

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

BRUNO LEAL ALVES FERREIRA

**COMPOSTOS SINTÉTICOS: IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA NA PERSPECTIVA DE FORMAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS**

**TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL FLUMINENSE PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM
NEUROIMUNOLOGIA**

Orientadora: Dra. HELENA CARLA CASTRO

uff
NITEROI
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BRUNO LEAL ALVES FERREIRA

COMPOSTOS SINTÉTICOS: IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NA PERSPECTIVA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

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

Tese de doutorado submetida à
Universidade Federal Fluminense
para Obtenção do Grau de Doutor em
Neuroimunologia

Orientadora: Dra. HELENA CARLA CASTRO



BRUNO LEAL ALVES FERREIRA

COMPOSTOS SINTÉTICOS: IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NA PERSPECTIVA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Tese do Doutorado submetida a
Universidade Federal
Fluminense para obtenção do
grau de Doutor em
Neuroimunologia

BANCA EXAMINADORA

Prof Elizabeth Giestal de Araujo (UFF) (Presidente)

Prof. Ronaldo da Silva Mohana Borges (UFRJ) (Membro 1)

Prof. Carlos Rangel Rodrigues (UFRJ) (Membro 2)

Prof. André Lopes Fuly (UFF) (Suplente)

Prof Dilvani Oliveira Santos (UFF) (Revisor)

Prof.Helena Carla Castro (UFF) (Orientadora)

Alves Ferreira, Bruno Leal

COMPOSTOS SINTÉTICOS: IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NA PERSPECTIVA DE FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS/ Bruno Leal Alves Ferreira – Niterói: [s. n.], 2011.

TESE DE DOUTORADO (Doutor em Neurociências). – Universidade Federal Fluminense, 2011.

*“A mente que se abre a uma idéia, jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha esposa Liliam.

A minha filha Melissa

A meus pais, Vilma e Delly.

A minha tia Corina.

Aos meus irmãos Alex e Márcio.

A toda a minha família.

A minha orientadora, Dr^a. Helena C. Castro.

Ao Professor Dr^o 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

1

1.1 ANTIBACTERIANOS: RESSALTANDO FATOS IMPORTANTES

1

1.2 PATOGENICIDADE BACTERIANA :INVASÃO E RESPOSTAS

CELULARES 6

1.3 PRINCIPAIS ANTIBACTERIANOS DE USO CLÍNICO

11

1.3.1 – Penicilinas

11

1.3.2 – Cefalosporinas

12

1.3.3 – Carbapenens

14

1.3.4 – Aminoglicosídeos

14

1.3.5 – Glicopeptídeos

17

1.3.6 – Tetraciclinas

17

1.3.7 – Cloranfenicol

17

1.3.8 – Quinolonas

18

1.3.9 – Sulfonamidas

18

1.4 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIBACTERIANOS

19

1.4.1 A Ação Antibacteriana sobre a Parede Celular

20

1.4.2 – A Ação Antibacteriana sobre a Membrana Celular

22

1.4.3 A Ação Antibacteriana Sobre a Síntese de Proteínas e

Metabólitos

Bacterianos

23

1.4.4 A Ação Antibacteriana Sobre a Replicação do DNA

cromossômico

25

1.5 A RESISTÊNCIA BACTERIANA

25

1.5.1 Conceitos Gerais

25

| | | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|----|
| | 1.5.2 Resistência - Origem e Classificação | 28 |
| | 1.5.3 Resistências Simples, Múltipla e Cruzada | 29 |
| | 1.5.4 - Mecanismos Bioquímicos da Resistência Bacteriana | 30 |
| Bacteriana | 1.5.5 - Mecanismos Genéticos de Transferência da Resistência | 32 |
| | 1.5.5.1 Mutação | 32 |
| | 1.5.5.2 Transformação | 32 |
| | 1.5.5.3 Conjugação | 35 |
| | 1.5.5.4 Transposição | 35 |
| | 1.6 A Resistência Bacteriana Atualmente | 35 |
| | 1.6.1 Multirresistência: KPC, NDM e XDR | 36 |
| | 1.7 Fontes de Novos Protótipos a Antibacterianos | 39 |
| | 1.7.1 Linezolida | 39 |
| | 1.7.2 Sistemas Tienopiridina e Pirazolopiridina | 40 |
| | 1.7.3 Triazóis | 42 |
| | 1.7.4 Chalconas | 43 |
| | 1.7.5 Lapachonas | 44 |
| | 1.8 OS ANTIBACTERIANOS E A NANOTECNOLOGIA | 46 |
| 2 – OBJETIVOS | | 51 |
| | 2.1 – GERAL | 51 |
| | 2.2 – ESPECÍFICOS | 51 |
| 3 – MATERIAL E MÉTODOS | | 53 |
| | 3.1 - BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO. | 53 |
| | 3.2 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUES DOS MATERIAIS. | 54 |
| | 3.2.1 Sistemas Tienopiridina e Pirazolopiridina. | 54 |
| | 3.2.2 Hidrazonas | 54 |
| | 3.2.3 Chalconas | 54 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4 | Quinolonas | 55 |
| 3.2.5 | Lapachonas | 55 |
| 3.3 | ANTIBIOGRAMA QUALITATIVO - TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO (TSA) PARA ANÁLISE AVALIATIVA E COMPARATIVA | 55 |
| 3.3.1 | Preparação dos Discos de Papel | 55 |
| 3.3.2 | Controles experimentais | 56 |
| 3.3.3 | Teste de Difusão em Discos (TSA) | 56 |
| 3.4 | ANTIBIOGRAMA QUANTITATIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC). | 57 |
| 4 | RESULTADOS | 59 |
| 4.1 | TESTE DE SENSIBILIDADE EM DISCO | 59 |
| 4.1.1 | Derivados do Sistema Tienopiridina | 59 |
| 4.1.1 | Derivados do Sistema Pirazolopiridina | 61 |
| 4.1.2 | Derivados de Hidrazonas | 63 |
| 4.1.3 | Derivados de Chalconas | 64 |
| 4.1.4 | Derivados de Quinolonas | 64 |
| 4.1.4 | Derivados de Lapachonas | 65 |
| 4.2 | CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) | 66 |
| 4.1.1 | Derivados do sistema Pirazolopiridina | 67 |
| 4.2.2 | Derivados de Hidrazonas | 68 |
| 4.1.4 | Derivados de Lapachonas | 69 |
| 5. | DISCUSSÃO | 70 |
| 5.1 | TESTE DE SENSIBILIDADE: ANÁLISE BIOLÓGICA E ESTRUTURAL | 70 |
| 5.2 | ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) DOS DERIVADOS DE LAPACHONAS, HIDRAZONAS E SISTEMA PIRAZOLOPIRIDINA COMO PROTÓTIPOS DE AGENTES ANTIBACTERIANOS | 77 |
| 5.2.1 | Derivados de Pirazolopiridina | 77 |
| 5.2.2 | Hidrazonas | 79 |

| | |
|----------------------------------------------|-----|
| 5.2.3 Lapachonas | 81 |
| 5.3 NOVAS ALTERNATIVAS DE ANTIBIOTICOTERAPIA | 83 |
| 6. CONCLUSÕES | 85 |
| 7. REFERÊNCIA | 87 |
| 8. APÊNDICES | 107 |

LISTA DE ABREVIATURAS

NDM-- Nova Delhi Metallo-beta-lactamase-1

ATCC – Coleção de Cepas Tipo Americana.

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

CMB – Concentração Mínima Bactericida.

MIC – 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.

NDM-1 – Nova Delhi Metallo-beta-lactamase-1

XDR – (Extensively drug-resistant).

TSST – Toxina da Síndrome do Choque Tóxico.

VDE – Enterococos Dependentes de Vancomicina.

VRE – Enterococos Resistentes a Vancomicina

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

ESBLs - β -lactamases espectro estendido

AmpC - Beta-lactamases cromossômicas

LISTA DE FIGURAS

| | Pág |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1: Infecções bacterianas. A) Algumas das principais infecções bacterianas e seus sítios de ação (adaptado de http://www.healthhype.com/wp-content/uploads/Bacterial_infections.png) e B) As dez maiores causas de morte no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde. Em vermelho as patologias relacionadas com bactérias (WHO, 2007). | 2 |
| Figura 2: Surgimento de alguns antibacterianos em ordem cronológica. | 4 |
| Figura 3: Patogenicidade bacteriana. A) Exemplo de mecanismos de defesa do hospedeiro contra uma bactéria mostrando as espiroquetas como modelo (retirado de Steere <i>et al.</i> , 2004). B) Comparação dos mecanismos de evasão de bactérias extra e intra-celulares (bactéria mostrada em azul) (adaptado de http://www.research.a-star.edu.sg/research/6222) | 7 |
| Figura 4: Núcleo básico de uma Penicilina mostrando o anel β -lactâmico. R= posição do substituinte. | 12 |
| Figura 5: Núcleo base de uma Cefalosporina. R 1 e 2 = posições dos substituintes. | 13 |
| Figura 6: Sítios de ação dos principais antibacterianos, freqüentemente empregados em clínica. | 19 |
| Figura 7: Etapas da ação da penicilina sobre a parede celular. | 20 |
| Figura 8: Principais mecanismos envolvidos no processo de geração de bactérias resistentes. | 31 |
| Figura 9: Estrutura molecular da Linezolida. | 40 |
| Figura 10: Sistemas heterocíclicos tienopiridina (A) e pirazolopiridina (B). | 42 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 11: Estrutura molecular do triazol | 42 |
| Figura 12: Estrutura molecular da chalcona | 44 |
| Figura 13: Estrutura molecular da beta-lapachona | 45 |
| Figura 14: O fármaco e a nanopartículas. A) dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; B) adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas e c) adsorvido na matriz polimérica das nanoesferas. | 47 |
| Figura 15: Teste de difusão em discos com as etapas de realização do teste (esquerda) e a placa contendo resultado positivo de antibacterianos distintos com halos de inibição (direita). | 56 |
| Figura 16: Representação do ensaio de Antibiograma quantitativo por macrodiluição, mostrando crescimento bacteriano a partir do quinto tubo de diluição e a determinação 8 μ g/mL como MIC. | 58 |
| Figura 17: Estrutura das Tienopiridinas e resultados do Teste de Sensibilidade em Disco. O núcleo base contendo a carboxila forma a série A, carbonitrila a série B ou imidazol a série C. Os antibacterianos controles (Vancomicina e Ciprofloxacina) apresentaram halos entre 16 mm e 32 mm. | 60 |
| Figura 18: Estrutura e resultados do Teste de Sensibilidade em Disco dos derivados de pirazolo-piridina; O núcleo base contendo rigidez conformacional forma a série A enquanto aquele contendo a carboxila e liberdade conformacional forma a série B. O quadro abaixo mostra os derivados de Pirazolopiridina ativos frente as cepas multiresistentes de <i>S.epidermidis</i> produtoras de β -lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina (Halo em mm). Os controles utilizados para as demais cepas apresentaram halos entre 16mm e 32 mm para neste ensaio (Vancomicina e Ciprofloxacina). | 62 |
| Figura 19: Núcleo base dos derivados de Hidrazonas e teste de sensibilidade (TSA) - Antibiograma qualitativo frente a cepa de <i>S. aureus</i> 8148 produtora de β -lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina e <i>S. aureus</i> ATCC resistente a Penicilina G. | 63 |
| Figura 20: Núcleo básico dos derivados de chalconas com alguns de seus substituintes e resultados dos testes de sensibilidade. | 64 |
| Figura 21: Núcleo básico dos derivados das quinolonas com alguns de | 65 |

seus substituintes e resultados dos testes de sensibilidade

Figura 22: Estrutura química dos derivados de Lapachona e resultados dos testes de sensibilidade (Halos em mm) frente *Pseudomonas aeruginosa* 36408 produtora de β -lactamases, resistentes ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos. **66**

Figura 23: Comparação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC) dos antibacterianos de uso clínico e dos derivados de Pirazolopiridina frente as cepas de *Staphylococcus epidermidis* 201 e 8126 produtoras de β -lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina. **67**

