia e atividade antileishmania (Azevedo *et al.*, 2002; De Mello *et al.*, 2004). Estes resultados denotam o potencial promissor destas séries a ser verificado também para atividade antibiótica.

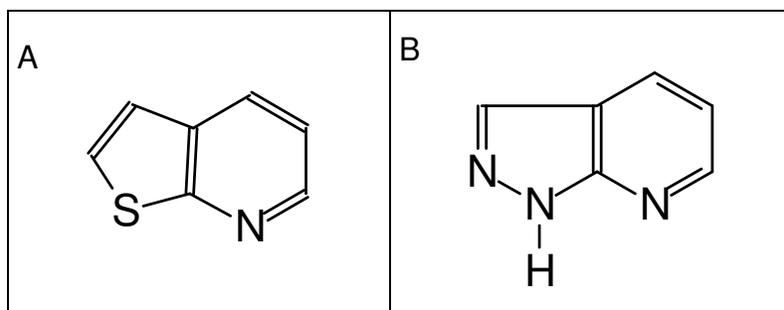


Figura 7: Sistemas heterocíclicos tienopiridina (A) e pirazolopiridina (B).

1.5.2 – Moléculas de Origem Animal

1.5.2.1 - Venenos de Serpentes

Existem, em todo o mundo, cerca de 2.800 espécies de serpentes e dentre estas, aproximadamente trezentas são identificadas no Brasil como espécies peçonhentas. Os acidentes com serpentes se constituem em um grave problema de saúde pública para o nosso país, devido à incidência, à gravidade e às seqüelas deixadas nos acidentados (Fry e Wuster, 2004).

A herpetofauna brasileira possui duas famílias reconhecidamente peçonhentas, a família **Viperidae** e a **Elapidae**. A família **Elapidae** engloba o gênero *Micrurus*, responsável por apenas 0,3% dos acidentes ofídicos, enquanto a família **Viperidae**, que inclui os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, está envolvida em 80% dos acidentes brasileiros com serpentes peçonhentas (Tabela 7) (Fry e Wuster, 2004).

Tabela 7: Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil, segundo o gênero da serpente. Fonte: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde. Brasília (2001).

Gênero	Acidentes	
	Nº	%
<i>Bothrops</i>	59.619	73,1
<i>Crotalus</i>	5.072	6,2
<i>Lachesis</i>	939	1,1
<i>Micrurus</i>	281	0,3
Não informados	13.339	16,3
Não peçonhentos	2.361	3,0

Os acidentes laquéticos são acarretados pelas serpentes conhecidas popularmente como surucucu, surucutinga e pico-de-jaca, tendo como representante a espécie *Lachesis muta*. Seu veneno é semelhante ao da *B. jararaca*, e casos escassos de envenenamento são relatados na literatura sendo comumente confundido com os de *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox* (Brasil, 2001; Monteiro *et al.*, 1996).

Os venenos de serpentes podem apresentar enzimas proteolíticas, nucleases, oxidases, miotoxinas, hemotoxinas, neurotoxinas, fosfatidases, além de proteínas e peptídeos com outras atividades biológicas (Figura 8) (Fuly *et al.*, 2000; De Lima *et al.*, 2005, Berlanga, *et al.*, 2007). Os venenos de serpentes podem variar ainda de acordo com o gênero, a espécie, a idade e o ambiente em que habita (Tu *et al.*, 1988; Heise *et al.*, 1995; Monteiro *et al.*, 1998, Castro *et al.*, 1999). Assim, eles podem ter ação proteolítica, causando a necrose do tecido; coagulante, agindo sobre o fibrinogênio; agregante de plaquetas; hemorrágica, pelo consumo de fibrinogênio sangüíneo, lítica de vasos e membranas, pela ação de fosfolipases e miotoxinas; dentre outras (Figura 8).

Estudos envolvendo o isolamento de diversas moléculas com diferentes atividades biológicas presentes nos venenos de serpentes estimulam a busca de componentes antibacterianos (De Lima *et al.*, 2005). Entretanto, a literatura existente nesta área descreve, principalmente, a identificação de enzimas do tipo fosfolipases, que apresentam efeito lítico sobre os fosfolipídios da

membrana plasmática das bactérias e enzimas e enzimas oxidantes (L-monooxidase), que atuam sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (De Lima *et al.*, 2005).

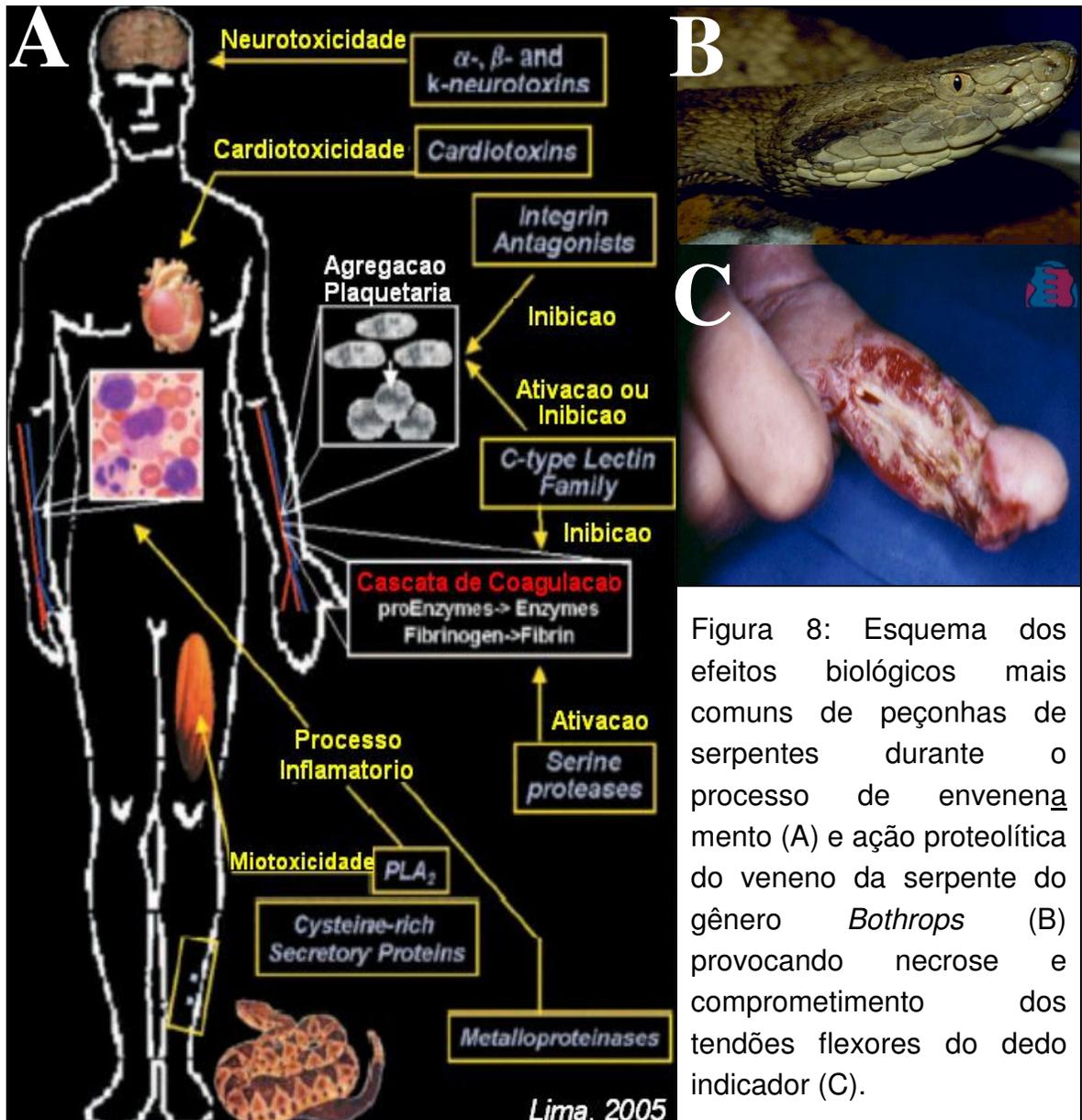


Figura 8: Esquema dos efeitos biológicos mais comuns de peçonhas de serpentes durante o processo de envenenamento (A) e ação proteolítica do veneno da serpente do gênero *Bothrops* (B) provocando necrose e comprometimento dos tendões flexores do dedo indicador (C).

De fato, os primeiros relatos sobre a atividade antibacteriana em venenos de serpente foram feitos em 1948 e 1968, envolvendo serpentes das famílias **Elapidae** e **Viperidae** (Talan *et al.*, 1991; Blaylock, 2000). Os venenos de **Viperidae** testados, na maioria do gênero *Crotalus*, mostrou uma atividade antibiótica contra cepas de *Sarcina* e *E. coli* (Yan *et al.*, 2000; Rowan *et al.*, 2004; Stabeli *et al.*, 2004). Devido aos poucos relatos na literatura, os venenos de serpentes da família **Viperidae** (*Agkistrodon rhodostoma*, *B. jararaca*, *B. atrox* e *Lachesis muta*) ainda se apresentam como fontes promissoras para a identificação de moléculas apresentando atividade antimicrobiana que pode incluir peptídeos com potencial terapêutico (De Lima *et al.*, 2005).

2 – OBJETIVOS

2.1 - Geral

Identificar novas fontes de origem sintética ou animal para a procura de novos protótipos de antibióticos. Para isto foram testados: a) compostos de origem sintética derivados dos sistemas tienopiridina e pirazolopiridina sintetizados pelo grupo da professora Dr^a Alice Bernardino do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense; e b) materiais de origem animal, representados por quatro venenos de serpentes da família **Viperidae** (*A. rhodostoma*, *B. jararaca*, *B. atrox* e *L. muta*).

2.2 - Específicos

- Determinação do perfil antibiótico dos derivados sintéticos e material biológico (venenos) frente a cepas Gram-positivas e Gram-negativas de bactérias isoladas de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP).

- Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMIs) para os materiais que apresentarem perfil antibiótico (Halo \geq 15mm) frente as cepas testadas.

- Comparação dos valores de CMI dos derivados sintéticos e material biológico (venenos) com antibióticos utilizados comercialmente para avaliação do potencial como protótipo de novos antibióticos.

- Análise da relação estrutura-atividade dos derivados sintéticos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Bactérias e Condições de Crescimento.

As cepas clínicas utilizadas foram fornecidas pelo Hospital Antônio Pedro (HUAP) a partir da coleta dos pacientes. As cepas foram identificadas pelos métodos microbiológicos e bioquímicos tradicionais, com exceção da *Staphylococcus aureus* 25923, que é uma cepa de referência (ATCC). Os testes microbiológicos foram realizados com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No estudo dos derivados foram utilizadas 14 cepas dentre as bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* 01, *Staphylococcus aureus* 8148, *Staphylococcus aureus* 8380, *Staphylococcus epidermidis* 201, *Staphylococcus epidermidis* 8126, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e Gram-negativas (*Serratia marscescens* 204, *Proteus mirabilis* 464, *Pseudomonas aeruginosa* 36408, *Enterobacter cloaceae* 6964, *Acinetobacter calcoaceticus* 01, *Klebsiella pneumoniae* 6891, *Escherichia coli* 635, *Escherichia coli* 36571). Na avaliação dos venenos, as 13 cepas utilizadas foram *E. faecalis* 1311, *S. epidermidis* 1140, *S. epidermidis* 1120, *S. aureus* 1218, *S. aureus* 1230, dentre as bactérias Gram-positivas e *S. marcencens* 2628, *P. mirabilis* 2214, *P. aeruginosa* 2112, *E. cloacae* 2432, *A. calcoaceticus* 2330, *K. pneumoniae* 2371, *E. coli* 2717, *E. coli* 2510 dentre as bactérias Gram-negativas.

As bactérias foram cultivadas no meio contendo bactopectonas (1%); extrato de lêvedo (1%); cloreto de sódio (0,38%); NaHPO₄.2H₂O (0,11%) e (2%) de ágar-ágar para a preparação de meio sólido, que foi autoclavado à 120°C sobre a pressão de 1 atm, durante 30 minutos. Nestas condições, o meio apresenta um pH de 7.4 e todos os reagentes utilizados foram oriundos da Sigma (St. Louis, MO, USA) ou da Merk (Darmstad, Germany,).