Figura 24: Comparação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC) dos antibacterianos de uso clínico e o derivado de Hidrazonas frente as a cepa de *S. aureus* 8148 produtora de β -lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina (direita) e *S. aureus* ATCC resistente a Penicilina G (esquerda). **68**

Figura 25: Comparação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC) dos antibacterianos de uso clínico e derivados de Lapachonas frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 36408 produtora de β -lactamases, resistente ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos. **69**

Figura 26: Comparação estrutural entre Pirazolopiridina e Oxacilina **73**

Figura 27: Representação esquemática do modo de ação dos antibacterianos beta-lactâmicos e glicopeptídeos. As Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs), enzimas que catalizam as etapas finais da síntese da parede bacteriana se liga a região terminal de resíduos D-alanil-D-alanine dos precursores peptidoglicanos para realizar a transpeptidação (A). Os antibacterianos beta-lactâmicos (β) são estruturalmente análogos ao D-Ala-D-Ala e as PBPs podem reagir com esses antibacterianos pela clivagem da ligação beta-lactâmica e formar um intermediário estável que não segue em reação. A acilação posterior das PBPs devido a esse processo inactiva a enzima (B). Os glicopeptídeos (G) inibem a síntese de parede celular impedindo a ligação do substrato a enzima pela ligação ao D-Ala-D-Ala (C). Adaptado <http://www.itqb.unl.pt/labs/bacterial-cell-biology>. **79**

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Classes de antibacterianos incluindo antibióticos e quimioterápicos (Parte 1) | 15 |
| Tabela 1: Classes de antibacterianos incluindo antibióticos e quimioterápicos (Parte 2) | 16 |
| Tabela 2: Antibacterianos que agem sobre a síntese protéica. | 24 |
| Tabela 3: Comparação dos sistemas testados considerando o número de compostos ativos, cepas sensíveis e Concentração Mínima Inibitória (MIC). | 71 |

RESUMO

O surgimento de cepas multirresistentes ao antibacterianos como as bactérias produtoras de carbapenemases (KPCs) têm evidenciado o problema da resistência bacteriana e a necessidade crescente pela busca de novas moléculas que possam permitir uma melhoria no tratamento de infecções por organismos patogênicos resistentes a moléculas convencionais. No sentido desta busca, derivados de sistemas cíclicos podem servir como novos protótipos para a descoberta de antibacterianos. Assim o objetivo deste trabalho é a identificação e análise de 243 moléculas derivadas dos sistemas tienopiridina, pirazolopiridina, quinolonas, chalconas, lapachonas e hidrazonas quanto ao seu perfil antibacteriano realizando-se uma comparação com antibióticos de uso clínico. Para isso, foram realizados ensaios microbiológicos incluindo testes de sensibilidade aos antibióticos (TSA) e determinação da concentração inibitória mínima (MIC), utilizando-se antibióticos de uso clínico como controle e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sensíveis (padrões) e multiresistentes, fornecidas pelo Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) a partir da coleta dos pacientes. O nossos resultados mostraram que das 243 moléculas testadas, apenas: a) os derivados do sistema pirazolopiridina (n=5) ativos frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*, . b) um derivado de hidrazonas, ativo frente a *S. aureus* e c) derivados de lapachonas (NOR β e RC-23) ativos frente a cepa *Pseudomonas aeruginosa*. A comparação do MIC dos derivados ativos (2-64 μ g/mL) com antibacterianos de uso clínico (Ciprofloxacina, Vancomicina, Cefoperazona, Nitrofurazonina, Amicacina e Mezlocilins) (2-32 μ g/mL) indicam que esses derivados são protótipos promissores para serem explorados no desenho de novas moléculas mais potentes e seguras para o tratamento de infecções causadas por cepas multiresistentes.

ABSTRACT

The emergence of multidrug-resistant strains to antibacterial agents such as carbapenemases-producing bacteria (KPCs) has evidenced the problem of bacterial resistance and the increasing need to search for new molecules that can allow an improvement in the treatment of infections caused by pathogens resistant to conventional molecules. Towards this search, derivatives of cyclic systems can serve as new leads for the discovery of antibacterials. Thus, the purpose of this work is the identification and analysis of 243 molecules derived from the systems thienopyridine, pyrazolopyridine, quinolones, chalcones, hydrazones and lapachones, regarding their antibacterial profile by performing a comparison with antibiotics of clinical use. On that purpose, microbiological assays were conducted including antibacterial sensitivity tests (AST) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC), using antibiotics of clinical use as a positive control and Gram-positive and Gram-negative susceptible (standards) and multiresistant strains provided by the Antonio Pedro University Hospital (HUAP) from the collection of patients. Our results showed that from the 243 molecules tested, only a few number was active including: a) five derivatives of the system pyrazolopyridine active against *Staphylococcus epidermidis*, b) one hydrazone derivative, active against *S. aureus* and c) two derivatives from lapachone (NOR β and RC-23) active against *Pseudomonas aeruginosa*. The MIC comparison of the active derivatives (2-64 μ g/mL) with antibacterial agents of clinical use (ciprofloxacin, vancomycin, Cefoperazone, Nitrofurantoina, amikacin and Mezlocilins) indicate that these derivatives are promising prototypes to be explored in designing new more potent and safe molecules for the treatment of infections caused by multiresistant strains.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Antibacterianos: ressaltando fatos importantes

Desde o surgimento do homem, os microrganismos estiveram associados a doenças inicialmente desconhecidas e incuráveis. Entretanto, as causas destas doenças começaram a ser descobertas a partir de 1878 com o trabalho de Pasteur e Koch (Andersson *et al.*, 2010).

A partir do século XIX, drogas medicinais passaram a ser obtidas por métodos laboratoriais permitindo a identificação de inúmeras moléculas (fenois, cresóis, formol, quinina, ametina e outros) com diversas atividades terapêuticas (ex: antiparasitária) (Mans *et al.*, 2009). Entretanto, infecções causadas por bactérias, que estão atualmente entre as dez maiores causas de morte no mundo (Figura 1), continuaram a surgir desde aquela época.

Vuillemin em 1889 criou o termo antibiose para explicar o processo natural de seleção pelo qual um ser vivo destrói outro para assegurar a sua própria existência. Mais tarde surgiu o conceito atual de antibióticos relacionado a substâncias de origem biológica e que têm efeito deletério sobre microorganismos (Tortora *et al.*, 2005).

Os antibacterianos foram então descobertos e desenvolvidos como opções para o tratamento destas infecções. Quanto a origem, os eles se dividem então em três grandes grupos incluindo não só os antibióticos, mas também os semi-sintéticos e os quimioterápicos (Tortora *et al.*, 2005).

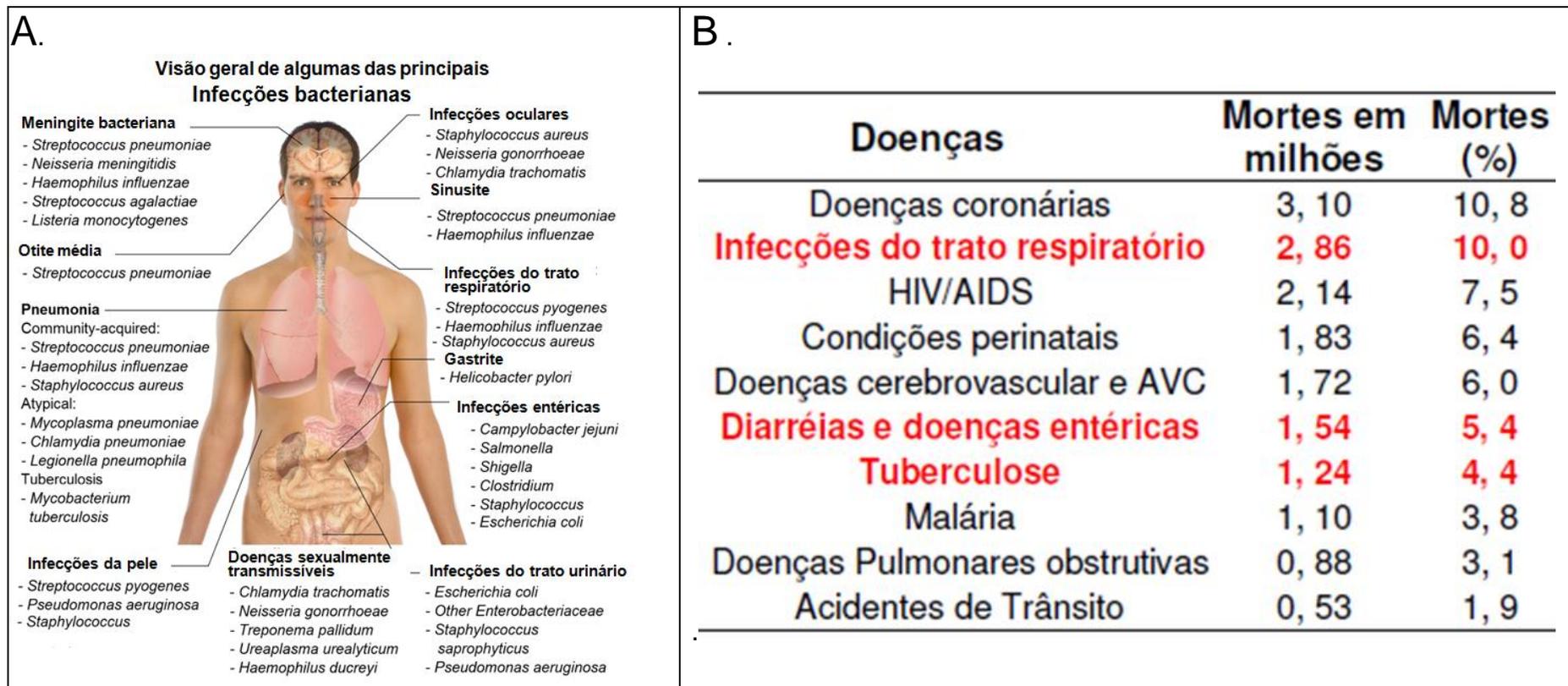


Figura 1: Infecções bacterianas. A) Algumas das principais infecções bacterianas e seus sítios de ação (adaptado de http://www.healthype.com/wp-content/uploads/Bacterial_infections.png) e B) As dez maiores causas de morte no mundo segundo a Organização Mundial de Saúde. Em vermelho as patologias relacionadas com bactérias (WHO, 2007).

Os semi-sintéticos surgiram com os primeiros casos de resistência aos antibióticos descritos na literatura, com a finalidade de evitá-la e melhorar a atividade das moléculas naturais já existentes, que foram e ainda são modificados em laboratório, gerando essa classe de substâncias (Trabulsi 2005; Ravat *et al.*, 2010).

Diferentemente, os quimioterápicos são moléculas sintetizadas totalmente em laboratório, gerando continuamente novas classes de antibacterianos. No início do século XX foi quando surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica (Trabulsi 2005; Ravat *et al.*, 2010).

Com o trabalho de Paul Ehrlich (1854-1915), que elaborou a teoria da ligação das drogas a receptores específicos nas células e estabeleceu os princípios básicos da quimioterapia, houve um grande avanço nas pesquisas inclusive na área dos antibacterianos (Trabulsi 2005; Ravat *et al.*, 2010). O desenvolvimento dos quimioterápicos possibilitou em 1930 a demonstração da atividade terapêutica das sulfonamidas contra infecções bacterianas sistêmicas, culminando com o surgimento de inúmeros derivados sulfamínicos denominados atualmente de sulfas (Gadjeva *et al.*, 2010) (Figura 2).

Outro fato importante foram as descobertas de Duschesne em 1896, que iriam influenciar no desenvolvimento do primeiro antibiótico de uso clínico. Ernest Duschesne escreveu um trabalho científico no qual demonstrava que alguns fungos, especialmente o *Penicillium glaucum*, inoculado em animais, exerciam atividade terapêutica contra infecções bacterianas.

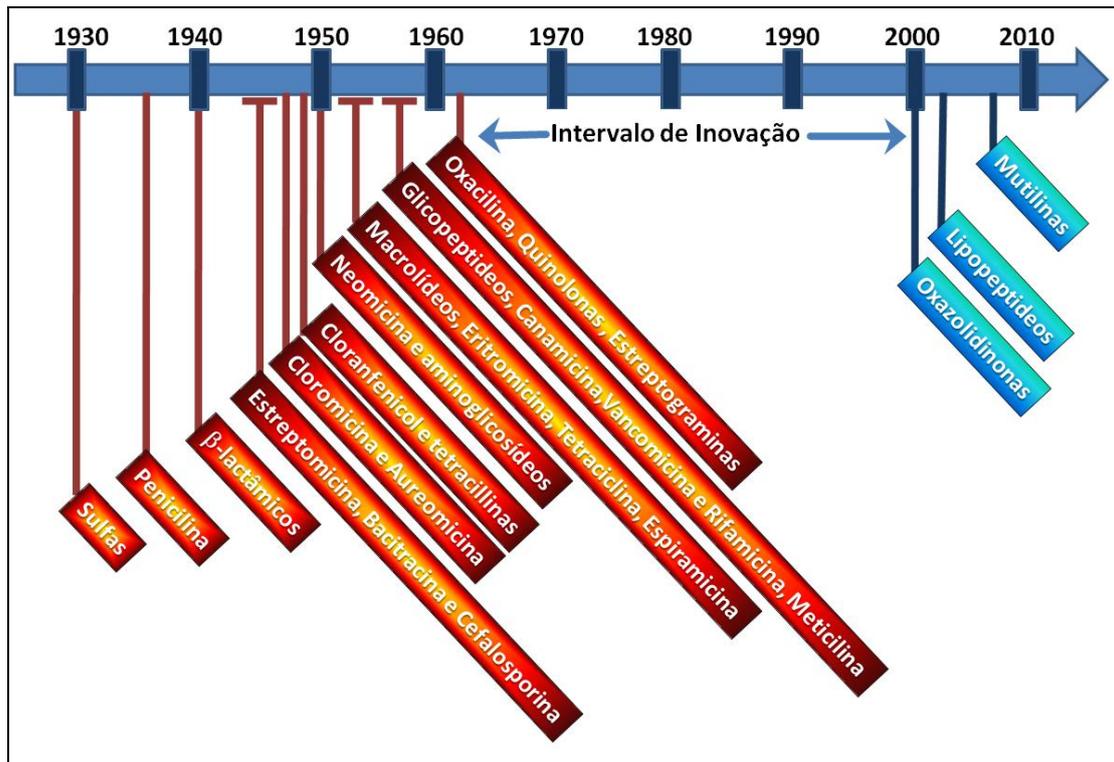


Figura 2: Surgimento de alguns antibacterianos em ordem cronológica.

Em 1936 quando Alexander Fleming estudava culturas de *Staphylococcus aureus*, deixadas sobre a bancada e contaminadas acidentalmente com fungos da espécie *Penicillium notatum*, observou que ao redor dos fungos contaminantes não havia crescimento bacteriano.

Fleming descobriu que o fungo contaminante produzia uma substância, filtrável e não tóxica, que exercia atividade antibacteriana que recebeu o nome de Penicilina (Figura 2). Em 1939, Florey e Chain isolaram das culturas do *Penicillium*, a penicilina, viabilizando assim o primeiro antibiótico de uso clínico (Ravat *et al.*, 2010).

Em 1943, Waksman e colaboradores, após terem estudado diferentes culturas de fungos, descobriram a estreptomicina que foi obtida a partir de

culturas do fungo *Streptomyces griseus* e introduzida no uso clínico em 1944 (Figura 2). De forma importante, a estreptomicina mostrou-se eficaz contra bactérias gram-negativas e contra a *Mycobacterium tuberculosis*, inovando o tratamento contra a tuberculose (Ebrahim *et al.*, 2010).

Nos anos que se seguem, entre 1945 e 1961, novos antibacterianos foram descobertos, dentre eles destacam-se: cloranfenicol, tetraciclina, rifamicinas, metilicina, oxacilina e vancomicina (Figura 2) (Stryjewski e Corey 2010).

A descoberta do processo semi-sintético de obtenção de novas penicilinas, como a metilicina e a oxacilina, gerou um período de intervalo na qual as indústrias farmacêuticas investiram em outras classes de medicamentos mais lucrativos. Isso permitiu o surgimento das bactérias multiresistentes, o que gerou novamente um impulso nas pesquisas com antibacterianos na atualidade. Esse estímulo vem da necessidade premente de novas moléculas para o tratamento de infecções por cepas multiresistentes (Stryjewski e Corey 2010).

Assim a produção de antibacterianos integralmente sintetizados em laboratório, incluindo moléculas como as oxazolidinonas (ex: linezolid) e os lipopeptídeos (ex: daptomicina) tem sido estimulada que seja possível o tratamento de infecções causadas pelas chamadas vulgarmente de superbactérias (Stryjewski e Corey 2010 e Ebrahim *et al.*, 2010) (Figura 2).

A daptomicina é um lipopeptídeo e uma importante opção de antibacteriano para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA), enquanto o Linezolid, uma nova

oxazolidinona, tem mostrado boa atividade contra bactérias gram-positivas, especialmente no tratamento de pneumonia nosocomial and infecções de pele ou tecidos moles causadas por MRSA (Stryjewski e Corey 2010).

O surgimento de novas classes como as mutilinas e de outras ainda em fase inicial de testes, apesar de promissor, não é considerado eficiente o bastante para conter o grau de patogenicidade de bactérias resistentes, o que deve ser compreendido para melhor atuação na área de identificação de novos antibacterianos.

1.2 Patogenicidade Bacteriana: Invasão e Respostas Celulares

Estruturas como pele, membranas, mucosas, células, proteínas especializadas como os anticorpos e o sistema complemento são mecanismos de defesa contra agentes com potencial infeccioso (Figura 3) (Tortora *et al.*, 2005; Sławek *et al.*, 2010). Contudo, as bactérias determinam a sua patogenicidade a partir do desenvolvimento de mecanismos que contribuem para aumentar a capacidade de infecção e que ajudam a burlar o sistema imunológico do hospedeiro.

Bactérias patogênicas são classificadas em primárias e oportunistas. As primárias causam infecções em indivíduos normais e as oportunistas afetam indivíduos com o sistema imunológico comprometido, podendo causar diferentes processos infecciosos (Figura 3) (Deleo *et al.*, 2009).

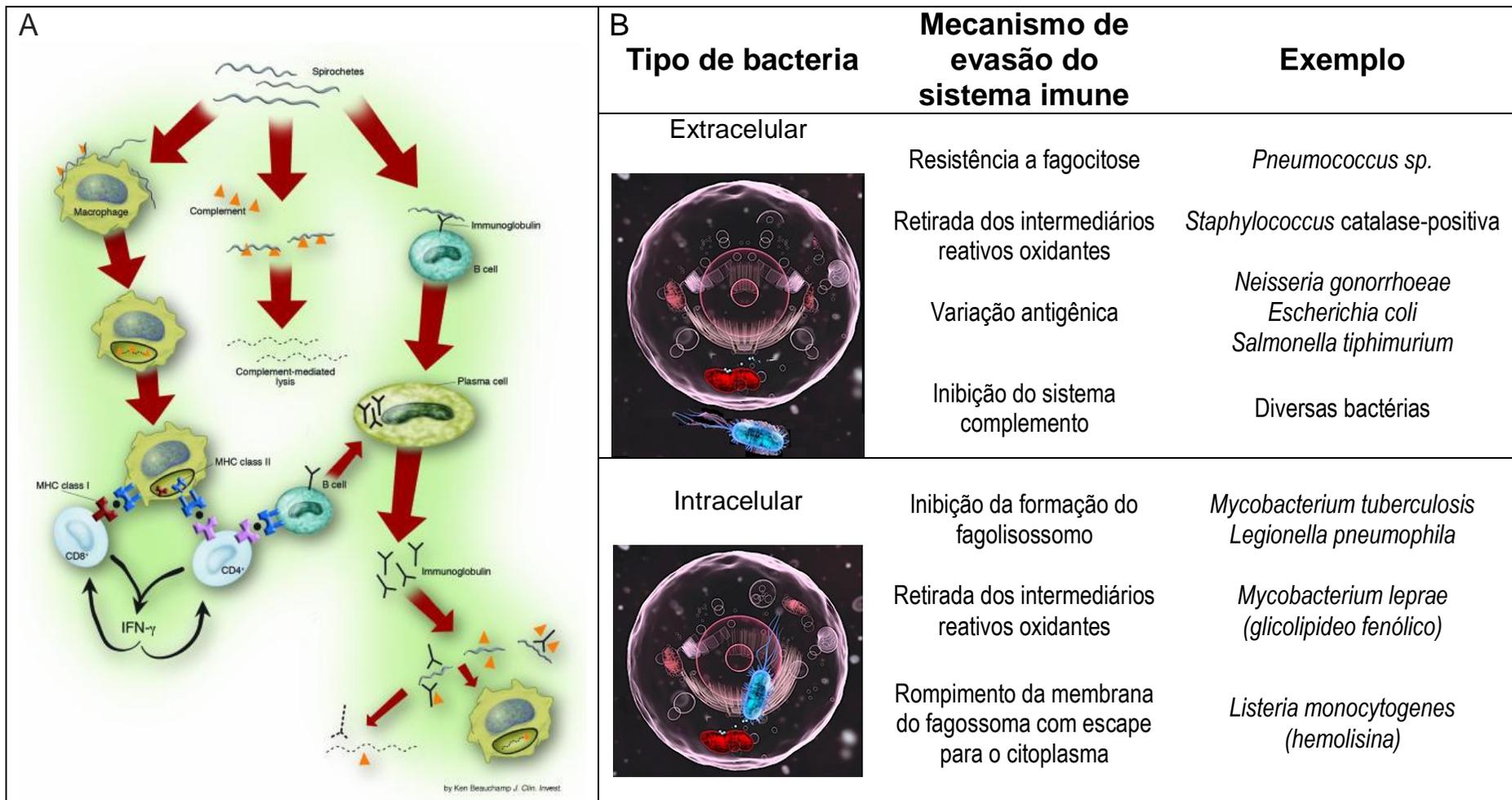


Figura 3: Patogenicidade bacteriana. A) Exemplo de mecanismos de defesa do hospedeiro contra uma bactéria mostrando as espiroquetas como modelo (retirado de Steere *et al.*, 2004). B) Ccomparação dos mecanismos de evasão de bactérias extra e intra-celulares (bactéria mostrada em azul) (adaptado de <http://www.research.a-star.edu.sg/research/6222>).

De forma geral, algumas bactérias desenvolveram a capacidade de invasão celular através da produção de proteínas da parede celular (invasinas). A célula epitelial é o principal alvo das bactérias invasoras que podem chegar a corrente sanguínea, basicamente penetrando nas células do organismo por fagocitose, quer seja a fagocitose exercida por células epiteliais ou fagocitárias (Figura 3) (Tortora *et al.*, 2005).

A bactéria, pode ainda induzir a sua própria fagocitose com a finalidade de atingir o interior da célula hospedeira. Após a fagocitose induzida, algumas bactérias rompem o vacúolo atingindo o citoplasma podendo ainda se disseminar para outras células vizinhas (ex.: *Shigella* e *Listeria*). Outras como *Salmonella typhimurium* e *Yersinia enterocolitica* permanecem dentro do vacúolo que as transportam para o tecido sub-epitelial ou proliferam dentro do vacúolo, como é o caso da salmonela (Brigotti *et al.*, 2010).

As células do hospedeiro respondem a invasão bacteriana com o aumento de cálcio intracelular e ativação de várias cinases, levando a produção de fosfolipases. As fosfolipases agem sobre o ácido araquidônico, que se encontra na forma esterificada nos fosfolipídios de membrana, liberando-o, sendo este metabolizado através da ciclooxigenase (COX1 e COX2) dando origem as prostaglandinas. Essas moléculas ligam-se aos receptores de proteínas G de vários tipos celulares podendo causar vasodilatação e potencialização do edema causando dor, febre e inflamação. Não só as prostaglandinas como também outros eicosanóides (metabólitos do ácido araquidônico) e citocinas são capazes de causar lesões nos tecidos,

amplificando assim, o efeito inflamatório causado pela infecção bacteriana (Trabulsi *et al.*, 2005; Clinton *et al.*, 2010).