3.2 - Preparação das Soluções-estoques dos Materiais.

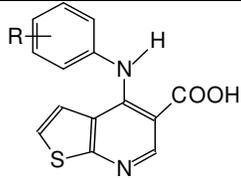
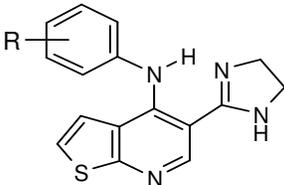
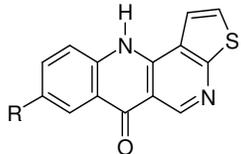
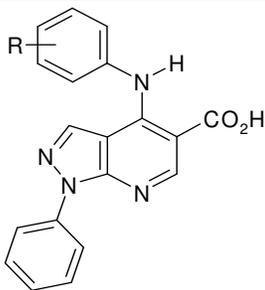
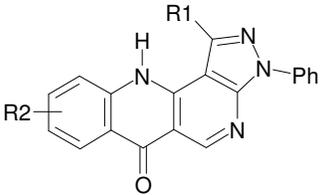
3.2.1 Material de Origem Sintética.

As soluções-estoque (5mg/mL) dos 67 derivados pirazolopiridina (n=26) e tienopiridina (n=41) sintetizados pelo grupo da Dra. Alice Bernardino do Instituto de Química-UFF (Tabela 6) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) obtido da Merk (Darmstad, Germany).

3.2.2 - Material de Origem Animal.

Venenos das espécies *Agkistrodon rhodostoma*, *B. jararaca*, *Bothrops atrox* e *Lachesis muta* pertencentes à família **Viperidae** foram obtidos da Sigma (St.Louis MO, USA). Os venenos brutos foram diluídos em água destilada e deionizada em uma concentração de 5mg/mL, sendo manipulados em condições de baixa temperatura (banho de gelo) e utilizados logo após a diluição.

Tabela 6 : Sistemas pirazolopiridina e tienopiridina sintetizados pelo grupo da Dra Alice Bernardino-IQ-UFF.

SISTEMA	ESTRUTURA	NOME	SUBSTITUÍNTES (R na posição <i>p</i> ou <i>m</i>)	N
Tienopiridina		Ácidos 4-(fenilamino)tieno[2,3- <i>b</i>]piridina-5-carboxílicos	R = CH ₃ , OCH ₃ , NO ₂ , F, Cl, Br, H.	13
		4-(fenilamino)tieno[2,3- <i>b</i>]piridina-5-carbonitrilas	R = CH ₃ , OCH ₃ , NO ₂ , F, Cl, Br, H.	13
		5-(4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-4-(fenilamino)tieno[2,3- <i>b</i>]piridinas	R = CH ₃ , OCH ₃ , NO ₂ , F, Cl, Br, H.	13
		Benzo[<i>b</i>]tieno[3,2- <i>h</i>]-1,6-naftiridina	R = CH ₃	2
Pirazolopiridina		Ácidos 4-[(Metilpiridin-2-il)amino]-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina-5-carboxílico	R = CH ₃ , OCH ₃ , NO ₂ , F, Cl, Br e H.	13
		3-Fenil-3 <i>H</i> ,11 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]pirazolo[3,4- <i>h</i>]-1,6-naftiridinas	R1 = H, CH ₃ R2 = CH ₃ , OCH ₃ , NO ₂ , F, Cl, Br e H.	13

3.3 - Antibiograma qualitativo - Teste de difusão em disco.

3.3.1 - Preparação dos Discos de Papel

3.3.1.1 - Material de origem sintética.

Discos de papel Whatman nº1 (5mm de diâmetro) foram embebidos com 1ml da solução-estoque dos derivados de tienopiridina e pirazolopiridina (5mg/mL) e colocados sobre o meio de Mueller Hinton (sólido), em placa previamente inoculada com as bactérias, para realização do teste de difusão (Antibiograma Qualitativo) descrito na próxima seção.

3.3.1.2 - Material de origem animal

Devido à alta atividade proteolítica dos venenos, discos de papel Whatman nº1 (5mm de diâmetro) foram preparados com solução-estoque dos venenos de serpentes (5mg/mL) diluídos na hora. O veneno mantido em banho de gelo, foi pipetado diretamente sobre os discos (5µL). Os discos foram fixados sobre o meio de Mueller Hinton, previamente inoculado com as bactérias, para a realização do teste de difusão descrito na próxima seção.

3.3.2 Controles experimentais

Antibióticos clínicos (ciprofloxacina, vancomicina, oxacilina, penicilina G, ampicilina e cloranfenicol) foram utilizados em condições idênticas as utilizadas com as drogas, como controles positivos ao longo deste estudo, visto que as

cepas testadas eram sensíveis aos mesmos. Água destilada e DMSO foram utilizados como controles negativos.

3.3.3 - Procedimento completo do Antibiograma Qualitativo (Teste de Difusão em Discos)

Uma cultura bacteriana com 5 horas de crescimento à 37°C ($\sim 1,0 \times 10^9$ ufc/mL) foi diluída 1:100 em solução salina 0,85%. Uma alíquota de 0,3mL foi então semeada sobre a superfície do meio ágar Muller Hinton nas placas de Petri as quais foram incubadas à 37° por 30 minutos. Em seguida, 4 discos foram depositados por placa que foram incubadas à 37°C por 24 horas (Figura 9).

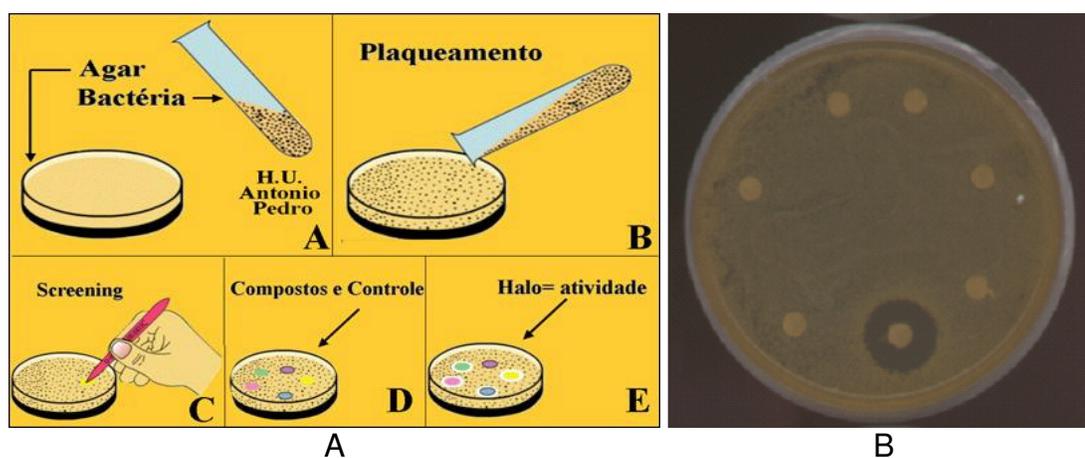


Figura 9 - Teste de difusão em discos. A) Etapas de realização do teste, B) Placa contendo resultado positivo de um antibiótico padrão com um halo identificado.

A sensibilidade foi determinada através da medida do diâmetro do halo de inibição de crescimento, em ensaios repetidos no mínimo três vezes, onde

halos $\geq 15\text{mm}$ foram considerados halos de inibição significativa, como descrito por Oliveira *et al.*, 2001.

3.4 – Antibiograma Quantitativo para a Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).

A CMI foi determinada através da técnica de macrodiluição utilizando três séries. O primeiro tubo de cada série continha 1mL de meio sem o inóculo e com a droga a ser testada; os demais tubos continham apenas 0,5mL de meio estéril onde foi realizada uma diluição seriada à metade. Em seguida, 0,5mL de meio inoculado com bactérias ($1,0 \times 10^5$ ufc/mL), gerado a partir de uma cultura de 5 horas de crescimento e diluída a 1:104 no meio, foi colocado em cada tubo e o ensaio conduzido como descrito por Oliveira *et al.*, 2001. Após 24 horas de incubação à 37°C, a CMI foi definida como a menor concentração da droga que inibe completamente o crescimento visível da cultura (Figura 10). Três controles foram usados no experimento, que incluíram o meio puro, o meio com DMSO e o meio com o inóculo.

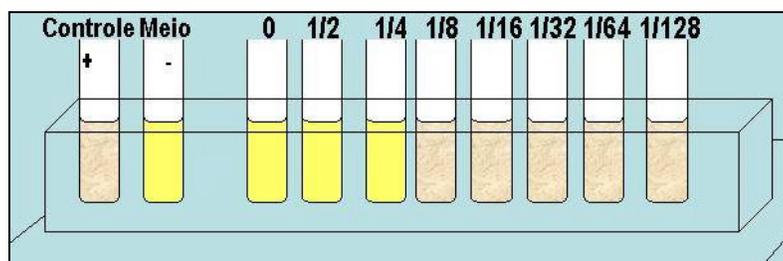


Figura 10 - Antibiograma quantitativo por macrodiluição, mostrando crescimento bacteriano a partir do quinto tubo de diluição, determinando a diluição de 1/4 como CMI.

Para a determinação do CMI dos compostos de origem animal foram usadas concentrações iniciais de 832µg/mL (*B. jararaca*) e de 512µg/mL (*Agkistrodon rhodostoma*, *Bothrops atrox* e *Lachesis muta*). Para a determinação do CMI dos compostos de origem sintética, foram usadas concentrações iniciais de 1024µg/mL para todos os compostos testados.

4 – RESULTADOS

4.1 – Material de origem sintética.

4.1.1 - Sistema tienopiridina

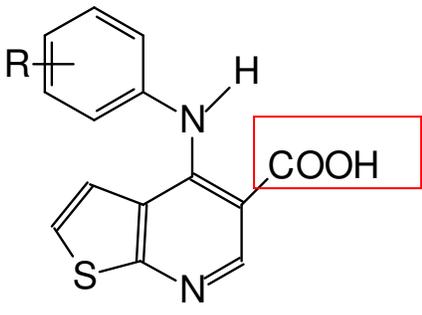
No presente estudo, quatro séries formadas por 41 compostos gerados a partir de substituições nas posições *para* e *meta* foram testadas nos ensaios de antibiograma qualitativo frente a 14 cepas Gram-positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*, *S. aureus* ATCC e *S. epidermidis*) e Gram-negativas (*A. calcoaceticus*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens*). Os resultados de cada uma destas séries serão apresentados a seguir.

4.1.1.1 - Derivados ácidos 4-(fenilamino)tieno[2, 3-b]piridina-5-carboxílicos

Esta série se caracterizou pela presença do sistema tienopiridina e um radical carboxílico, por modificações nos padrões de polaridade, tamanho e eletronegatividade. Nesta molécula foram feitas modificações nas posições *meta* e *para* formados pelos substituintes CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl , Br ou H, dando origem a 13 derivados.

Os resultados mostram que os 13 derivados ácidos testados frente a 14 cepas não foram capazes de inibir o crescimento no ensaio de antibiograma qualitativo comparados aos controles oxacilina e ciprofloxacina (Tabela 8).

Tabela 8 - Antibiograma qualitativo dos derivados ácidos 4-(fenilamino)tieno[2, 3-*b*]piridina-5-carboxílicos.