A temperatura corporal é controlada pelo hipotálamo que normalmente a ajusta para 37°C. Algumas substâncias afetam o hipotálamo aumentando a temperatura corporal, como é o caso do lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular das bactérias, que quando é liberado, faz com que os macrófagos secretem interleucina-1 (IL-1) (Trabulsi *et al.*, 2005; Clinton *et al.*, 2010).

A IL-1 faz com que o hipotálamo libere prostaglandina que induzirá o aumento da temperatura do corpo, causando assim, a febre além de aumentar a produção de linfócitos T. A temperatura corpórea alta diminui a multiplicação de algumas bactérias dando o tempo necessário para que ocorra a ação imunológica (Trabulsi *et al.*, 2005; Clinton *et al.*, 2010).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que é produzido pelos macrófagos e mastócitos, também induz a febre e intensifica o efeito dos interferons inibindo o crescimento de alguns microorganismos, reduzindo a quantidade de ferro disponível para o metabolismo bacteriano (Trabulsi *et al.*, 2005; Ramakrishnan *et al.*, 2010).

O corpo responde a febre com a constrição dos vasos sanguíneos, aumento da velocidade do metabolismo e tremores que aumentam gradativamente a temperatura do corpo. A temperatura alta, por acelerar o metabolismo celular, ajuda no reparo do tecido e eleva as reações do corpo. A temperatura é controlada, geralmente, quando a infecção cede e por mecanismos de perda de calor, como a vasodilatação e a sudorese que

indicam que o corpo está tentando ajustar a temperatura (Tortora. *et al.*, 2005; Deurenberg *et al.*, 2008).

O crescimento e a multiplicação de bactérias pode ocorrer dentro das células (bactérias intracelulares) ou fora das células (bactérias extracelulares) (Figura 3). Algumas bactérias (*Rickettsia sp*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Mycobacterium leprae*) são intracelulares obrigatórias, pois necessitam das moléculas sintetizadas pelas células sendo um estilo de vida vantajoso, pois protege a bactéria de anticorpos, complemento, fagocitose e de alguns antibacterianos (Trabulsi *et al.*, 2005; Clinton *et al.*, 2010).

Bactérias intracelulares facultativas (*Salmonella sp*, *Listeria sp*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*) podem viver tanto dentro quanto fora das células. Outros tipos de bactérias desenvolveram o estilo de vida extracelular (*Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Bordetella sp*, *Neisseria sp*, *Víbrio*), embora mais susceptíveis ao sistema imune. Para sobreviver no ambiente extracelular essas bactérias desenvolveram técnicas de sobrevivência que lhes permitem burlar o sistema de defesa do indivíduo infectado (Trabulsi *et al.*, 2005; Geria *et al.*, 2010).

Assim, apesar dessas defesas, os seres humanos ainda são suscetíveis aos patógenos posto que alguns deles têm a capacidade de superar as defesas, estabelecer virulência e determinar um quadro de sintomas que o organismo desencadeia como resposta orgânica, que pode ser tão variada quanto os diferentes tipos de patógenos existentes (Figura 3) (Trabulsi *et al.*, 2005; Ramakrishnan *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2009).

As bactérias podem ainda se aderir ao tecido do hospedeiro formando, em sua superfície, uma camada de células bacterianas (microcolônias) ou agregados que são envolvidos por uma película de exopolissacarídeos bacteriana denominada de biofilmes. Os biofilmes servem como uma fonte constante de bactérias, podendo causar infecção em diferentes tecidos ou órgãos. Nos biofilmes, as bactérias encontram-se relativamente protegidas das defesas do organismo e da ação de antibacterianos. Os biofilmes podem ser formados tanto em dispositivos de plástico como nas mucosas (fibrose cística), nos dentes (placa dentária) e em polímeros utilizados na prática médica (Yamane *et al.*, 2010).

Para transpor toda essa patogenicidade e diversidade bacteriana, são necessárias diferentes opções de antibacterianos que utilizem diferentes mecanismos de ação e que possam atuar de forma significativa frente essas cepas.

1.3 Principais Antibacterianos de Uso Clínico

1.3.1 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 4) (Noga e Silphaduang 2003; Brown 2004; Buynak 2004). As penicilinas G e V são penicilinas naturais, isoladas dos 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; Nomura *et al.*, 2010).

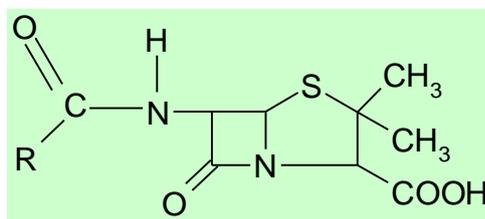


Figura 4: Núcleo básico de uma Penicilina mostrando o anel β -lactâmico. R= posição do substituinte.

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, como as beta-lactamases que atuam sobre o anel betalactâmico. A oxacilina é um antibacteriano de espectro reduzido, não tendo efeito sobre bacilos Gram-negativos, mas sendo resistente a beta-lactamase (Bomono e Szabo, 2006; Eggertson, 2007; Schindler 2007; McDonald *et al.*, 2010).

1.3.2 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;

Schindler 2007). Existem vários tipos de cefalosporinas que variam nos radicais R1 e R2 (Figura 5).

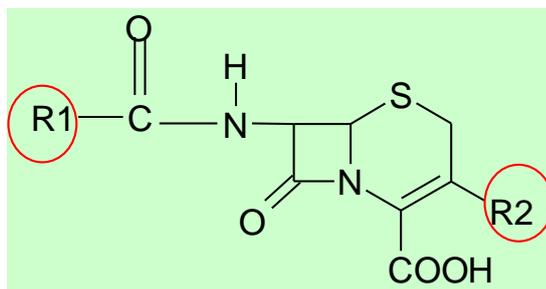


Figura 5: Núcleo base de uma Cefalosporina. R 1 e 2 = posições dos substituintes.

Atualmente as cefalosporinas são divididas em 4 grupos:

Cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxil e cefradina): 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; Alagozlu *et al.*, 2006).

Cefalosporinas de 2ª geração (cefexitina, cefamandol, cefaclor e cefuroxima): resistentes a beta-lactamases, produzidas por bactérias Gram-negativas 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): 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): resistentes a beta-lactamases de enterobactérias e podem agir sobre alguns cocos Gram-positivos e bactérias anaeróbias (Bomono e Szabo 2006).

1.3.3 Carbapenens

Os carbapenens são beta-lactâmicos de amplo espectro, estáveis frente a beta-lactamase (Tabela 1). Estes antibacterianos possuem atividade sobre cocos e bacilos Gram-positivos e negativos, aeróbios e anaeróbios (Zhanel *et al.*, 2007; Meletis G *et al.*, 2010). 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; Dienstmann *et al.*, 2010).

1.3.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (estreptomicina, kanamicina, gentamicina, neomicina, tobramicina, amicacina e metilmicina) são antibacterianos com ação sobre bactérias Gram negativas aeróbias, alguns estafilococos e *M. tuberculosis* (Tabela 1)(Schindler 2007; Severino e Magalhães, 2002; Dienstmann *et al.*, 2010; Nayak-Rao, 2010). O aminoglicosídeo pode ser

ministrado com sinergismo com a penicilina que age sobre a síntese de parede celular,

Tabela 1: Classes de antibacterianos incluindo antibióticos e quimioterápicos (Parte 1).

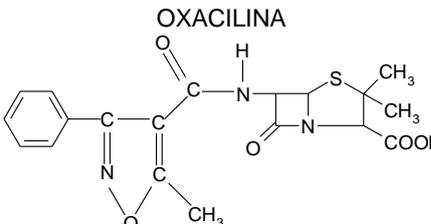
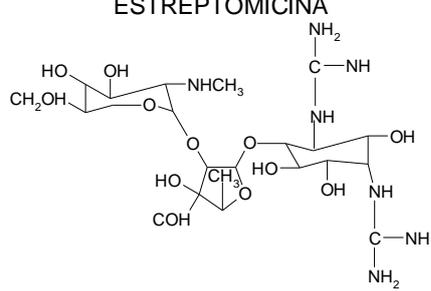
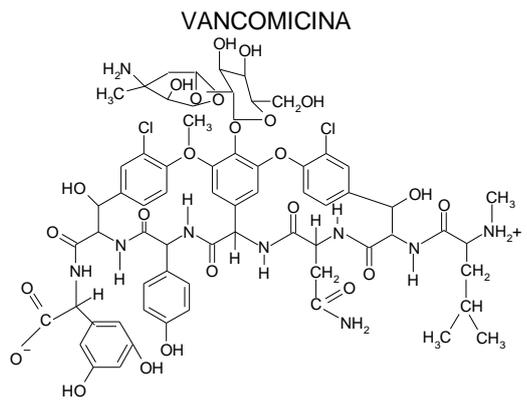
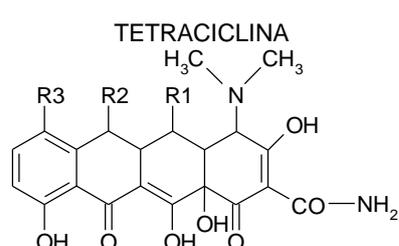
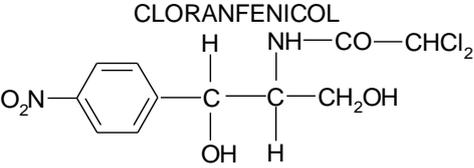
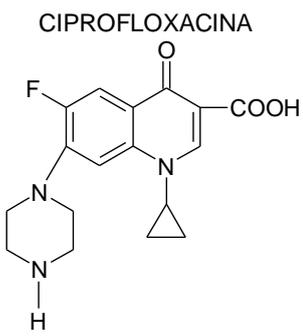
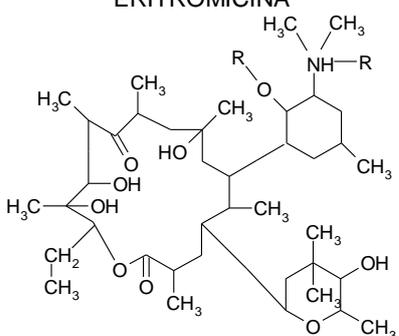
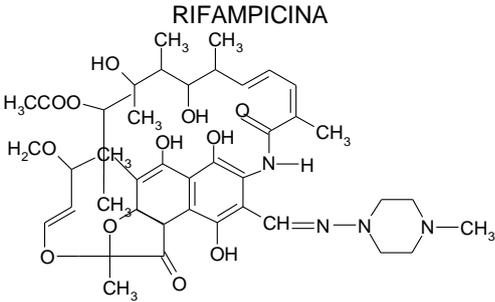
| CLASSE | EXEMPLOS | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| | ESTRUTURA | ANTIBACTERIANO |
| BETA-LACTÂMICOS | <p>OXACILINA</p>  | penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems |
| AMINOGLICOSÍDEO | <p>ESTREPTOMICINA</p>  | amicacina, canamicina, estreptomicinas |
| GLICOPEPTÍDEOS | <p>VANCOMICINA</p>  | teicoplanina e vancomicina |
| TETRACICLINA | <p>TETRACICLINA</p>  | doxiciclina, limeciclina, minociclina |

Tabela 1: Classes de antibacterianos incluindo antibióticos e quimioterápicos (Parte 2)

| CLASSE | EXEMPLOS | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| | ESTRUTURA | ANTIBACTERIANO |
| CLORANFENICOL | <p>CLORANFENICOL</p>  | Cloranfenicol |
| QUINOLONAS | <p>CIPROFLOXACINA</p>  | ciprofloxacina esparfloxacina, levofloxacina, norfloxacina |
| MACROLÍDIOS | <p>ERITROMICINA</p>  | azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina |
| SULFONAMIDAS | <p>SULFADIMIDINA</p>  | sulfonamida, sulfapiridina, sulfametoxazol sulfadimidina |
| RIFAMICINAS | <p>RIFAMPICINA</p>  | rifamicina SV, rifamicina M e rifampicina |

Isso facilita a entrada dos aminoglicosídicos em tratamentos contra estafilococos (Bomono e Szabo 2006; Radigan *et al.*, 2010).

1.3.5 *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* (Tabela 1) (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006; Nettey *et al.*, 2007; Cataldo *et al.*, 2010). 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; Senthil *et al.*, 2010).

1.3.6 *Tetraciclínas*

Essas moléculas são antibacterianos de largo espectro (doxiciclina, limeciclina, minociclina), que apresentam como principal característica a boa difusão para o interior da célula (Tabela 1). 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; Haenni *et al.*, 2010).

1.3.7 – *Cloranfenicol*

Esse antibacteriano de largo espectro é uma das principais drogas utilizadas contra bactérias anaeróbias, sendo o fármaco de primeira escolha

no tratamento da febre tifóide (Tabela 1) (Potrykus *et al.*, 2002). Ele também é indicado no caso de meningite provocada por *H. influenzae* (Smith *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010).

1.3.8 Quinolonas

Esse antibacterianos com principal atividade contra Gram negativos, mas que apresentam um amplo espectro de ação (Tabela 1), e são classificadas como quinolonas de: 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; Cross *et al.*, 2010).

1.3.9 Sulfonamidas

As "sulfas" (Sulfonamida, Sulfapiridina, Sulfametoxazol, dentre outras) possuem de largo espectro de ação, mas com o uso clínico bastante limitado atualmente, devido principalmente, a disponibilidade de fármacos mais eficazes (Tabela 1) (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; Hall 2010).

1.4 Mecanismo de Ação dos Antibacterianos

Os antibacterianos 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 os processos de síntese (parede celular, ácido fólico, DNA, RNA e proteínas) dessas bactérias (Figura 6) (Neu,1992; Nikaido, 2001; Chopra *et al.*, 2002; Pages 2004; Fluhr *et al.*, 2010).

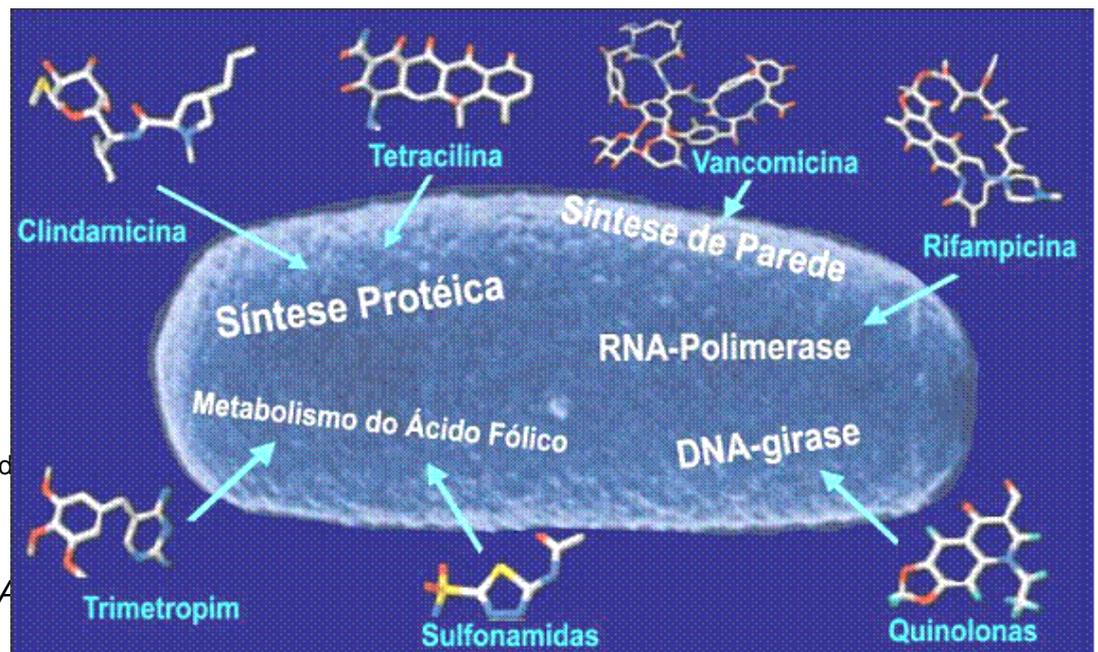


Figura 6: Sítios de ação de antibióticos clínicos.

1.4.1 A A

A composição química da parede celular de bactérias Gram positivas inclui o polipeptideoglicano, carboidratos, ácido teicóico e o ribonucleato de

magnésio (Fluhr *et al.*, 2010). Ambos os processos de síntese e de 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, ocorre um desequilíbrio e a ação de autolisinas destruindo as bactérias (Chopra *et al.*, 2002; McDermott *et al.*, 2003; Harris e Thorarensen, 2004).

Antibacterianos como a penicilina, cefalosporina, fosfomicina, vancomicina, ristocetina e bacitracina inibem a síntese da parede celular competindo pelas enzimas participantes desta síntese ou inibindo-as (Majiduddin *et al.*, 2002; Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Fluhr *et al.*, 2010; Bomono e Szabo, 2006; Cassone *et al.*, 2010) (Figura 7).

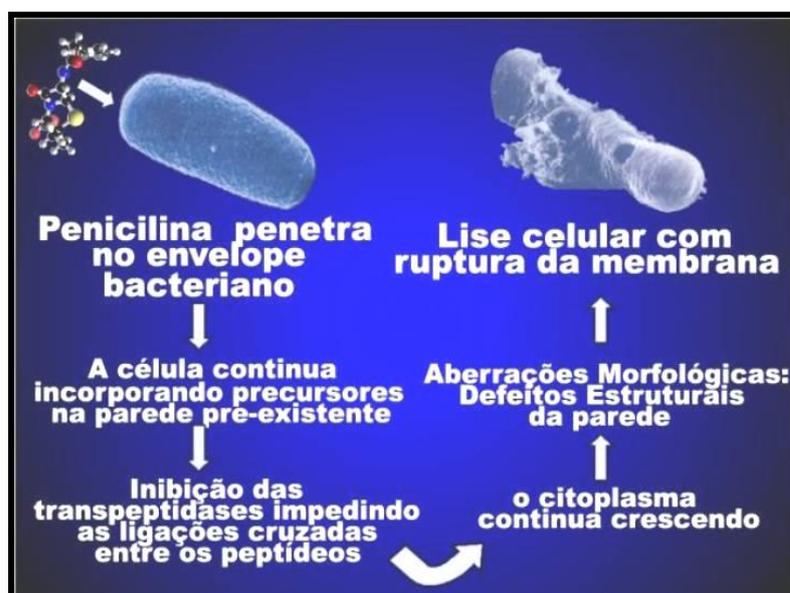


Figura 7: Etapas da ação da penicilina sobre a parede celular.

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 7). A bacitracina, vancomicina e ristomicina atuam ainda na membrana plasmática sendo tóxicas também para as células do hospedeiro (Chopra *et al.*, 2002; Harris e Thorarensen, 2004; Blanchard *et al.*, 2010).

Os antibacterianos beta-lactâmicos (ex: 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 7) (Rolinson, 1998; Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006; Zhanel *et al.*, 2007).

Alguns antibacterianos 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 antibacterianos 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 antibacteriano. O tamanho molecular e a estrutura química do antibacteriano 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 poderiam sobreviver na forma de esferoplasto ou

protoplasto. Essas bactérias não conseguirão se reproduzir enquanto durar a ação do antibacteriano (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; Fluhr *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2010).

1.4.2 A Ação Antibacteriana 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 (Fluhr *et al.*, 2010). Contudo existem proteínas na membrana externa das bactérias Gram-negativas, denominadas porinas, que podem facilitar a passagem de substâncias para o espaço periplasmático (Eumkeb *et al.*, 2010).

Alguns antibacterianos 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 (Nikaido *et al.*, 2001; Griffin *et al.*, 2010).

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; Bomono e Szabo, 2006; Eumkeb *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2010).

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; Cassone *et al.*, 2010).

1.4.3 A Ação Antibacteriana Sobre a Síntese de Proteínas e Metabólitos Bacterianos

Os antibióticos podem atuar sobre diversas etapas da síntese protéica bacteriana (Tabela 2). 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).

Tabela 2: Antibacterianos que agem sobre a síntese protéica.

| Antibacteriano | 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> | 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 procarioto, induzindo a leitura errônea do mRNA. |
| <i>Rifocinas</i> | Ligação irreversível ao RNA-polimerase das bactérias bloqueando a iniciação da cadeia de RNA |

A diferença na estrutura dos ribossomos do hospedeiro e das bactérias é responsável pela toxicidade seletiva desses antibacterianos. Entretanto, a mitocôndria humana também possui ribossomos 70S podendo ser alvo de algumas dessas antibacterianos (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006; Da Silva, 2007; Eumkeb *et al.*, 2010).

A atividade enzimática específica de um microorganismo pode ser inibida também competitivamente por antimetabólitos que são estruturalmente similares ao substrato da enzima, como as sulfonas e o trimetoprim na síntese do ácido fólico (Bomono e Szabo, 2006; Eumkeb *et al.*, 2010).

1.4.4 A Ação Antibacteriana Sobre a Replicação do DNA cromossômico

O DNA cromossômico é formado por duas cadeias de nucleotídeos em espiral onde o superespiralamento é controlado por ação da DNA-girase (topoisomerase II) enquanto a replicação, pela DNA-polimerase (Harris e Thorarensen, 2002). A maioria dos antibacterianos que agem sobre a replicação do DNA não apresenta toxicidade seletiva, afetando as células humanas, como é o caso da mitomicina (Da Silva, 2007). Outros são empregados na terapêutica como griseofulvina, novobiocina e as quinolonas (Bomono e Szabo 2006; Da Silva, 2007).

1.5 A Resistência Bacteriana

1.5.1 Conceitos Gerais

Devido aos diferentes mecanismos de patogenicidade bacteriana, uma infecção pode ser tratada por diversos antibacterianos, devendo ser escolhido aquele ao qual a bactéria apresente sensibilidade (Da Silva, 2007, WHO 2007). Entretanto, a resistência aos antibacterianos tem sido um sério problema para a medicina, desde a implantação da antibioticoterapia nos primórdios da década de 1940 (Bomono e Szabo 2006; Da Silva, 2007; WHO 2007; Judlin *et al.*, 2010).

Os problemas com cepas resistentes vêm se agravando ano após anos, em parte, como conseqüência 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; OBATA *et al.*, 2010).

Em pleno século XXI, esse desafio se mostra ainda mais crítico, face ao crescente aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes e troca de resistência entre as diferentes espécies de bactérias (Ex.: *E. faecalis*, *M. tuberculosis*, *N. gonorrhoeae*, *P. pneumoniae* e *S. aureus*) (Min *et al.*, 2007; Andersson *et al.*, 2010).

Uma bactéria é considerada resistente a um determinado antibacteriano, quando é capaz de crescer, *in vitro*, em concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pelo fármaco no sítio da infecção (Tortora *et al.*, 2005; Trabulsi e Altherthum, 2005; Høiby *et al.*, 2010). Esta resistência é determinada pelo genoma da bactéria, que codifica a expressão de mecanismos bioquímicos capazes de neutralizar os efeitos dos antibacterianos (Da Silva 2007; Obata F *et al.*, 2010).

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 antibacteriano 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 deste 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; Ravat *et al.*, 2010).

As bactérias adotam mecanismos, a fim de sobreviverem à ação letal dos antibacterianos, que incluem a resistência, a tolerância e a persistência (Freitas *et al.*, 1989; Van *et al.*, 1996; Hoiby *et al.*, 2010).

- Na resistência, a bactéria continua proliferando e mantendo a mesma velocidade de crescimento, mesmo ao ser tratada com o antibacteriano (Freitas *et al.*, 1989).