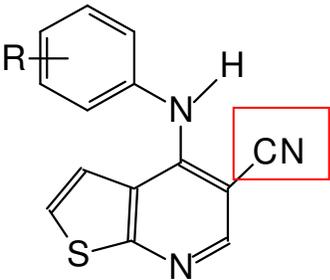
Ácidos 4-(fenilamino)tieno[2, 3- <i>b</i>]piridina-5-carboxílicos	Derivados - R													
	101 - H	103 - <i>m</i> -CH ₃	104 - <i>p</i> -CH ₃	106 - <i>m</i> -OCH ₃	107 - <i>p</i> -OCH ₃	109 - <i>m</i> -NO ₂	110 - <i>p</i> -NO ₂	112 - <i>m</i> -F	113 - <i>p</i> -F	115 - <i>m</i> -Cl	116 - <i>p</i> -Cl	118 - <i>m</i> -Br	119 - <i>p</i> -Br	
														
	Sensibilidade (halos em mm)													
Bactérias clínicas	101	103	104	106	107	109	110	112	113	115	116	118	119	Oxacilina
<i>E. faecalis</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> 8148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. aureus</i> 8380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. epidermidis</i> 201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. epidermidis</i> 8126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
														<u>Ciprofloxacina</u>
<i>S. marcescens</i> 204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>P. mirabilis</i> 464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39
<i>P. aeruginosa</i> 36408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. cloacae</i> 6964	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
<i>A. calcoaceticus</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
<i>K. pneumoniae</i> 6891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. coli</i> 635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
<i>E. coli</i> 36571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25

4.1.1.2 - Derivados. 4-(fenilamino)tieno[2,3-*b*]piridina-5-carbonitrilas

Com o objetivo de melhorar o perfil antibiótico da estrutura original, foram feitas modificações estruturais em relação aos ácidos 4-(fenilamino)tieno[2, 3-*b*]piridina-5-carboxílicos, onde foi mantida a liberdade conformacional e o

sistema tienopiridina e substituído o radical carboxílico pela carbonitrila. Nesta molécula foram feitas modificações nas posições *meta* e *para* formados pelos substituintes CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H, dando origem a 13 derivados (Tabela 9).

Tabela 9 - Antibiograma qualitativo dos derivados 4-(fenilamino)tieno[2,3-*b*]piridina-5-carbonitrilas.

4-(fenilamino)tieno[2,3- <i>b</i>]piridina-5-carbonitrilas	Derivados - R														
		201 - H	203 - <i>m</i> -CH ₃	204 - <i>p</i> -CH ₃	206 - <i>m</i> -OCH ₃	207 - <i>p</i> -OCH ₃	209 - <i>m</i> -NO ₂	210 - <i>p</i> -NO ₂	212 - <i>m</i> -F	213 - <i>p</i> -F	215 - <i>m</i> -Cl	216 - <i>p</i> -Cl	218 - <i>m</i> -Br	219 - <i>p</i> -Br	
Bactérias clínicas		Sensibilidade (halos em mm)													
		201	203	204	206	207	209	210	212	213	215	216	218	219	Oxacilina
<i>E. faecalis</i> 01		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> 8148		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. aureus</i> 8380		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. epidermidis</i> 201		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. epidermidis</i> 8126		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> ATCC 25923		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
															<u>Ciprofloxacina</u>
<i>S. marcescens</i> 204		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>P. mirabilis</i> 464		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39
<i>P. aeruginosa</i> 36408		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. cloacae</i> 6964	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	
<i>A. calcoaceticus</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	
<i>K. pneumoniae</i> 6891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	
<i>E. coli</i> 635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	
<i>E. coli</i> 36571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	

Os derivados 4-(fenilamino)tieno[2,3-*b*] piridina-5-carbonitrilas testados frente a 14 cepas também não apresentaram resultados positivos (Tabela 9).

*4.1.1.3 - Derivados.5-(4,5-diidro-1H-imidazol-2-il)-4-(fenilamino)tieno [2,3-*b*]piridinas*

Novas modificações estruturais foram feitas em relação aos ácidos 4-(fenilamino)tieno[2, 3-*b*]piridina-5-carboxílicos onde um imidazol foi adicionado em substituição ao radical carboxílico, com a finalidade de melhorar a atividade biológica da molécula (Tabela 10). Nesta molécula foram feitas modificações nas posições *meta* e *para* formados pelos substituintes CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl , Br ou H, dando origem a 13 derivados.

Os dados mostram que a substituição pelo grupo imidazol foi comparável aos grupamentos carboxílico e carbonitrila, onde os derivados testados frente a 14 cepas não apresentaram resultados positivos (Tabela 10).

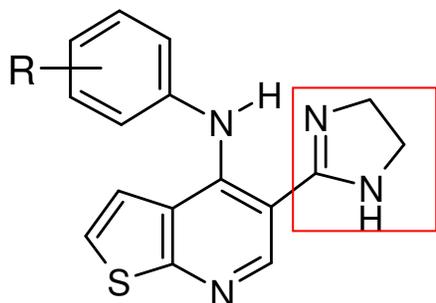
*4.1.1.4 - Derivados Benzo[*b*]tieno[3,2-*h*]-1,6-naftiridinas*

Com a finalidade de verificar a importância da liberdade conformacional das moléculas sintetizadas, derivados naftiridínicos rígidos foram propostos, sendo introduzidos dois anéis ao sistema tienopiridina.

Tabela 10 - Antibiograma qualitativo dos Derivados.5-(4, 5-diidro-1*H*-imidazol-2-il)-4-(fenilamino)tieno[2,3-*b*]piridinas.

Bactérias clínicas	Sensibilidade (halos em mm)													
	601	603	604	606	607	609	610	612	613	615	616	618	619	Oxacilina
<i>E. faecalis</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> 8148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. aureus</i> 8380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. epidermidis</i> 201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. epidermidis</i> 8126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
														<u>Ciprofloxacina</u>
<i>S. marcescens</i> 204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>P. mirabilis</i> 464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39
<i>P. aeruginosa</i> 36408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. cloacae</i> 6964	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
<i>A. calcoaceticus</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
<i>K. pneumoniae</i> 6891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. coli</i> 635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
<i>E. coli</i> 36571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25

5-(4,5-diidro-1*H*-imidazol-2-il)-4-(fenilamino)tieno[2,3-*b*]piridinas

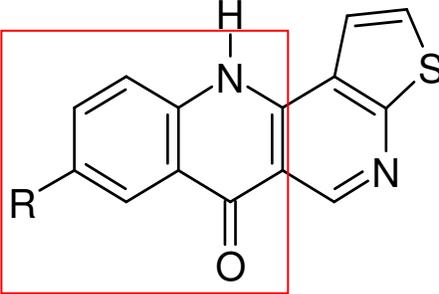


Derivados - R

- 601 - H
- 603 - *m*-CH₃
- 604 - *p*-CH₃
- 606 - *m*-OCH₃
- 607 - *p*-OCH₃
- 609 - *m*-NO₂
- 610 - *p*-NO₂
- 612 - *m*-F
- 613 - *p*-F
- 615 - *m*-Cl
- 616 - *p*-Cl
- 618 - *m*-Br
- 619 - *p*-Br

Na estrutura naftiridinica foi utilizado apenas um substituinte (CH₃) nas posições *meta* ou *para*, dando origem a 2 derivados (Tabela 11).

Tabela 11 - Antibiograma qualitativo dos derivados Benzo[*b*]tieno[3,2-*h*]-1,6-naftiridina.

Benzo[<i>b</i>]tieno[3, 2- <i>h</i>]-1,6-naftiridinas		Derivados - R		
		03 - <i>m</i> -CH ₃ 04 - <i>p</i> -CH ₃		
Bactérias clínicas	Sensibilidade (halos em mm)			
	<u>03</u>	<u>04</u>	<u>Oxacilina</u>	
<i>E. faecalis</i> 01	0	0	17	
<i>S. aureus</i> 8148	0	0	19	
<i>S. aureus</i> 8380	0	0	17	
<i>S. epidermidis</i> 201	0	0	19	
<i>S. epidermidis</i> 8126	0	0	17	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	19	
			<u>Ciprofloxacina</u>	
<i>S. marcescens</i> 204	0	0	26	
<i>P. mirabilis</i> 464	0	0	39	
<i>P. aeruginosa</i> 36408	0	0	26	
<i>E. cloacae</i> 6964	0	0	27	
<i>A. calcoaceticus</i> 01	0	0	23	
<i>K. pneumoniae</i> 6891	0	0	26	
<i>E. coli</i> 635	0	0	25	
<i>E. coli</i> 36571	0	0	25	

Os 2 derivados naftiridínicos testados frente a 14 cepas não apresentaram atividade antibacteriana comparado aos controles utilizados (Tabela 11).

4.1.2 – Sistema pirazolopiridina

Devido aos resultados negativos que foram obtidos com a manutenção do sistema tienopiridina, este sistema foi substituído pelo sistema pirazolopiridina.

4.1.2.1 – Derivados 3-Fenil-3H,11H-benzo[b]pirazolo[3,4-h]-1,6-naftiridinas

As moléculas geradas nesta série mantiveram a rigidez conformacional da naftiridina com os substituintes CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H nas posições *meta* ou *para*, dando origem a 13 derivados (Tabela 12).

Os derivados testados frente as 14 cepas não apresentaram resultados positivos, de forma similar ao que vimos anteriormente com a série benzo[b]tieno[3,2-*h*]-1,6-naftiridina (Tabela 12).

4.1.2.1 – Derivados Ácidos 4-[(metilpiridin-2-il)amino]-1-fenil-1H-pirazolo[3,4-*b*]piridina-5-carboxílico

No intuito de realizar uma comparação com o sistema tienopiridina e considerando ainda a importância da rigidez conformacional, foram feitas novas mudanças na estrutura molecular da série pirazolopiridina que permitiram uma liberdade conformacional, associada a presença de um radical carboxílico ligado ao heterociclo.

Tabela 12- Antibiograma qualitativo dos derivados 3-Fenil-3*H*,11*H*-benzo[*b*]pirazolo [3,4-*h*]-1,6-naftiridinas

3-Fenil-3 <i>H</i> ,11 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]pirazolo[3,4- <i>h</i>]-1,6-naftiridinas		Derivados - R													
		20 - H 23 - <i>m</i> -CH ₃ 24 - <i>p</i> -CH ₃ 26 - <i>m</i> -OCH ₃ 27 - <i>p</i> -OCH ₃ 29 - <i>m</i> -NO ₂ 30 - <i>p</i> -NO ₂ 32 - <i>m</i> -F 33 - <i>p</i> -F 35 - <i>m</i> -Cl 36 - <i>p</i> -Cl 38 - <i>m</i> -Br 39 - <i>p</i> -Br													
		Sensibilidade (halos em mm)													
Bactérias clínicas															Oxacilina
	20	23	24	26	27	29	30	32	33	35	36	38	39		
<i>E. faecalis</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> 8148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. aureus</i> 8380	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. epidermidis</i> 201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. epidermidis</i> 8126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
															Ciprofloxacina
<i>S. marcescens</i> 204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>P. mirabilis</i> 464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39
<i>P. aeruginosa</i> 36408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. cloacae</i> 6964	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
<i>A. calcoaceticus</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
<i>K. pneumoniae</i> 6891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. coli</i> 635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
<i>E. coli</i> 36571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25

Nesta estrutura ácida foram feitas modificações nas posições *meta* e *para* originando 13 derivados formados pelos substituintes CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl e Br (Tabela 13).

Tabela 13- Antibiograma qualitativo dos derivados ácidos 4-[(Metilpiridin-2-il)amino]-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina-5-carboxílico.

Bactérias clínicas	Sensibilidade (halos em mm)*													
	<u>17</u>	<u>19</u>	<u>20</u>	<u>22</u>	<u>23</u>	<u>25</u>	<u>26</u>	<u>29</u>	<u>30</u>	<u>54</u>	<u>59</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	Oxacilina
<i>E. faecalis</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> 8148	0	8	0	10	0	8	0	0	0	11	0	10	0	19
<i>S. aureus</i> 8380	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	9	0	17
<i>S. epidermidis</i> 201	0	16	0	15	0	17	0	12	0	20	0	17	10	19
<i>S. epidermidis</i> 8126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19
														<u>Ciprofloxacina</u>
<i>S. marcescens</i> 204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>P. mirabilis</i> 464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39
<i>P. aeruginosa</i> 36408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. cloacae</i> 6964	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
<i>A. calcoaceticus</i> 01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
<i>K. pneumoniae</i> 6891	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26
<i>E. coli</i> 635	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
<i>E. coli</i> 36571	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25

*Teste positivo, quando o halo ≥15mm.

Destes derivados, os compostos apresentando substituições em *meta* (AM19, AM22, AM25, AM54 e AM63) apresentaram resultado significativo (halo $\geq 15\text{mm}$) frente as cepas *S. epidermidis* 201, exceto AM29 (Tabela 13).

4.1.3 – Antibiograma quantitativo e comparação com os antibióticos de clínicos para a verificação do potencial antibacteriano.

O antibiograma quantitativo para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) frente a cepa *S. epidermidis* 201 foi realizado apenas com os derivados ácidos 4-[(Metilpiridin-2-il)amino]-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina-5-carboxílico com os substituintes em *meta* (AM19, AM22, AM25, AM54 e AM63) que apresentaram perfil positivo no antibiograma qualitativo (Figura 11).

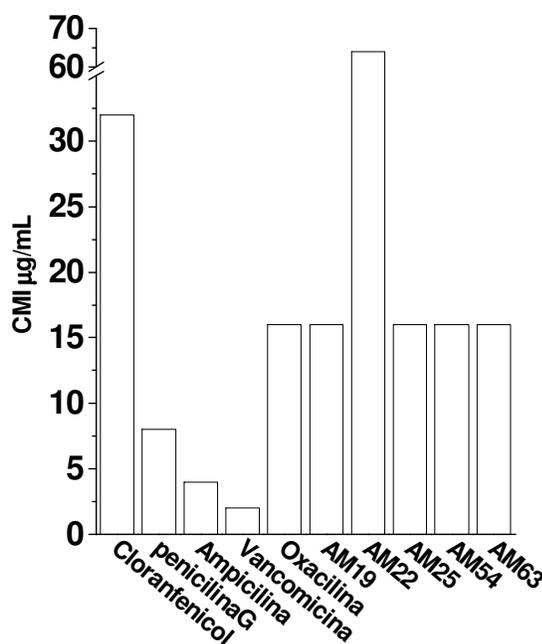


Figura 11: Comparação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos derivados ácidos pirazolo[3,4-*b*]piridina-5-carboxílico ativos e antibióticos de uso clínico frente a cepa *S. epidermidis* 201.

Os resultados obtidos para os compostos AM22, AM25, AM54 e AM63 (CMI 16µg/mL) foi menor que o observado para o composto AM19 (CMI = 64µg/mL). A comparação com antibióticos utilizados na prática clínica mostra que o CMI observado em nosso laboratório, para estas drogas, varia entre 0,5µg/mL e 32µg/mL, faixa que inclui os valores encontrados para os derivados testados, com exceção do AM19.

4.2 Material de Origem Animal

4.2.1 Antibiograma Qualitativo - Testes de difusão em disco

Os antibiogramas utilizando os venenos de serpentes *A. rhodostoma*, *B. atrox*, *B. jararaca* e *L. muta* nos revelam uma ação antibiótica eficaz de todos os venenos testados frente, somente, a cepas Gram-positivas com exceção do gênero *Lachesis muta* que não foi ativo frente a nenhuma cepa (Figura 12 e Tabela 15). Os venenos de *A. rhodostoma* e *B. atrox* foram eficientes frente às cepas de *E. faecalis* e *S. epidermidis* 1120 e 1140, enquanto o veneno de *B. jararaca* foi ativo apenas contra as cepas de *S. aureus* 1218 e 1230 (Tabela 15).

Tabela 15: Antibiograma qualitativo dos materiais de origem animal.

<i>Bactérias</i>	SENSIBILIDADE (halos em mm)					
	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>Lachesis muta</i>	Cipro.	Vanc.
<i>E. faecalis</i> 1311	16	16	13	0	-	15
<i>S. epidermidis</i> 1140	16	18	10	6	-	16
<i>S. epidermidis</i> 1120	16	18	10	6	-	16
<i>S. aureus</i> 1218	13	13	16	7	-	16
<i>S. aureus</i> 1230	13	13	16	0	-	16
<i>S. marcencens</i> 2628	8	8	7	0	26	-
<i>P. mirabilis</i> 2214	7	7	7	5	39	-
<i>P. aeruginosa</i> 2112	8	8	8	0	23	-
<i>E. cloacae</i> 2432	9	6	6	7	26	-
<i>A. calcoaceticus</i> 2330	0	5	0	5	25	-
<i>K. pneumoniae</i> 2371	10	10	9	0	25	-
<i>E. coli</i> 2717	12	10	5	0	25	-
<i>E. coli</i> 2510	12	10	5	6	25	-

Cipro.- Ciprofloxacina e Vanc. – Vancomicina (Controles positivos) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas respectivamente. Teste positivo, quando o halo ≥ 15 mm.

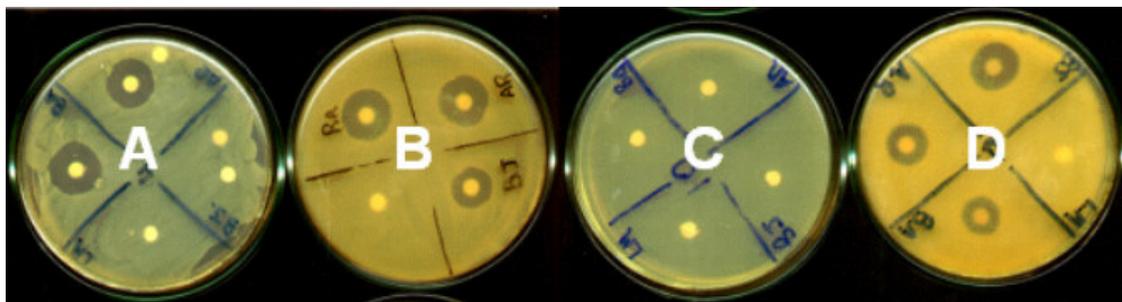


Figura 12: Antibiograma qualitativo das cepas *S. epidermidis* 201 (A), *E. faecalis* (B), *A. calcoaceticus* (C), *S. aureus* 8380 (D) frente aos venenos *A. rhodostoma* (AR), *B. atrox* (BA), *B. jararaca* (BJ), *L. muta* (LM).

4.2.2. *Antibiograma Quantitativo e comparação com antibiótico clínico para a verificação do potencial antibacteriano.*

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) pelo antibiograma quantitativo foi realizada para os venenos de *A. rhodostoma*, *B. atrox* e *B. jararaca* que apresentaram atividade no teste de difusão (Figura 13).

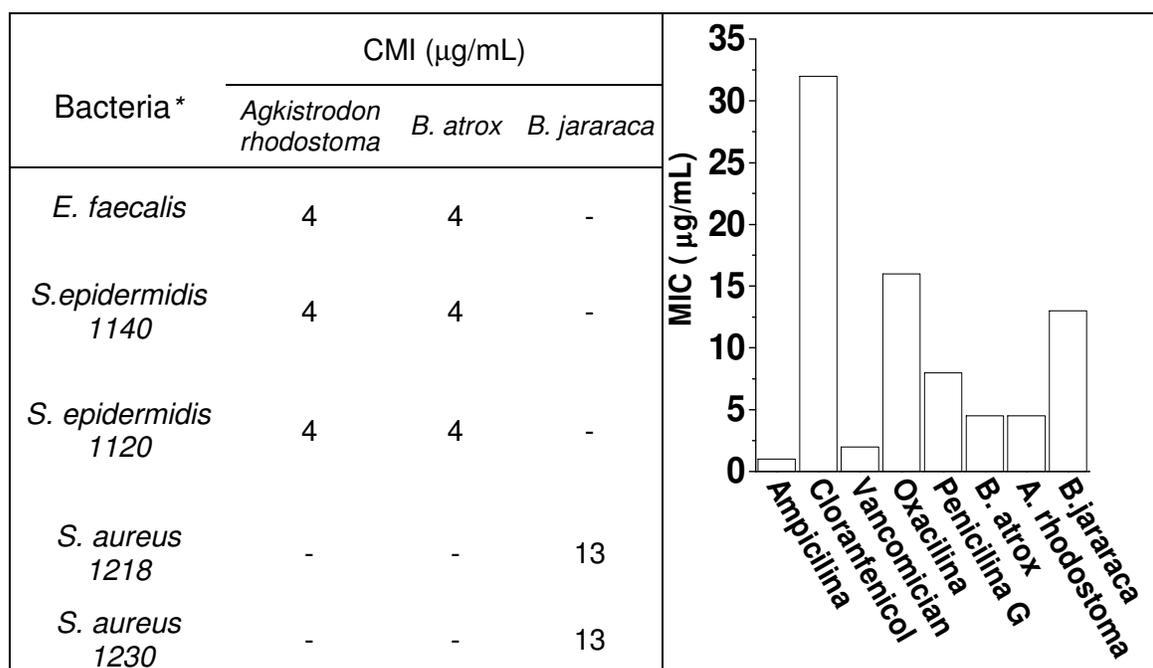


Figura 13: Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos materiais de origem animal, que apresentaram atividade no teste de difusão (esquerda) e comparação da ação do veneno em *Staphylococcus sp.* com antibióticos de uso clínico (direita).

Podemos observar que os valores obtidos com ambas as cepas testadas (*E. faecalis* e *S. epidermidis*) para os venenos de *A. rhodostoma* e *B.*

atrox são similares (4µg/mL) em contraste aos da *B. jararaca*, que apresenta uma CMI três vezes maior para o *S. aureus* (13µg/mL) . Os valores são próximos aos obtidos neste trabalho para os antibióticos de uso clínico (CMI = 1.0-32µg), o que sugere a presença de uma molécula antibiótica com potência similar a estes antibióticos nestes venenos.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Material de Origem Sintética

Segundo a OMS, as infecções causadas por bactérias estão entre as 10 maiores causas de mortes no mundo e a resistência bacteriana é ainda um obstáculo para o tratamento destas patologias (WHO, 2007). A perspectiva é ainda mais preocupante, pois se necessita de 10 a 24 anos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, enquanto uma bactéria torna-se resistente em apenas 10 horas pelo processo de mutação (Chopra *et al.*, 2002). No entanto, apesar das dificuldades, novas drogas com um amplo espectro de ação biológica vem sendo gradualmente sintetizadas e relatadas na literatura (Harris e Thorarensen, 2004).

Derivados do sistema tienopiridina têm sido sintetizados pelo grupo da professora Dra Alice Bernardino do Instituto de Química da UFF e têm demonstrado atividades contra o vírus HSV-1 e contra o protozoário *Giardia lamblia* (De Mello *et al.*, 1999, Bernardino *et al.*, 2006). Apesar do perfil promissor deste sistema sugerido pela literatura, os antibiogramas qualitativos realizados com os 41 derivados, apresentando modificações dos grupamentos nas posições *para* e *meta*, mostrou que estes são ineficazes frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas dos pacientes do Hospital Antonio Pedro (HUAP). Assim a avaliação experimental envolvendo o sistema tienopiridina não nos revela a importância das modificações estruturais das séries

analisadas nesta dissertação, seja a modificação eletrônica induzida pela substituição do grupamento ácido pela carbonitrila ou imidazol; a rigidez conformacional adicionada a molécula pela presença da naftiridina, ou mesmo as posições *meta* e *para*, visto que não resultaram em variações no perfil antibacteriano negativo obtido inicialmente.

O sistema pirazolopiridina apresenta uma relação estrutural com as bases purínicas do DNA, fato pelo qual algumas séries apresentam-se como antagonistas de receptores de adenosina (A1AR) (De Mello *et al.*, 1999; Schenone *et al.*, 2001; Rouveix, 2007), tendo ainda outras atividades biológicas como efeito anticoagulante, vasodilatador ou atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (De Mello *et al.*, 1999). Duas séries do sistema pirazolopiridina foram sintetizadas pelo grupo da professora Dra Alice Bernardino do Instituto de Química da UFF, com modificações estruturais nas posições *meta* e *para* (26 derivados), que foram testados frente as cepas multiresistentes do HUAP. Destes, cinco compostos com os substituintes CH₃, OCH₃, Cl, F e Br na posição *meta* apresentaram atividade antibacteriana frente a cepa de *S. epidermidis* 201.

O antibiograma quantitativo (CMI) mostrou que os derivados pirazolopiridina ativos apresentam valores de CMI (16µg/ml), próximos aos encontrados para drogas de uso clínico, como a vancomicina, oxacilina e o cloranfenicol (1-32µg/ml). Estes resultados indicam que os derivados do sistema pirazolopiridina testados têm um potencial significativo para

continuação dos estudos envolvendo novas cepas de diferentes bactérias e avaliações farmacológicas e toxicológicas *in vitro* e *in vivo*.