- 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 antibacteriano onde, o sucesso terapêutico somente será alcançado quando a concentração do antibacteriano alcançar o valor da concentração mínima bactericida (CMB), definida como a menor concentração do antibacteriano capaz de matar 99,9% das bactérias presentes (Freitas *et al.*, 1989).

- Na persistência, uma pequena fração da população bacteriana submetida ao tratamento não sofre o efeito bactericida do antibacteriano, independentemente de seu mecanismo de ação (Jacoby 2005; Erson 2005; Rolain e Rault 2005; Ebrahim *et al.*, 2010).

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 recrudesce, face à inexistência das defesas do organismo (Jacoby 2005; Ravat *et al.*, 2010).

1.5.2 Resistência - Origem e Classificação

Quanto à origem, a resistência bacteriana aos antibióticos pode ser classificada como natural ou adquirida (Freitas *et al.*, 1989). A 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 alvo do antibacteriano ou com a presença de estruturas e mecanismos que impede à ação antibacteriana (Murray e Moellering 1978).

Segundo a literatura, a resistência natural a um determinado antibacteriano é uma característica indispensável à autodefesa dos microorganismos produtores de antibióticos, geralmente produzido frente a competição com outras cepas pelo mesmo habitat (Freitas *et al.*, 1989; Brigotti *et al.*, 2010).

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 microrganismos com sensibilidade modificada aos antibacterianos na etiologia das infecções (Freitas 1989; Rolain e Rault, 2005).

A resistência bacteriana adquirida a um ou mais antibacterianos 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 antibacterianos apesar de ativos contra o restante das bactérias presentes (Ravat *et al.*, 2010).

1.5.3 Resistências Simples, Múltipla e Cruzada.

A resistência pode ser denominada como:

a) simples, quando a bactéria resiste à ação de um único antibacteriano;
b) múltipla, quando há simultaneidade de resistência a dois ou mais antibacterianos; e

c) cruzada, quando o mecanismo bioquímico da resistência para um determinado antibacteriano 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 outras moléculas que contenham o anel beta-lactâmico como as cefalosporinas, carbapenems, cefamicinas, oxacefens e monobactams (Rouveix 2007; Wardal *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, em sua grande maioria, os antibacterianos não têm poder mutagênico sobre cepas sensíveis ou resistentes. Entretanto, esses podem selecionar as cepas resistentes já presentes, ao matar as cepas sensíveis. Algumas dessas moléculas 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 enzimas constitutivas, cuja síntese independe da presença do antibacteriano; e b) as enzimas induzidas, em que a sua síntese é desencadeada pela presença da molécula (Clancy *et al.*, 2010).

1.5.4 Mecanismos Bioquímicos da Resistência Bacteriana

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibacterianos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura (Jacoby 2005; Hooper 2005; Bomono e Szabo, 2006; Min *et al.*, 2007; Clancy *et al.*, 2010) (Figura 8). Esses mecanismos incluem (Rouveix 2007):

- a) modificação química do antibacteriano, através de enzimas específicas;
- b) alteração do sítio de ligação do antibacteriano;
- c) substituição do sítio de ligação;
- d) diminuição da permeabilidade ao antibacteriano;
- e) aumento da síntese de substrato com o qual o fármaco compete;

- f) efluxo do antibacteriano, por intermédio de transporte ativo.
- g) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos.

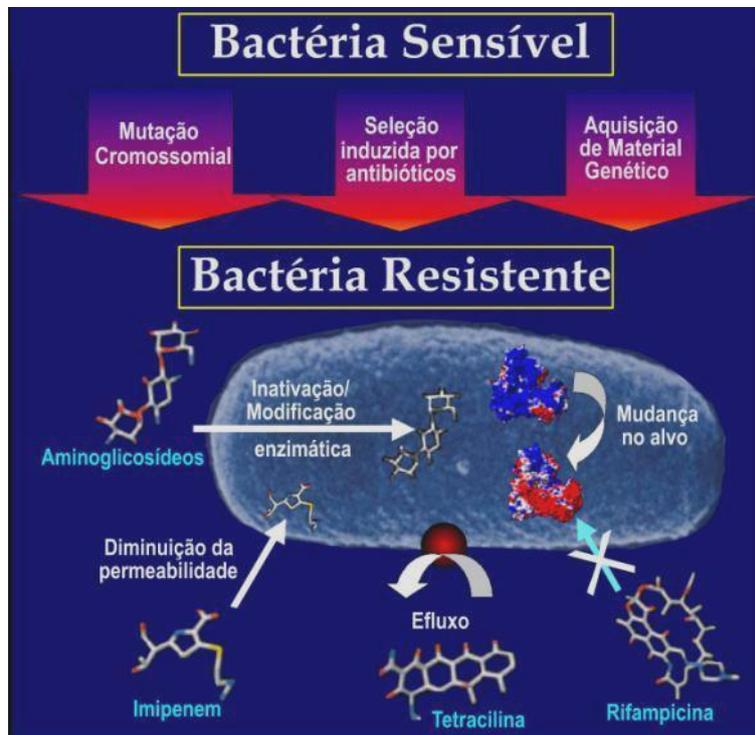


Figura 8: Principais mecanismos envolvidos no processo de geração de bactérias resistentes.

Esses mecanismos podem coexistir em uma mesma cepa bacteriana que, ainda pode desenvolver resistência cruzada contra distintos antibacterianos (Gold e Moellering 1996; Chopra *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2007). 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 antibacteriano. O uso inadequado de antibacterianos e a sobrevivência de bactérias em indivíduos imunossuprimidos aumentam a exposição das bactérias a esses antibacterianos, 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 antibacterianos. Estas cepas se multiplicam, podendo

passar os seus genes de resistência através de diferentes mecanismos genéticos de aquisição (Chumpolkulwong *et al.*, 2004; Fluit e Schmitz 2004).

1.5.5 Mecanismos Genéticos de Transferência da Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana adquirida aos antibacterianos é desenvolvida por meio de mecanismos genético-bioquímicos, incluindo a mutação, a transdução, a transformação, a conjugação e a transposição (Min *et al.*, 2007).

1.5.5.1 Mutação

A mutação é um fenômeno decorrente do 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 (1 mutante a cada 100.000.000 células), resultando na modificação das características genéticas da bactéria, que pode adquirir resistência aos antibacterianos. Neste tipo de fenômeno, a resistência é adquirida apenas para um tipo de antibacteriano, sendo a bactéria mutante selecionada pela ação do próprio antibacteriano. Esse mecanismo gera a resistência simples a um único antibacteriano (Fluit e Schmitz 2004).

1.5.5.2 Transformação

Esse mecanismo consiste na captação, por uma bactéria receptora, do DNA proveniente do cromossomo ou plasmídeo liberado pela bactéria doadora. Em condições naturais, a transformação acontece quando a

bactéria doadora sofre uma lise e o seu DNA é captado pela bactéria receptora (Jacoby 2005; Erson 2005; Rolain e Rault 2005). A transformação, entretanto, é um mecanismo de pouca importância clínica e de 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 2005).

1.5.5.3 Transdução

Esse mecanismo é restrito a bactérias da mesma espécie e, permite a transferência de genes da resistência de uma bactéria para outra, sendo mediado por bacteriófagos (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; Seputiene *et al.*, 2010).

A transdução por plasmídeo é o principal mecanismo de aquisição de resistência dos estafilococos, podendo a resistência ser simples, quando o plasmídeo apresenta apenas um gene determinante desta característica (Ex.:

contra a penicilina G); ou múltipla, se o plasmídeo carregar 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; Seputiene *et al.*, 2010).

1.5.5.4 Conjugação

Esse mecanismo de transferência de uma bactéria viável para outra é 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; Clancy 2010).

1.5.5.5 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 (Seputiene *et al.*, 2010). 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; Wardal *et al.*, 2010).

1.6 A Resistência Bacteriana Atualmente

Segundo a literatura, a evolução das cepas de bactérias resistentes e multirresistentes tem sido rápida e preocupante (WHO, 2010). 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).

Em 2002, a existência de uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina, um dos antibacterianos clínicos utilizados atualmente, foi descrita nos Estados Unidos (MRSA –meticillin resistant *S. aureus*) (Srinivasan *et al.*, 2002). Esta resistência ocorre ainda hoje pelo processo de conjugação, em que na época houve ainda a troca de genes com uma cepa de *Enterococcus*

resistente ao glicopeptídeo vancomicina (VRE – Vancomycin Resistant *Enterococcus*) dando origem a uma cepa multirresistente à meticilina e à vancomicina (MuRSA – Multirresistant *S. aureus*) (Srinivasan et al., 2002; Rouveix, 2007) e de forma ainda mais crítica, a uma cepa de *Enterococcus* dependentes da vancomicina (VDE – Vancomycin Dependent *Enterococcus*) (Srinivasan et al., 2002; Min et al., 2007; Clancy 2010).

Apesar da grande diversidade de estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação dos antibacterianos, o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes tem sido cada vez mais difícil (Nettey et al., 2007; Wardal et al., 2010). Não há, atualmente, um único antibacteriano em uso clínico, contra o qual não exista, pelo menos, uma cepa a ele resistente. Desta forma, o sucesso no combate às infecções bacterianas e o controle sobre o aparecimento de bactérias resistentes é dependente do emprego criterioso dos antibacterianos e da descoberta de novas moléculas que possam ser disponibilizadas para uso em hospitais e na comunidade, o que tem levado de 10 a 15 anos para ocorrer (Erson 2005; Rolain e Rault 2005; Seputiene et al., 2010; Clancy et al., 2010).

1.6.1 Multirresistência: KPC, NDM e XDR

As beta-lactamases fazem parte de um grupo heterogêneo de enzimas que conferem resistência aos antibacterianos beta-lactâmicos. Mais de 700 tipos distintos de beta-lactamases já foram descritos não só com a capacidade de hidrolizar o anel beta-lactâmico dos antibacterianos, mas também de inativar os inibidores de penicilinas (Dienstmann et al., 2010).

Os Carbapenens são antibacterianos de escolha para tratamento de infecções causadas por cepas Gram negativas multirresistentes, especialmente as produtoras de β -lactamases espectro estendido (ESBLs) e/ou cepas produtoras de beta-lactamases cromossômicas (AmpC) (Thomas *et al.*, 2009).

Vários são os mecanismos de resistência que podem impedir a ação dos carbapenens. A resistência surge, ocasionalmente, da combinação de impermeabilidade da membrana com ação das AmpCs ou ESBLs (Thomas *et al.*, 2009).

A carbapenemase é uma enzima produzida por um grupo de enterobactérias (KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e que confere resistência aos carbapenens, uma vez que tais enzimas degradam o anel carbapenêmico existente nestes antibacterianos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Meletis *et al.*, 2010).

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* foram recentemente incluídas no pool de patógenos nosocomiais multirresistentes capazes de produzir tais enzimas. Sete variantes do gene bla_{KPC} (KPC1-KPC7), são capazes de codificar a produção da enzima KPC sendo esses genes encontrados no plasmídeo bacteriano e detectados em diferentes espécies de enterobactérias (Mônica *et al.*, 2009).

Cepas de KPCs já foram encontradas nos Estados Unidos, Israel, China, Europa e mais recentemente no Brasil. Cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPCs), têm sido identificadas em pacientes com um longo período de internação hospitalar, que passaram por terapia

com utilização de múltiplas drogas antibacterianas e que, na maioria dos casos, são provenientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Tais cepas podem colonizar os tratos urinário, digestivo e respiratório, além de ocasionarem infecções com um alto índice de mortalidade (Dienstmann *et al.*, 2010).

Várias outras enzimas estão envolvidas no mecanismo de resistência desenvolvida pelas Enterobactérias, dentre elas, a Oxa-48, que faz parte de uma classe de carbapenemases principalmente encontradas em *K. pneumoniae*. A classe B de carbapenemases, as metallo- β -lactamases (MBLs), são encontradas principalmente em *Pseudomonas aeruginosa* e também podem ser isoladas de cepas de *K. pneumoniae* (Yong *et al.*, 2009).