Os estudos da relação estrutura-atividade comparando os derivados do sistema tienopiridina com os do sistema pirazolopiridina revelaram algumas características estruturais importantes para que os compostos apresentem atividade antibacteriana. Dentre eles podemos citar:

- A atividade antibacteriana dos compostos frente as cepas testadas parece está diretamente relacionada com a presença do sistema pirazolopiridina, fato este demonstrado com a substituição única do sistema tienopiridina pelo pirazolopiridina nos compostos ácidos (séries 101-119 e AM 17-64 respectivamente) e o surgimento da atividade antibacteriana (Figura 14).

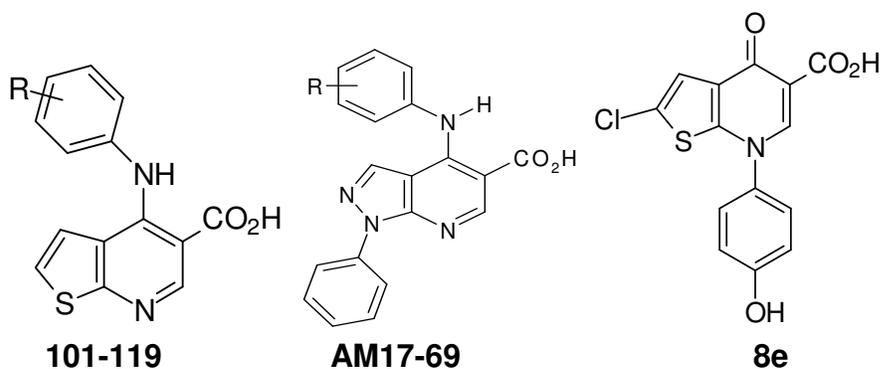


Figura 14: Estruturas das séries dos sistemas tienopiridina (101-119) e pirazolopiridina (AM17-64) e o derivado ativo (8e) descrito por El-Abadelaha e colaboradores (El-Abadelaha *et al.*, 1998).

Entretanto não poderá ser descartada a importância do anel aromático presente na estrutura do sistema pirazolopiridina, visto que a literatura descreve compostos tienopiridinas com a presença de um anel aromático ligado ao sistema e com perfil antibiótico contra cepas de *S. aureus* e *E.coli* como mostrado na figura 14 (El-Abadelaha *et al.*, 1998).

- A atividade antibacteriana encontrada para a série de derivados pirazolopiridina (AM17-64) parece estar relacionada também com a posição *meta* e com a presença principalmente dos substituintes OCH₃, Cl, F e Br. Isto indica a importância da orientação e também das características eletrônicas destes substituintes, que aparentemente estão influenciando a atividade biológica dos derivados.

- Os estudos sugerem ainda que modificações na posição *para* dos derivados pirazolopiridina evitam a ação antibacteriana, possivelmente por um impedimento estérico resultante da ocupação desta região, que impossibilitaria que a droga interagisse com o seu alvo.

-A rigidez conformacional da estrutura molecular é outro fator que parece interferir na atividade antibacteriana, visto que ao manter o sistema pirazolopiridina, mas acrescentar a naftiridina, que dá rigidez conformacional à molécula, a atividade antibacteriana é perdida. Assim a liberdade conformacional é uma característica estrutural importante, permitindo uma orientação favorável, visto que a rigidez estrutural impõe uma orientação dos

grupos farmacofóricos, que pode impedir que estes derivados interajam com seu alvo na bactéria.

- Finalmente não se deve desconsiderar a possibilidade de que a presença da naftiridina esteja interferindo na distribuição eletrônica da molécula, comprometendo a atividade antibacteriana, o que deverá ser investigado por estudos complementares de modelagem molecular que estão sendo feitos com o grupo do professor Carlos Rangel Rodrigues da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Neste estudo se pretende apontar as características químicas mais importantes dos compostos ativos, que viabilizem a sua atividade sobre o alvo, podendo sugerir modificações estruturais que possam melhorar ainda mais a atividade biológica destes derivados com uma baixa citotoxicidade.

5.2 – Material de Origem Animal

A cada dia, mais estudos com moléculas de origem protéica têm sido realizados a procura de protótipos de antibióticos. A idéia de que na própria natureza encontra-se a solução para a maioria dos males que afligem a humanidade tem atraído cada vez mais os pesquisadores a um retorno às origens (Harris e Thorarensen, 2003). A diversidade da fauna e da flora brasileira cria um amplo espectro de oportunidades para novos protótipos de antibióticos. Na literatura são descritas diversas substâncias de origem natural que apresentam atividade biológica (De Lima *et al.*, 2005). Dentre estes compostos, podemos citar moléculas encontradas nos venenos de escorpiões, aranhas e serpentes, agindo como anticoagulante, analgésico, vasodilatador ou mesmo apresentando atividade antibacteriana (Fuly *et al.*, 2000; De Lima *et al.*, 2005).

Acidentes com o veneno de algumas espécies de serpentes podem causar necrose do tecido (Mion *et al.*, 2002; Gornitskaia *et al.*, 2003). Entretanto, no local da necrose ocorre um baixo índice de infecção, apesar de serem feridas abertas que poderiam ser colonizadas por bactérias da microbiota da vítima e da serpente. Por outro lado, as serpentes apresentam ação digestiva lenta, onde, a presa pode ser mantida dentro da serpente por meses, durante esse processo, o que possibilitaria a infecção da serpente por bactérias ambientais e pela microbiota da presa (Berlanga, 2007).

O veneno de serpentes é uma mistura complexa de proteínas e peptídeos que exibem um perfil biológico promissor para produção de novas drogas com grande potencial terapêutico (De Lima *et al.*, 2005; Koh *et al.*, 2006). Recentemente, as propriedades antimicrobianas de algumas dessas moléculas têm sido descritas na literatura, mas a atividade biológica de peptídios encontrados no veneno de serpentes da família **Viperidae** ainda não tem sido amplamente explorada neste aspecto (Glaser *et al.*, 1948; White *et al.*, 2002). Nos estudos envolvendo o isolamento de algumas dessas moléculas com perfil antibacteriano, observa-se a identificação de enzimas do tipo fosfolipase, que apresentam efeito lítico sobre os fosfolipídios da membrana plasmática de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*S. aureus* e *E. coli*) (Aloof *et al.*, 1968; De Lima *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos nesta tese revelam que os venenos das serpentes *A. rhodostoma*, *B. atrox* e *B. jararaca* possuem uma atividade antibacteriana promissora contra bactérias Gram-positivas. Interessantemente, o veneno da *L. muta* não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias testadas, apesar da presença da fosfolipase A2 relatada na literatura (Fuly *et al.*, 2000). Este resultado negativo reforça o fato de que a presença de enzimas não garante um perfil de atividade antibiótica ao veneno, principalmente devido a diversidade estrutural das bactérias, quando se trata de membrana externa e da parede celular (Lu *et al.*, 2002)

Diferentemente o veneno da *A. contortrix contortrix* (Stiles *et al.*, 1999), o veneno de *A. rhodostoma* mostra um perfil significativo na inibição do crescimento de *Staphylococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*, podendo sugerir mecanismos moleculares específicos. Enquanto os venenos de *A. rhodostoma* e *B. atrox* apresentaram uma ação antibiótica contra *E. faecalis* e *S. epidermidis* (Tabela 15), o veneno da *B. jararaca* mostrou ação contra *S. aureus* (Tabela 15). Contudo os venenos não obtiveram resultado positivo frente as cepas Gram-negativas que possuem uma membrana lipoprotéica envolvendo externamente a parede celular. Assim, possivelmente as fosfolipases descritas como presentes nestes venenos não estariam agindo sobre a camada lipoprotéica da bactéria devido ao fato da sua composição lipídica diferenciada (Talan *et al.*, 1991; Blaylock, 2000; De Lima *et al.*, 2005; Fuly *et al.*, 2007).

Recentemente, a literatura descreveu o ácido L-amino oxidase (L-MAO) isolado dos venenos da *B. pirajai* e *B. alternatus* que inibe o crescimento de *E. coli* (Stabeli *et al.*, 2004). Nosso resultado positivo com os venenos de *B. atrox* e *B. jararaca* sugere que isoformas de L-MAO poderiam estar conservadas e presentes nos venenos de serpentes do Gênero *Bothrops*, de forma similar ao que ocorre com as proteínas do tipo lectina-C, também conservadas nessa família (Cardoso *et al.*, 1999). Interessantemente, de forma diferente ao que ocorreu nos estudos anteriores em que o veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, que inibiu o crescimento de cepas de *E. coli* (Stabeli *et al.*, 2004), em

nossos testes os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* não apresentaram atividade antibacteriana frente a cepas de *E.coli*.

De forma geral, o perfil de atividade para os venenos botrópicos observada no nosso estudo sugere outro componente antibacteriano não conservado no gênero, mas presente em alguns venenos de espécies diferentes. Esta hipótese é reforçada pela presença de diferentes componentes em veneno de serpentes que ocasionalmente estão envolvidos em atividades biológicas similares, como é o caso do peptídeo RGD e de proteínas do tipo lectina-cálcio-dependente isoladas do veneno da *B. jararaca*, as quais ambas moléculas agem sobre a agregação plaquetária (Koh *et al.*, 2006). Não pode ser descartada ainda a probabilidade da ação antibacteriana estar sendo causada por enzimas proteolíticas encontradas nos venenos testados (Min *et al.*, 2007; Berlanga, 2007). Neste caso a membrana externa das bactérias Gram-negativas estaria impedindo a ação proteolítica do veneno, formando uma barreira contra a enzima. Esta possibilidade nos parece relevante mas, lembramos que, a membrana externa de bactérias Gram-negativas também apresenta proteínas fundamentais para o metabolismo da célula bacteriana e que, provavelmente, seriam atacadas pelas enzimas proteolíticas inviabilizando a sobrevivência das bactérias. Pode-se pensar ainda na possibilidade das enzimas proteolíticas estarem agindo sobre alguma proteína ausente na membrana plasmática das bactérias Gram-negativas e que seriam encontradas somente na parede celular de bactérias Gram-positivas (Riley *et al.*, 2002).

Neste caso, o veneno teria que agir sobre todas as bactérias Gram-positivas testadas, fato que não ocorre, pois se observa variação da atividade em bactérias do mesmo gênero. Desta forma ainda existe a probabilidade promissora da presença de outras moléculas, inclusive peptídeos, com ação antibacteriana presente nestes venenos.

Os resultados dos venenos testados no antibiograma quantitativo (CMI) mostram que mesmo em concentrações baixas, eles ainda apresentam atividade antibacteriana (4-13 μ /mL). O CMI encontrado em drogas de uso clínico para as cepas testadas varia entre 1-32 μ g/mL indicando que os venenos de serpentes (*A. rhodostoma*, *B. jararaca*, *B. atrox*) apresentam um potencial promissor (Figura 22). A vancomicina que é o antibiótico indicado em caso de infecção por cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* e apresenta um CMI de 2 μ g/mL, enquanto o veneno da *Agkistrodon rhodostoma* e da *B. atrox*, apresentam um CMI de 4 μ g/mL para cepas de *S. epidermidis* (Tabela 14). Como estes venenos estão em sua forma bruta, existe a possibilidade de que ao isolarmos a molécula responsável pelo efeito antibacteriano, esta possa apresentar uma melhor atividade em menores concentrações.

A diversidade da composição orgânica dos venenos de serpentes vem sendo estudada à algum tempo e relatada na literatura. Em 1970 o farmacologista e pesquisador Sérgio Ferreira e o farmacologista britânico Sir John Vane's, ao pesquisarem venenos de serpentes da espécie *B. jararaca*, descobriram um potente inibidor da enzima conversora de angiotensina que é

envolvida no controle da pressão sanguínea e relacionada diretamente com problemas de hipertensão (Margie, 2003; Gupta *et al.*, 2007). O peptídeo ativo presente no veneno foi isolado e em 1974 Cushman e Ondetti proporcionaram 60 diferentes mudanças na estrutura deste inibidor, onde com base nesses estudos, foi desenvolvido o Captopril, uma droga que inibe a ação dessa enzima tão importante utilizado comercialmente nos dias de hoje (Seth *et al.*, 1998; Margie, 2003; Gupta *et al.*, 2007). O isolamento das moléculas apresentando atividade antibacteriana presentes nesses venenos e posteriores estudos de relação estrutura-atividade e modelagem molecular nos possibilitará saber mais sobre a atividade da molécula cujo perfil observamos neste trabalho. A partir desse estudo, em caso da descoberta de peptídeos antimicrobianos ativos, seria possível então, sugerir modificações estruturais que possam melhorar a atividade antibacteriana, possibilitando assim, o surgimento de novas drogas para o combate ao crescente número de cepas multiresistentes responsáveis por inúmeros casos de morte por infecção hospitalar.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa de atividade antibacteriana *in vitro* de 67 derivados de origem sintética (41 derivados do sistema tienopiridina e 26 derivados do sistema pirazolopiridina) e de 4 materiais de origem animal (venenos de *B.atrox*, *B.jararaca*, *A.rhodostoma* e *L.muta*) permitem a identificação de novos potenciais protótipos de agentes antibacterianos.

Entre os compostos de origem sintética, 5 dos 13 derivados do ácido 4-[(Metilpiridin-2-il)amino]-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina-5-carboxílico apresentaram atividade antibacteriana, o que está aparentemente relacionada com a presença do sistema pirazolopiridina. Esses 5 derivados, com substituições na posição *meta*, apresentaram um potencial significativo para continuação dos estudos envolvendo avaliações farmacológicas e toxicológicas, visto que foram capazes de inibir uma cepa de importância clínica.

Os venenos das serpentes *A. rhodostoma*, *B. jararaca* e *B. atrox* apresentam valores de CMI (4-13ug) próximos aos encontrados para os antibióticos de uso clínico (1-32ug). Estes venenos podem então ser futuramente analisados para identificação dos componentes responsáveis pelo perfil observado.

7 – REFERÊNCIAS

AL-HUNITI M.H., EL-ABADELAH M.M., ZAHRA J.A., SABRI S.S., INGENDOH A. (2007) Facile Synthesis of Some Novel Pyrido[3',2':4,5]thieno[2,3-*b*][1,4]thiazine-8-carboxylic Acids. *Molecules*; 12: 497-03.

ALOOF-HIRSCH S., DE VRIES A., BERGER A. (1968) The direct lytic factor of cobra venom: purification and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta*; 22: 53-60.

ANG J.Y., EZIKE E., ASMAR B.I. (2004) Antibacterial resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*; 3: 229-39.

ATAKAN I.H., KAPLAN M., KAYA E., AKTOZ T., INCI O. (2002) A life-threatening infection: Fournier's gangrene. *Int Urol Nephro*; 34: 387-92.

AYMES S.G.B., GEMMELL C.G. (1997) Antibiotic resistance. *J Med. Microbiol*; 46: 436-470.

AZEVEDO A.R., FRUGULHETTI I.C.C.P., KHAN M.A., KHAKWANI S., BERNARDINO A.M.R. (2002) Synthesis and biological evaluation of 1*H*-

pyrazolo[3,4-*b*]Pyridine-5-carboxylic acids against vaccinia virus. *Heteroc Comm*; 8: 47-50.

BARBOSA T.M., LEVY S.B. (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Update*; 3: 303–11.

BARCENILLA F., GASCO E., RELLO J., ALVAREZ-ROCHA L. (2001) Antibacterial treatment of invasive mechanical ventilation-associated pneumonia. *Drugs Aging*; 18: 189-200.

BARE, T., LAREM C.D., FIROR J.W., RESH J.F., WALTERS C.P., SALAMA A.J., MEINERS B.A., PATEL J.B. (1989) Synthesis and structure-activity relationships of a series of anxiolytic pyrazolopyridine ester and amide anxiolytic agents. *J Med Chem*; 32: 2561-73.

BERNARDINO A.M.R., FERREIRA V.F., FONTOURA G.A.T., FRUGULHETTI I.C.P.P., LEE M.Y., SOUZA M.C.B.V. (1996) Synthesis of 4-anilino-1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives and their in vitro antiviral activities. *J Braz Chem Soc*; 7: 273-77.

BERNARDINO A.M.R., PINHEIRO L.C., RODRIGUES, C.R., Loureiro N.I.V., CASTRO H.C., LANFREDI-RANGEL A., SABATINI-LOPES J.,

BORGES J.C., BORGES, J.C.; CARVALHO J.M.; ROMEIRO G.A.; FERREIRA V.F., FRUGULHETTI I.C.P.P., VANNIER-SANTOS M. A. (2006) Design, Synthesis, SAR, and Biological Evaluation of New 4-(phenylamino)thieno[2,3-b]pyridine Derivatives. *Bioorg & Med Chem.*14, 5765-70.

BOMONO R.A., SZABO D. (2006) Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*; 43: 49-56.

BROWN K. (2004) The history of penicillin from discovery to the drive to production. *Pharm Hist (Lond)*; 34: 37–43.

BUKHARIN O.V., USVIATSOV B.I.A., KHUSNUTDINOVA L.M. (2003) Bacterial interactions. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*; 4: 3–8

BUYNAK J.D. (2004) The discovery and development of modified penicillin- and cephalosporin-derived beta-lactamase inhibitors. *Curr Med Chem*; 11:1951–64.

CARDOSO L.S., ARAUJO M.I., GOES A.M., PACIFICO L.G., OLIVEIRA R.R., OLIVEIRA S.C. (2007) Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact*; 6:1-5.

CASTRO H.C., FERNANDES M., ZINGALI R.B. (1999) Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species, *Lachesis muta*. *Toxicon*; 37: 1403-16.

CHOPRA I., HESSE L., O'NEIL L.A.J. (2002) Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*; 31: 4-15.

CHUMPOLKULWONG, N. (2004) Effects of *E. coli* ribosomal protein S12 mutations on cell-free protein synthesis. *Eur J Biochem*; 271: 1127–34.

CHU J., LYNCH B.M. (1975) Synthesis and Biological Evaluation of Xanthine Oxidase Inhibitors. Pyrazolo [3,4d]pyrimidines and Pyrazolo[3,4-b]pyridines. *J Med Chem*; 18: 161-5.

CLEVELAND J., MONTVILLE T.J., NES I.F., CHIKINDAS M.L (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*; 71: 1-20.

DA SILVA RG. (2007) Efficacy of rehabilitation in oropharyngeal dysphagia. *Pro Fono*; 19: 123-30.

DE LIMA D.C., ALVAREZ A. P., DE FREITAS C.C., SANTOS D.O., BORGES R.O., DOS SANTOS T.C., MENDES C. L., RODRIGUES C.R., CASTRO H.C. (2005) Snake Venom: Any Clue for Antibiotics, CAM?. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med*; 2: 39-47.

DE MELLO H., ECHEVARIA A., BERNARDINO A.M.R., CANTO-CAVALHEIRO M., LEON L.L. (2004) Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure-activity relationship analysis. *J Med Chem*; 47: 5427-32.

DE MELLO H., SILVA E. F., ECHEVARRIA A., DE CARVALHO M. G., BERNARDINO A. M. R. (1999) Novos Derivados do Sistema Heterocíclico 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina: Síntese e Assinalamentos de Hidrogênio e Carbono por 1D e 2D. *Química Nova*; 22 : 45-49.

DONELLI G., FRANCOLINE I., ROMOLI D., GUAGLIANONE E., PIAZZI A., KAPLAN J.B. (2007) Synergistic activity of dispersin B, cefamandole nafate in the inhibition of *Staphylococcus* biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chem*; 8: 552-61.

DUPONT H.L., STEELE J.H. (1987) Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health. *Rev Infect. Dis*; 9 : 447- 59.

EGGERTSON L. (2007) Hospitals to Report *C. difficile* and MRSA. *Can Med Assoc J*; 176: 1402-03.

EL-ABADELAHA M.M., NAZER M.Z., OKASHA S.F., CALAS M., BOMPARTC J., MIOND P. (1998) Thienopyridinone antibacterials: Synthesis and antibacterial activity of some 7-aryl-2-chloro-4,7-dihydro-4-oxothieno[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylicacids. *Eur J Med Chem* 33: 33-42.

ERSON K.L. (2005) Is bacterial resistance to antibiotic an appropriate example of evolutionary change? *CRSQ*; 41: 318-26.

FAUCI A.S. (2001) Infectious diseases: considerations for the 21 century. *Clin. Infect. Dis*; 32: 675-85.

FLUIT A.C., SCHMITZ F. J. (2004) Resistance integrons, super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect*; 10: 272–88.

FREITAS C.C. (1989) O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos. *J Bras. Doenças Sex. Transm*; 1: 103-08.

FREITAS C.C. (1989) Resistência e tolerância a antibióticos em cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes do HUAP-UFF. *Rev Bras Med*; 46: 312-16.

FREITAS C.C. (1983) Como as penicilinas (e outros beta-lactâmicos) matam e lisam as bactérias. *Ciênc Cult*; 35: 1121-30.

FRY B.G., WUSTER W. (2004) Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Mol Biol Evol*; 21: 870–83.

FULY A.L., SOARES A.M., FERN M. ISIDORO L.F. (2007) Isolation and Characterization of a New Myotoxic Acidic Phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* Snake Venom. *Toxicon*; 65: 850-61.

FULY A.L., ELIAS S.C., ZINGALI R.B., GUIMARÃES J.A., MELO P.A. (2000) Myotoxic Activity of an Acidic Phospholipase A2 Isolated from *Lachesis muta* (*Bushmas*) Snake Venom. *Toxicon*; 38: 961-72.

GLASER H.R.S. (1948) Bactericidal activity of *Crotalus* venom *in vitro*. *Copeia*; 4: 245–47.

GLAUSER M.P., MIRIMANOFF R.O., DE TRIBOLET N. (1983) Treatment of Gram negative meningitis with cefotaxime. *Neurochirurgi*; 26: 125-30.

GOLD H. S., MOELLERING R. C. (1996) Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med*; 335: 1445-53.

GORNITSKAIA O.V., PLATONOVA T.N., VOLKOV G.L. (2003) Enzymes of snake venoms. *Ukr Biokhim Zh*; 75: 22-32.

GUPTA A., PRAJAPATI S.K., SINGH M., BALAMURUGAN M. (2007) Pronisomal Powder of Captopril: Formulation, Evaluation. *Molecular Pharmaceutics. Antimicrob Chemother*; 23: 63-65.

HARRIS C.R., THORARENSEN A. (2004) Advances in the discovery of novel antibacterial agents during the year. *Curr Med Chem*; 11: 2213-43.

HASHIMOTO H. (1997) Acquisition of antibiotic resistance in bacteria by alteration of molecular target, or by the decreased permeability. *Nippon Rinsho*; 55: 1167-72.

HEISE P.J., MAXSON L.R., DOWLING H.G., HEDGES S.B. (1995) Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA genes. *Mol Biol Evol*; 12:259–65.

HOOPER D.C. (2005) Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology. *Clin Infect Dis*; 40: 1811-17.

JACOBS M.R., ANON J., APPELBAUM P.C. (2004) Mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. *Clin Lab Med*; 24:419–53.

JACOBSON K. A., VAN GALEN P.J.M., WILLIAMS M.J. (1992) Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. *J Med Chem*; 35: 407-22.

JACOBY G. A. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*; 41: 120-26.

KLEMM L.H., KLOPFENSTEIN C.E., ZELL R. (1969) Chemistry of Thienopyridines. Syntheses of [2, 3-*b*]-Thieno [2,3-*c*]pyridine systems. *J Org Chem*; 34: 247-54.

KOH D.C., ARMUGAM A., JEYASEELAN K. (2006) Snake venom components, their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*; 63: 3030-41.

LEVY S. B. (1998) The challenge of antibiotic resistance. *Scien. Am*; 398: 1-10.

LOHRAY B.B., LOHRAY B.V., SRIVASTAVA B.K., KAPADNIS P.B., PANDYA P. (2004) Novel tetrahydro-thieno pyridyl oxazolidinone: na antibacterial agent. *Bioorg & Med Chem*; 12: 4557-64.

LU Q.M., WEI Q., JIN Y., WEI J.F., WANG W.Y., XIONG Y.L. (2002) L-Amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. *J Nat Toxins*; 11:345–52.