Ultimamente, tem sido reportado na literatura um novo subgrupo de MBL, designada Nova Delhi Metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1), originária de Nova Delhi Índia. A NDM-1 é uma enzima codificada pelo gene bla_{NDM-1} isolado de cepas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* que confere resistência ao beta-lactâmicos com exceção do aztreonam (um monobactâmico) (Yong *et al.*, 2009).

A multirresistência não está restrita apenas as Enterobactérias, visto que no continente Europeu, entre os anos de 2000 e 2004, surgiram cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogas-resistentes, com resistência a rifampicina e isoniazida, o que dificulta o tratamento da tuberculose, ficando restrito praticamente ao uso de fluoroquinolonas (Seputiene *et al.*, 2010).

Em 2006, através de falhas terapêuticas e por pressão seletiva, surgiram as primeiras cepas com ampla resistência aos antibacterianos, as

XDR (*Extensively drug-resistant*). Essas eram resistentes a isoniazida, rifampicina e as fluoroquinolonas, agravando ainda mais o cenário mundial de controle da tuberculose, revelando a urgência de se encontrar novas fontes de antibacterianos e novas moléculas ativas não só para o tratamento dessa mas de outras infecções causadas por bactérias multiresistentes (Murase *et al.*, 2010; Seputiene *et al.*, 2010).

1.7 Fontes de Novos Protótipos a Antibacterianos

A busca por novos antibacterianos pode permitir uma melhoria no tratamento de infecções por organismos patogênicos resistentes a moléculas convencionais, onde atualmente estas cepas estão sendo debilmente controladas por poucos antibacterianos, contra os quais pode, rapidamente, surgir um processo de resistência. Com isto, novas fontes para a descoberta de protótipos de antibacterianos, sejam esses de origem vegetal ou animal ou sintética, são de grande interesse para a comunidade mundial (WHO, 2010).

1.7.1 Linezolida

A Linezolida (Zyvoxid) é um antibacteriano recente de escolha médica para o tratamento de infecções associadas a *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina e infecções hospitalares causadas por *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) (Figura 9). Entretanto, a toxicidade e casos emergentes de resistência, prolongam o tratamento, podendo torná-lo ineficaz (Lohray *et al.*, 2004).

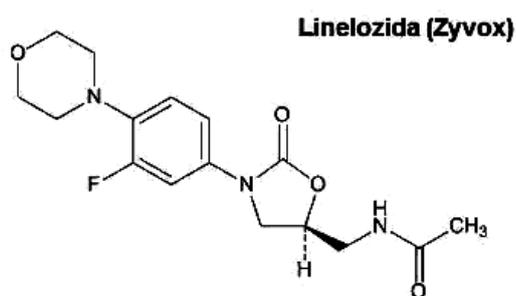


Figura 9: Estrutura do Linezolida.

Recentes descobertas revelam que a fusão do linezolid com o anel tienopiridina origina derivados que apresentam atividade semelhante ao Linezolida contra *S. aureus in vitro* sendo moléculas em potencial para o estudo antibacteriano (Lohray *et al.*, 2004; Caminero *et al.*, 2010). Isso aponta esses sistemas cíclicos como novas opções para a criação de novas moléculas ativas.

1.7.2 Sistemas Tienopiridina e Pirazolopiridina

A literatura sobre derivados tienopiridina (Figura 10) descreve diferentes atividades biológicas incluindo ação 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 Linezolida que mostraram atividades antibacterianas contra *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. 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 (Figura 10), alguns artigos da literatura, que tratam da química e das aplicações biológicas do sistema, descrevem diversas atividades como inibidor da Xantina Oxidase (Yu *et al.*, 2001; Seputiene *et al.*, 2010) e na quimioterapia de alguns tumores (Bare *et al.*, 1989). Outros derivados deste sistema 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 tieno-piridinas e pirazolo-piridinas, tendo gerado moléculas com diferentes atividades incluindo a ação antiparasitária (De Mello 1999; Schenone *et al.*, 2001).

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 (Zervosen *et al.*, 2002; De Mello *et al.*, 2004). Estes resultados denotam o potencial promissor destas séries a ser verificado também para atividade antibacteriana.

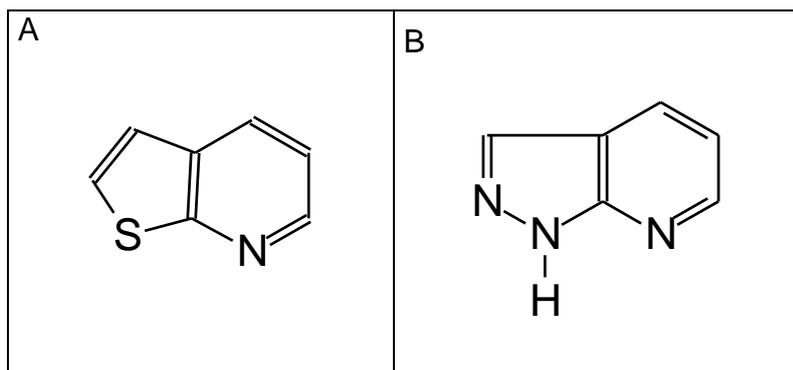


Figura 10: Sistemas heterocíclicos tienopiridina (A) e pirazolopiridina (B).

1.7.3 Triazóis

Os triazóis são heterociclos aromáticos (Figura 11), de origem sintética e que tem despertado muito interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações, incluindo agroquímicos e fármacos (Cuenca-Estrella 2010).

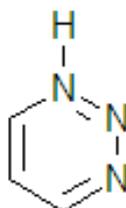


Figura 11: Estrutura do triazol

Como fármaco, a nova classe triazólica, tem sido descrita como potente agente antifúngico, indicado no tratamento de Infecções fúngicas cutâneas, com amplo espectro de ação, incluindo espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (Cuenca-Estrella 2010).

Os derivados triazólicos são ativos contra *Candida albicans*, mas cepas de *Candida krusei* e *Candida glabrata* são menos sensíveis. Os triazóis agem inibindo com especificidade a biossíntese do ergosterol, um componente da membrana celular dos fungos, que exerce funções semelhantes às do colesterol em células animais (Cuenca-Estrella 2010).

Derivados ácidos de triazóis, que mantêm o grupamento ácido carboxílico, têm sido testados como antibacterianos uma vez que apresentam similaridades estruturais com antibacterianos de uso clínico como as Fluoroquinolonas (Cuenca-Estrella 2010).

Os triazóis agem sobre isoenzimas do complexo citocromo P-450 e o resultado é um potencial aumentado dos níveis plasmáticos de outros fármacos, facilitando a aparição de efeitos adversos.

1.7.4 Chalconas

As chalconas (Figura 12) são moléculas de grande interesse químico e farmacológico por apresentarem diversas atividades biológicas. Estruturas atuam em alvos específicos, como enzimas ou mediadores químicos, afetando processos inflamatórios, com a inibição da produção de óxido nítrico (NO) e PGE₂ (prostaglandina E₂), principalmente em macrófagos. Isso afeta a expressão das enzimas induzíveis envolvidas, podendo ser uma importante estratégia para obtenção de agentes antiinflamatórios (Kim *et al.*, 2010).

O grupo do Prof. Ricardo Nunes da Universidade Santa Catarina tem sintetizado derivados chalconicos com o objetivo de identificar um núcleo base no qual modificações moleculares possam ser realizadas, levando a um

melhoramento da estrutura e da função antibacterianas, gerando futuros protótipos que possam contribuir para o tratamento de infecções causadas por cepas multiresistentes.

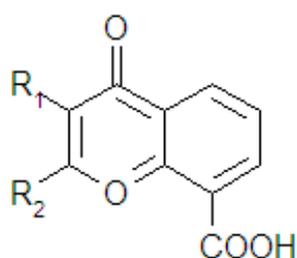


Figura 12: Estrutura molecular da chalcona

1.7.5 Lapachonas

As quinonas têm sido estudadas e se mostraram atuantes contra diversos quadros patológicos incluindo: tumor, inflamação, e infecções por fungos e parasitas (Da Silva et al., 2010).

A literatura indica que o perfil biológico observado para estas moléculas está centrado em seu núcleo orto e para quinóide. Este grupo geralmente aceita um ou/e dois elétrons (ciclo redox) para formar o radical anion ou dianion correspondente *in situ*. Assim o radical semiquinona acelera a hipóxia intracelular dos microorganismos pela produção dos superanions (Da Silva et al., 2010).

Devido a este mecanismo, as quinonas podem apresentar uma elevada citotoxicidade contra as células do hospedeiro, possivelmente por

afetar as topoisomerasas, um grupo de enzimas necessárias para a replicação do DNA nas células (Da Silva et al., 2010).

A β -lapachona (1,2-naftoquinona) (Figura 13), isolada da *Tabebuia sp*, é uma naftoquinona que possui uma variedade de efeitos farmacológicos incluindo o efeito antibacteriano (Da Silva et al., 2010).

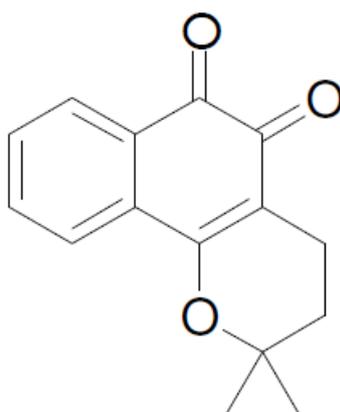


Figura 13: Estrutura molecular da β -lapachona

O laboratório do Professor Vitor Ferreira Francisco do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, têm como objetivo manter a atividade antibacteriana já reconhecida desta molécula, porém tentando diminuir sua toxicidade celular. Contudo os últimos intentos não foram promissores sugerindo que a modificação molecular compromete a função biológica da molécula sintetizada (Ferreira, Comunicação Pessoal).

1.8 Os Antibacterianos e a Nanotecnologia

A maioria dos antibacterianos de uso clínico apresentam ação dose-dependente e, quando estão livres na circulação, são rapidamente filtrados pelo sistema renal, o que diminui sua concentração ativa (Ranjan *et al.*, 2009). Assim sendo, isso faz necessário o uso de dosagens mais elevadas devido ao qual grande parte dos antibacterianos, principalmente os quimioterápicos, apresentam efeitos tóxicos (Brown *et al.*, 2010).

Nanopartículas contendo antibacterianos, como aminoglicosídeos, tem melhorado a eficiência da entrada de antibacterianos em células infectadas por bactérias, visto que o controle da liberação de fármacos permite a otimização da dosagem das substâncias e consequente redução de efeitos colaterais (Ranjan *et al.*, 2009).

A nanotecnologia tem sido uma área de intensa pesquisa nos últimos dez anos, apresentando como um dos seus objetivos a otimização do efeito dos fármacos, para isso ocorre se faz necessária a utilização de vetores onde se incluem as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (Kamyar *et al.*, 2010).