MAJIDUDDIN F.K., MATERON I.C., PALZKILL T.G. (2002) Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *Int J Med Microbiol*; 292:127-37.

MARGIE P. (2003) For Viper's Venom to Drug Design: Treating Hypertension. *Breakthroughs in Bioscience*; 295: 1-18.

MCDERMOTT P.F., WALKER R.D, WHITE D.G. (2003) Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol*; 22: 135-43.

MIN L.I., YUPING LAI., AMER E. V., DAVID J. C., DANIEL E. S., MICHAEL O. (2007) Gram Positive Three-component Antimicrobial Peptide-sensing System. *PNAS*; 104: 9469-74.

MION G., OLIVE F., HERNANDEZ E., MARTIN Y.N., VIEILLEFOSSE A.S., GOYFFON M. (2002) Action of venoms on blood coagulation: diagnosis of hemorrhagic syndromes. *Bull Soc Pathol Exot*; 95:132–8.

MONTEIRO R.Q., YAMANOUYE N., CARLINI C.R., GUIMARÃES J.A., BON C., ZINGALI R.B. (1998) Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principles in individual jararaca (*B. jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions. *Toxicon*; 36:153–63.

MURRAY B.E., MOELLERING, J.R. (1978) Paterns, mechanisms of antibiotic resistance. *Med Clin N Amer*; 62: 899-23.

NETTEY H., HASWANI D., D' SOUZA M., OETTINGER C. (2007) *In Vitro* Antimicrobial Effect of Encapsulated Vancomycin on Internalized *S. aureus* Within Endothelial Cells. *Drug Dev and Pharm*; 25: 133-9.

NEU H. C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Med Sci (Paris)*; 257: 1064-77.

NIAID (National Institute of Allergy , Infectious Diseases) (2006) The problem of antimicrobial resistance. 21: 165-173 wddtp://.niaid.int acessado em 2007

NIKAIDO H. (2001) Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers, active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 12: 215–23.

NOGA E.J., SILPHADUANG U. (2003) Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News Perspect*; 16: 87–92.

OLIVEIRA C.G.T., MIRANDA F.F., FERREIRA V.F., FREITAS C.C., CARBALLIDO J.M., CORRÊA L.C.D. (2001) Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-hydrazino-naphthoquinones as analogs of lapachol. *J Braz Chem Soc*; 12: 339-45.

PAGES J.M. (2004) Bacterial porin and antibiotic susceptibility. *Med Sci (Paris)*; 20: 346–51.

PATEL O.G., MBERU E.K., NZILA A.M., MACREADIE I.G. Sulfa drugs strike morethan once. *Trends Parasitol*; 20: 1-3.

PEREZ-TRALLERO E., IGLESIAS L (2003) Tetracyclines, sulfonamides and metronidazole. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21: 520–29.

POTRYKUS J., BARANSKA S., WEGRZYN G. (2002) Inactivation of the *acrA* gene is partially responsible for chloramphenicol sensitivity of *E. coli* CM2555 strain expressing the chloramphenicol acetyltransferase gene. *Microb Drug Resist*; 8: 179–85.

RILEY M.A., WERTZ J.E. (2002) Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*; 84: 357–64.

ROLAIN J.M., RAULT D. (2005) Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Richettsia* genus. *Ann N Y Acad Sci*; 1063: 222-30.

ROLINSON, G.N. (1998) Forty years of β -lactam research. *J. Antimicrob Chemother*; 41: 589-03.

ROUVEIX B. (2007) Clinical Implications of Multiple Drug Resistance Efflux Pumps of Pathogenic Bacteria. *J Anti Chem*; 59: 1208-09.

RUSSEL A.D. (2002) Antibiotic, biocide resistance in bacteria: Introduction. *J Appl Microbiol*; 92: 1S-3S.

SAUNDERS J.R. (1975) Transposable resistance genes. *Nature*; 258: 384-92.

SAUNDERS J.R. (1984) Genetic, evolution of antibiotic resistance. *Br Med Bull*; 40: 54-60.

SCHENONE S., BRUNO O., BONDAVALLI F., RANISE A., MOSTI L, MENOZZI G., FOSSA P., DONNINI S., SANTORO A., ZICHE M., MANETTI F., BOTTA M. (2001) Synthesis, Biological data of 4-amino-1-(2-chloro-2phenylethyl)1-*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylic-acid Ethyl Esters, a New Séries of A1– Adenosine Receptor (A1AR). *Bioorg Med Chem Letters*; 98: 11-2.

SCHINDLER B. (2007) Worldwide Spread of Resistent *Staphylococcus*. *Med Monatsschr Pharm*; 55: 155-56.

SETH J. R., XIAOPING XU., YING MU., ROGER A., MARINCHAK, P., KOWEY R. (1998) Regression of LV Hypertrophy with Captopril Normalizes Membrane Currents in Rabbits. *Am Phys Soc*; 45: 250-55.

SEVERINO P., MAGALHAES V.D. (2002) The role of integrons in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *P. aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res Microbiol*; 153: 221-26

SMITH A.L., ERWIN A.L, KLINE T., UNRATH, W.C., NELSON K., WEBER A., HOWALD W.N. (2007) Chloramphenicol is a Substrate for Movel Nitroreductase Pathway in *Haemophilus influenzae*. *Anti Age Chem*; 9: 601-12.

SRINIVASAN A., DICK J.D., PERL T.M. (2002) Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. *Clin Microb*; 48: 430-38.

STABELI R.G., MARCUSSI S., CARLOS G.B., PIETRO R.C., SELISTRE A.H.S., GIGLIO J.R., OLIVEIRA E.B., SOARES A.M. (2004) Platelet aggregation, antibacterial effects of an L-aminoacid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg. Med Chem*; 12: 2881-86.

STILES B.G., SEXTON F.W., WEINSTEIN S.A. (1991) Antibacterial effects of different snake venoms: purification, characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*; 29: 1129-41.

SUASSUNA I., SUASSUNA I.R. (1971) Perspectivas do emprego clínico dos antibióticos. *Tribuna Médica*; 14: 10-17.

TALAN D.A., CITRON D.M., VERTURF G.D., SINGER B., FROMAN P., GOLDSTEIN E.J. (1991) Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *J. Infect Dis*; 164: 195–98.

TEUBER M. (2001) Veterinary use, antibiotic resistance. *Curr Op Microbiol*; 4: 493-99.

TORTORA, G. J., FUNKE R. B., CASE C. L. (2005) Microbiologia. Editora Atheneu, SãoPaulo, 6ª edição.

TRABULSI, L.R., ALTHERTHUM, F. (2005) Microbiologia. Editora Atheneu, São Paulo, 4ª edição.

TU A.T. (1988) Snake venoms: general background and composition. In: *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. John Willey and Sons, New York, 1–19.

VAN ASSETT G.J. (1996) Penicillin tolerance, treatment failure in Group A streptococcal pharyngotonsillitis. *Eur J Clin Infect Dis*; 15: 107-15.

WHITE J. (2002) Bites and stings from venomous animals: a global overview. *Ther Drug Monit*; 22: 65–8.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000) Overcoming Antimicrobial resistance. WHO Health Report 2000, Geneva: <http://www.who.int/en> acessado em 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007) WHO Health, Geneva: Site do WHO, <http://www.who.int/en> acessado em maio de 2007.

YU G., MASON H. J., WU X., WANG J., CHONG S., DOROUGH G., HENWOOD A., PONGRAC R., SELINGER L., HE, B., NORMANDIN D., ADAN L., KRUPINSK J., MACOR, J. E. (2001) Substituted pyrazolopyridines as potent and selective PDE5 inhibitors: potential agents for treatment of erectile dysfunction. *J Med Chem*; 44: 1025-32.

ZHANEL G.G., WIEBE R., DILAY L., KARLOWSKY J.A. (2007) Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*; 6 1027-52.

Identification of *Viperidae* venoms antibacterial profile: new sources for proteomics

Bruno L.A Ferreira^{a,b}, Paula M. Terra^a, Dilvani O. Santos^a, Carlos R. Rodrigues^c, Cícero C. de Freitas^a, André Fully^{a,b}, Lucio M. Cabral^c, Helena C. Castro^{a,b*}

^a Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular (LABioMol), Departamento de Biologia Celular e Molecular, IB, Universidade Federal Fluminense, CEP 24001-970, Niterói, RJ, Brazil.

^b Curso de Pos-graduação em Neuroimunologia, IB, Universidade Federal Fluminense, CEP 24001-970, Niterói, RJ, Brazil.

^c Laboratório de Modelagem Molecular e QSAR (ModMolQSAR), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding author. Dr. Helena Carla Castro. Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular (LABioMol), Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, CEG, Universidade Federal Fluminense, CEP 24001-970, Niterói, RJ, Brazil. Tel: +550XX212629.2294, Fax: +55-0XX21-26292284 e E-mail: hcastrorangel@vm.uff.br.

Abstract – Bacterial infections involving multidrug-resistant strains are one of the ten leading causes of death and an important health problem in need for new antibacterial sources and agents. Herein we tested four snake venoms (*Agkistrodon rhodostoma*, *B. jararaca*, *B. atrox* and *Lachesis muta*) against ten Gram-positive and Gram-negative drug-resistant clinical bacteria strains to identify them as new sources of potential antibacterial molecules. Our data revealed that, as efficient as some antibiotics currently on the market (MIC=1-32µg/mL), *A. rhodostoma* and *B. atrox* venoms were active against *S. epidermidis* and *E. faecalis* (MIC=4µg/mL), while *B. jararaca* inhibited *S. aureus* growth (MIC=13µg/mL). As genomic and proteomic technologies are improving and developing rapidly, our results suggested that *A. rhodostoma*, *B. atrox* and *B. jararaca* venoms and glands are feasible sources for searching antimicrobial prototypes for future design new antibiotics against drug-resistant clinical bacteria. They also point to an additional perspective to fully identify the pharmacological potential of these venoms by using different techniques.

Keywords: Snake; antibiotic; bacteria; *S. epidermidis*; *Bothrops*; *Lachesis*; *Agkistrodon*, venom; antibacterial

Bacterial infections are among the ten leading causes of death worldwide according to the World Health Organization [WHO, 2007]. The presence and current emergence of the multiple resistant strains kept the risk of these infections become more threatening as the treatment become unreachable. In fact, bacterial resistance has been the major factor responsible for increasing morbidity, mortality and health care costs of bacterial infections [Barbosa and Levy, 2000, Ang *et al.*, 2004, De Lima *et al.*, 2005, WHO, 2005 and 2007]. Therefore new antimicrobials or antibacterial prototypes are continuously necessary for drug design and development for treatment of infections involving multidrug-resistant microorganisms [Guardabassi and Kruse, 2003, Roos, 2004, WHO, 2005 and 2007].

Snake venoms are a complex mixture of proteins and peptides that display potential biological activities and may lead to the production of new drugs of potential therapeutic value [Koh *et al.*, 2006]. A good example is the bradykinin-potentiating peptides (BPPs), which are naturally occurring inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) found in *B. jararaca* venom [Ferreira *et al.*, 1970]. The chemical and pharmacological properties of these peptides were essential for the development of captopril, the first active site directed inhibitor of ACE, currently used to treat human hypertension [Plosker and McTavish, 1995].

Lately, several naturally occurring peptides presenting antimicrobial activity have been described in the literature. However, **Viperidae** snake venoms that are an enormous source of peptides have not been fully explored for searching such biological activity [de Lima *et al.*, 2005, Stiles *et al.*, 1991]. Therefore, in this study we tested the antibiotic profile of four snake venoms from three different genera of **Viperidae** family (*A. rhodostoma*, *B. atrox*, *B. jararaca* and *Lachesis muta*) against ten Gram-positive (*E. faecalis*, *S. epidermidis*, and *S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*, *S. marscencens*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *A. calcoaceticus*, *K. pneumoniae*) drug-resistant clinical bacteria isolated from patients of the Hospital Antônio Pedro from Fluminense Federal University. Based on captopril history, our purpose is to identify some of these venoms as potential source for finding new and effective antibacterial prototypes.

Each venom purchased from Sigma (St. Louis, MO) was prepared in sterilized distilled and deionized water (20mg/mL) and tested against the strains grown in medium with peptone in triplicate as described elsewhere [Oliveira *et al.*, 2001]. Ciprofloxacin and vancomycin were used as positive controls and we considered the halo \geq 15mm as the value for positive antimicrobial activity as it generally leads to a Minimal Inhibitory Concentration (MIC) near to that observed for the newest antimicrobials current present on the market (MIC = 1-40 μ g/mL).

Our experimental data revealed that most of the venoms tested (*A. rhodostoma*, *B. atrox* and *B. jararaca*) exhibited a promising antibacterial activity against some of the Gram-positive bacteria. Interestingly, the *L. muta* venom showed no antibacterial activity (Table 1) even when it was obtained from different Brazilian suppliers (Instituto Butantan, Ezequiel Dias and Vital Brazil) (not shown) and despite of the presence of a known phospholipase A2 [Fuly *et al.*, 2002]. This negative result reinforces the fact that the presence of enzymes in the snake venoms do not guarantee the antibiotic profile of these materials as the bacteria cell wall may avoid or affect the actions of these proteins against them. Differently from *A. contortrix contortrix* venom [Stiles *et al.*, 1991], *A. rhodostoma* venom was able to significantly inhibit *E. faecalis* and *S. epidermidis* growth (halo=16mm and 16mm respectively) (Table 1), which may suggest a specific mechanism or molecule of *A. rhodostoma* on affecting them. *B. atrox* venom also showed an antibiotic profile against *E. faecalis* and *S. epidermidis* (halo =16 and 18mm respectively), different from *B. jararaca* venom, which acted only against *S. aureus* (halo=16mm) (Table 1).

Recently, the literature described L-amino acid oxidases (L-MAO) isolated from *B. pirajai* [Izidoro *et al.*, 2006] and *B. alternatus* venoms [Stabeli, *et al.*, 2004] able to inhibit *E. coli* growth. Our result pointed to the L-MAO isoforms presence in *Bothrops sp.* venoms as preserved components similar to C-type lectin-like proteins [Castro *et al.*, 1999]. However, as the active profile of these venoms switched to different strains and not included *E. coli*, our result may also suggest that other antibacterial components may be present in these venoms resulted from species differentiation. In addition *Bothrops* venoms (*B. atrox* and *B. jararaca*) acted against different *Staphylococcus sp.* (*S. epidermidis* and *S. aureus*, respectively) once again suggesting that different molecules and/or targets are involved in these biological activities. This hypothesis is reinforced by the presence of other different components found in snake venoms that sometimes are involved in a similar biological activity as RGD-peptides and some C-type lectin-like proteins from *B. jararaca* venom that are both platelet aggregation inhibitors [Koh *et al.*, 2006].

In order to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of these snake venoms, we tested them using serial dilution in agar assays as described elsewhere [Oliveira *et al.*, 2001]. MIC was defined as the lowest venom concentration preventing visible bacterial growth. All strains were tested at least in duplicate in four separate experiments and a reference antibiotic (vancomycin) was used as a positive control (MIC = 2µg/mL) (Table 2A). Overall, our assays revealed that the activity of the venoms tested was comparable (MIC 4-13 µg/mL) among them. *A. rhodostoma* and *B. atrox* were also analogous to the antibiotics currently in use against *S. epidermidis*, such as ampicillin, chloranfenicol, vancomycin, oxacillin and penicillin G (MIC=1-32µg/mL) (Table 2B). Presently *S. epidermidis* is an important nosocomial pathogen, drastically affecting immunocompromised patients and/or those with indwelling devices, such as joint

prostheses, prosthetic heart valves, and central venous catheters [Gill, 2005]. Therefore these venoms active profile against this strain is of interest for continuing pursuing an antibacterial molecule.

Proteomic technologies are improving and developing rapidly [Elrick *et al.*, 2006]. An important goal of proteomic studies of snake venoms is discovering molecules that may be used in treatment of diseases or as drugs prototypes. Nevertheless, these techniques may depend on the experimental data generated so far to identify some of these unknown proteins or peptides. Although snake venom peptides and proteins have a limited direct therapeutical use due to their antigenic and 'digestible' structure, their usefulness as prototypes has clear potential [Cushman *et al.*, 1991, Koh *et al.*, 2006]. Our data suggested that *A. rhodostoma*, *B. atrox* and *B. jararaca* are feasible sources for searching antimicrobial prototypes and designing new antibiotics against drug-resistant clinical bacteria, and these data may act as a start for investing on these venoms proteomic study for prototypes searching.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal Fluminense (UFF), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) from Brazil for the financial support and fellowships.

REFERENCES

- Ang JY, Ezike E, Asmar BI. 2004. Antibacterial resistance. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **71**: 229–39.
- Barbosa, T.M; Levy, S.B; 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug. Resist. Update* **3**: 303–311.
- Castro, HC, Fernandes, M, Zingali, RB, 1999. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon* **37**: 1403-1416.
- Cushman, DW, Ondetti, MA, 1991. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* **17**: 589–592.
- Ferreira, SH, Bartelt, DC, Greene, LJ. 1970 Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *B. jararaca* venom. *Biochemistry.* **9**: 2583-2593.
- Fuly AL, de Miranda AL, Zingali RB, Guimaraes JA. 2002 Purification and characterization of a phospholipase A2 isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem Pharmacol.* **63**:1589-1597
- Guardabassi L, Kruse H. 2003. Overlooked aspects concerning development and spread of antimicrobial resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **1**: 359–362.

- Gill, SR. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *S. aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *S. epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, **187**: 2426–2438.
- Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci.* **63**: 3030-3041.
- de Lima DC, Alvarez Abreu P, de Freitas CC, Santos DO, Borges RO, Dos Santos TC, Mendes Cabral L, Rodrigues CR, Castro HC. 2005. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? Evid. Based. Complement. Alternat. Med. **2**: 39-47.
- Izidoro LF, Ribeiro MC, Souza GR, Sant'Ana CD, Hamaguchi A, Homsibrandeburgo MI, Goulart LR, Beleboni RO, Nomizo A, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VM. 2006. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from bothrops pirajai snake venom. *Bioorg. Med. Chem.* **14**: 7034-7043.
- Plosker GL, McTavish D. 1995. Captopril. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy after myocardial infarction and in ischaemic heart disease. *Drugs Aging.* **7**: 226-253.
- Oliveira CGT, Miranda FF, Ferreira VF, Freitas CC, Carballido JM, Corrêa LCD. 2001 Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-hydrazinonaphthoquinones as analogs of lapachol. *Journal Brazilian Chemical Society*, Brasil, **12**: 339-345.
- Roos KL. 2004. Emerging antimicrobial-resistant infections. *Arch. Neurol.* **61**: 1512–1514.
- Stabeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RC, Selistre-de-Araujo HS, Giglio JR, Oliveira EB, Soares AM. 2004. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 2881-2886.
- Stiles BG, Sexton FW, Weinstein SA. 1991. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon* **29**: 1129-1141.
- Talan DA, Citron DM, Verturf GD, Singer B, Froman P, Goldstein EJ. 1991. Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. *J. Infect. Dis.* **164**: 195–198.
- White J. 2002. Bites and stings from venomous animals: a global overview. *Ther. Drug. Monit.* **22**: 65–68.
- World Health Organization, WHO, Department of Communicable Disease Surveillance, World Health Organization, Department of essential drugs and medicines policy, 2005. WHO Workshop on containment of antimicrobial resistance in Europe, 26-27 February 2004 in Wernigerode, Germany *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **48**: 221-231.

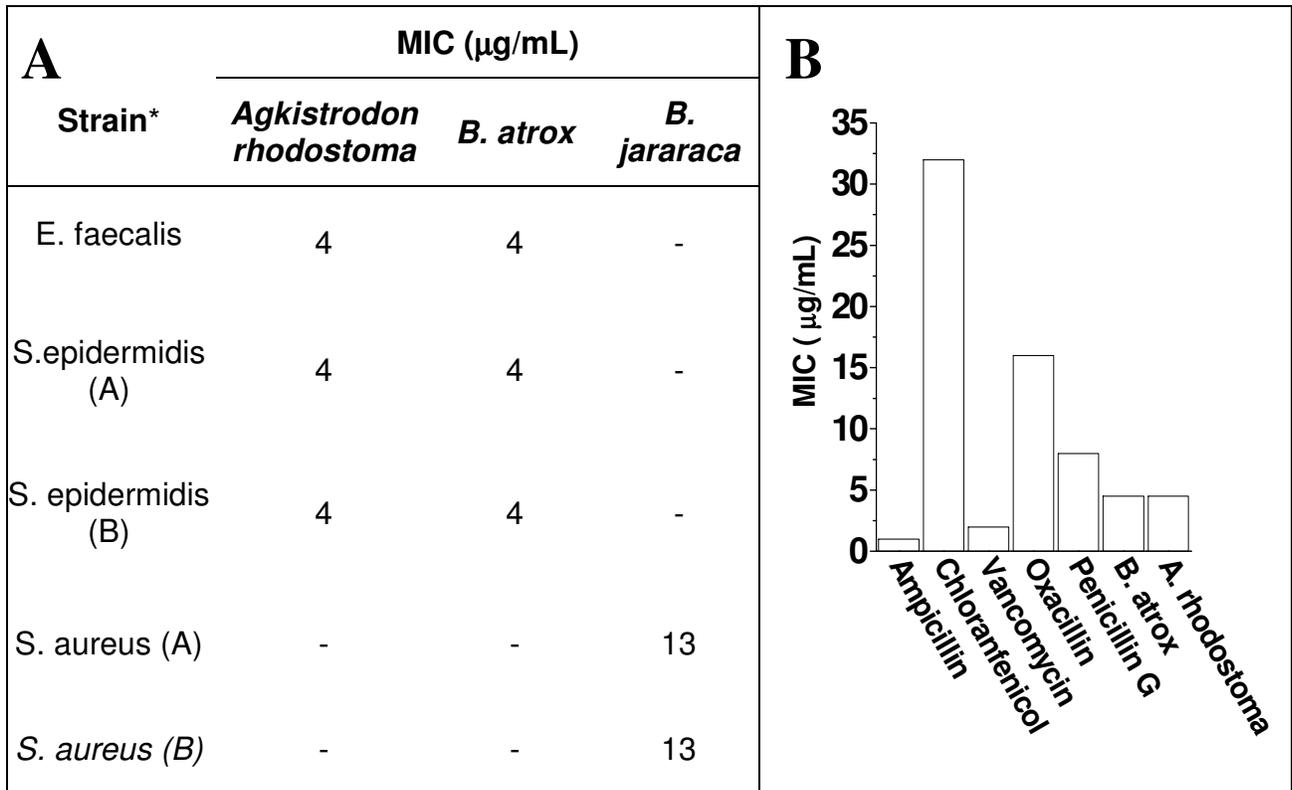
- World Health Organization, WHO, Department of Communicable Disease Surveillance, World Health Organization, Department of essential drugs and medicines policy. <http://www.who.int/en/> [10 January 2007]
- Elrick, M.M, Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. 2006 Proteomics: recent applications and new technologies. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**: 432-441.

Table 1: Antibacterial effect of **Viperidae** venoms against Gram-positive and Gram-negative drug-resistant clinical bacteria.

Strain	Inhibition zone (mm)*			
	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>Lachesis muta</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	16	16	13	1
<i>S. epidermidis</i>	16	18	0	0
<i>S. aureus</i>	13	12	16	3
<i>E. coli</i>	11	7	5	0
<i>Serratia morcencens</i>	8	8	7	1
<i>P. mirabilis</i>	7	7	7	2
<i>P. aeruginosa</i>	8	8	8	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	6	6	3
<i>A. calcoaceticus</i>	1	2	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	9	10	10	0

*The values represent a venom inhibition zone in mm, after 18 hr incubation performed in triplicate assays. Significant results were halo \geq 15mm.

Table 2: Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of **Viperidae** venoms. A- MIC of venoms presenting halo \geq 15mm. B- Comparison of MIC against *S. epidermidis* strain of *B. atrox* and *A. rhodostoma* and antibiotics of clinical use (ampicillin, chloranfenicol, vancomycin, oxacillin and penicillin G).



*A and B on *S. aureus* and *S. epidermidis* refer to different patients strains.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)