As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento. As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais

diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. (Figuras 14)

(Kamyar *et al.*, 2010)

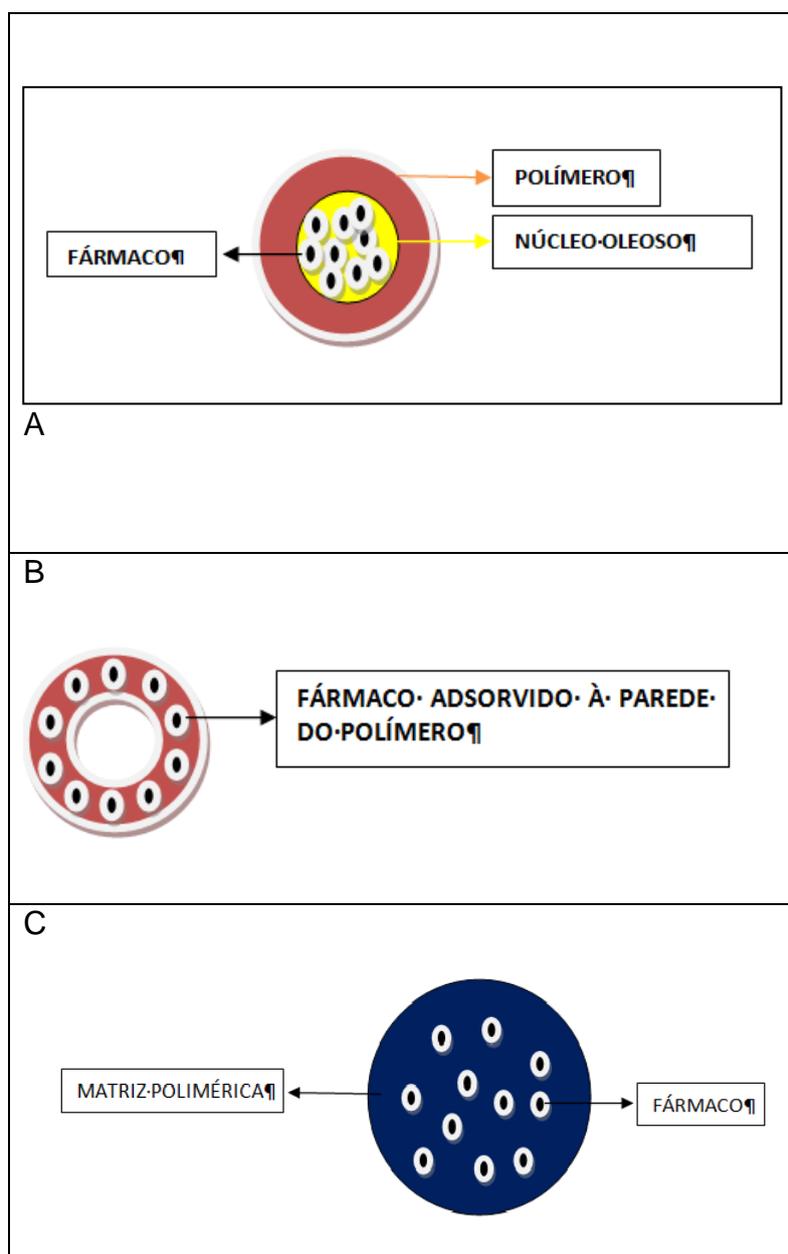


Figura 14: O fármaco e a nanopartículas. A) dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; B) adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas e c) adsorvido na matriz polimérica das nanoesferas.

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste

núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Van *et al.*, 2010)

Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de antibióticos, principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico (Kalpana *et al.*, 2010).

Com relação à administração oral de nanopartículas, as pesquisas têm sido direcionadas para a diminuição dos efeitos colaterais destacando-se os antiinflamatórios não-esteróides (diclofenaco, indometacina), os quais causam freqüentemente irritação à mucosa gastrintestinal e para a proteção de fármacos degradáveis ao longo do trato gastrintestinal (peptídeos, proteínas e/ou hormônios), aumentando a biodisponibilidade dos mesmos (Van *et al.*, 2010).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formados, tais como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico obtidos como suspensões coloidais aquosas (Kannan 2010).

A liberação dos fármacos a partir de sistemas nanoparticulados poliméricos depende de diferentes fatores incluindo a desorção do fármaco da superfície das partículas; a difusão do fármaco através da matriz das nanoesferas e através da parede polimérica das nanocápsulas; a erosão da matriz polimérica ou a combinação dos processos de difusão e erosão (Van *et al.*, 2010).

A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho de partícula, a distribuição de massa molar do polímero, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento. As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas (Kalpana *et al.*, 2010).

Nanopartículas com baixa afinidade as proteínas que promovem a passagem para os glomérulos renais possibilitam que, em pequenas doses, os antibacterianos possam ficar por mais tempo na corrente sanguínea (Ranjan *et al.*, 2009). Alguns antibióticos como a Vacomicina podem acumular-se no tecido renal e, em grandes concentrações, ocasionar a falência renal o que esta técnica pode auxiliar na administração e uso do mesmo (Kupstaite *et al.*, 2010).

Um outro problema encontrado com a utilização dos antibacterianos de uso clínico é que estes podem sofrer metabolismo dentro do organismo humano, desta maneira ocasionando menor eficiência e o aumento da

dosagem com consequentes efeitos tóxicos. Aminoglicosídeos nanoparticulados não sofrem degradação metabólica e são mantidos de forma estável por tempo prolongado dentro do organismo humano (Ranjan *et al.*, 2009).

A possibilidade de utilização de técnicas de nanotecnologia para nanoparticular novas moléculas antibacterianas no intuito de diminuir sua dosagem e conseqüentemente, diminuir possíveis efeitos tóxicos otimizando sua atividade é uma realidade que pode e deve ser considerada para melhoria de tratamento das infecções causadas por bactérias multirresistentes.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar o perfil antibacteriano contra cepas hospitalares sensíveis, resistentes e multirresistentes em 243 moléculas de origem sintética derivados de diferentes sistemas cíclicos e funções para atuarem como futuros protótipos a quimioterápicos com posterior nanoparticulação para redução de possíveis efeitos colaterais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinação e comparação do perfil antibacteriano inicial (*screening*) frente a cepas sensíveis, resistentes e multiresistentes Gram-positivas e Gram-negativas, isoladas de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) incluindo:

- 26 derivados sintéticos do sistema Pirazolopiridina.
- 41 derivados sintéticos do sistema Tienopiridina.
- 60 derivados sintéticos do sistema Hidrazonas.
- 42 derivados sintéticos do sistema Quinolonas.
- 68 derivados sintéticos do sistema Chalconas.
- 6 derivados sintéticos do sistema Lapachona.

- Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (MICs) para os derivados ativos dos sistemas Pirazolopiridina, Tienopiridina, Hidrazonas, Quinolonas e Chalconas que apresentarem perfil antibacteriano significativo segundo padronização do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) frente as cepas analisadas.

- Comparação dos valores e resultados encontrados para os derivados sintéticos ativos com os antibacterianos utilizados comercialmente para avaliação do potencial como protótipo para o desenho de novos antibacterianos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bactérias e Condições de Crescimento.

Os testes microbiológicos foram realizados com cepas clínicas de bactérias Gram -positivas e Gram-negativas fornecidas pelo Hospital Antônio Pedro (HUAP) a partir da coleta dos pacientes. As cepas foram identificadas pelos métodos microbiológicos e bioquímicos tradicionais, com exceção das cepas *Staphylococcus aureus* 2592 e *Escherichia coli* 314 que são cepas de referência (ATCC).

No estudo dos derivados foram utilizadas 14 cepas dentre as bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* 8501, *Staphylococcus aureus* 8148, *Staphylococcus aureus* 8380, *Staphylococcus epidermidis* 201, *Staphylococcus epidermidis* 8126, *Staphylococcus aureus* ATCC) e Gram-negativas (*Serratia marscescens* 204, *Proteus mirabilis* 464, *Pseudomonas aeruginosa* 36408, *Enterobacter cloacae* 6964, *Acinetobacter calcoaceticus* 2801, *Klebsiella pneumoniae* 6891, *Escherichia coli* 635, *Escherichia coli* 3657) (Anexo 1).

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,). O controle biológico assim como condições de crescimento seguem padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

3.2 Preparação das Soluções-Estoques dos Materiais.

3.2.1 Sistemas Tienopiridina e Pirazolopiridina.

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

3.2.2 Hidrazonas

As soluções-estoque (5mg/mL) dos 60 derivados sintetizados pelo grupo de pesquisa do Professor Ricardo Nunes do Laboratório Estrutura e Atividade, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Incluindo 54 compostos da série F e 6 da série K, que foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) obtido da Merk (Darmstad, Germany).

3.2.3 Chalconas

As soluções-estoque (5mg/mL) dos 68 derivados de chalconas sintetizados pelo grupo de pesquisa do Professor Ricardo Nunes do Laboratório Estrutura e Atividade de Florianópolis-SC, Departamento de

Química, Universidade Federal de Santa Catarina, séries (J, A e N), preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) obtido da Merk (Darmstad, Germany).

3.2.4 Quinolonas

As soluções-estoque (5mg/mL) dos 42 derivados de quinolonas Dr^a. Maria Cecília do Instituto de Química-UFF, foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) obtido da Merk (Darmstad, Germany).

3.2.5 Lapachonas

As soluções-estoque (5mg/mL) dos 6 derivados de Lapachonas sintetizados pelo grupo do Professor Vitor Ferreira do Instituto de Química-UFF, foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO) obtido da Merk (Darmstad, Germany).

3.3 Antibiograma Qualitativo - Teste De Difusão Em Disco (TSA).

3.3.1 Preparação dos Discos de Papel

Discos de papel Whatman nº1 (5mm de diâmetro) contendo 5mg/ml da solução estoque dos compostos testados foram colocados sobre o meio de Mueller Hinton (sólido), em placa previamente inoculada com as bactérias, para realização dos ensaios.

3.3.2 Controles experimentais

Antibacterianos de uso clínicos (ciprofloxacina, vancomicina, oxacilina, penicilina G, ampicilina e cloranfenicol), foram utilizados como controles positivos enquanto água destilada e DMSO foram utilizados como controles negativos em condições idênticas as dos compostos testados.

3.3.3 Teste de Difusão em Discos (TSA)

Uma cultura bacteriana com 5 horas de crescimento à 37°C ($1,0 \times 10^9$ 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, os discos foram depositados sobre as placas que foram incubadas à 37°C por 24 horas (Figura 15).

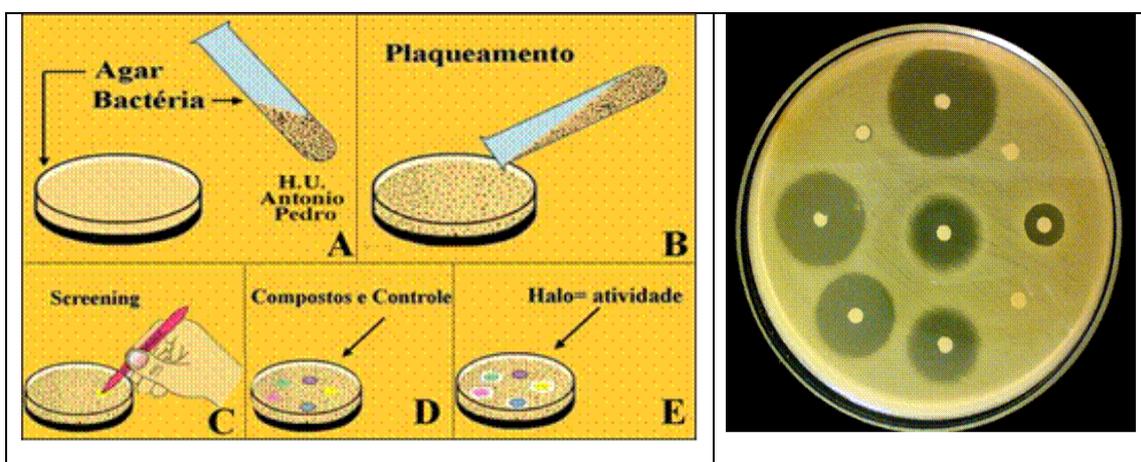


Figura 15: Teste de difusão em discos com as etapas de realização do teste (esquerda) e a placa contendo resultado positivo de antibacterianos distintos com halos de inibição (direita).

A sensibilidade foi determinada através da medida do diâmetro do halo de inibição de crescimento, em ensaios repetidos no mínimo três vezes, onde halos maiores ou iguais a 14mm foram considerados halos de inibição significativos, de acordo com o protocolo estabelecido pelo seguem padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

3.4 Antibiograma Quantitativo Para A Determinação Da Concentração Inibitória Mínima (MIC).

O MIC foi determinado através da técnica de macrodiluição utilizando três séries. O primeiro tubo de cada série continha 1mL de meio sem o inoculo contendo ainda o derivado a ser testado; 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, foi colocado em cada tubo e o ensaio conduzido como descrito por Oliveira *et al.*, 2001. Após 24 horas de incubação à 37°C, o MIC foi definido como a menor concentração da droga que inibe o crescimento visível da cultura (Figura 16).

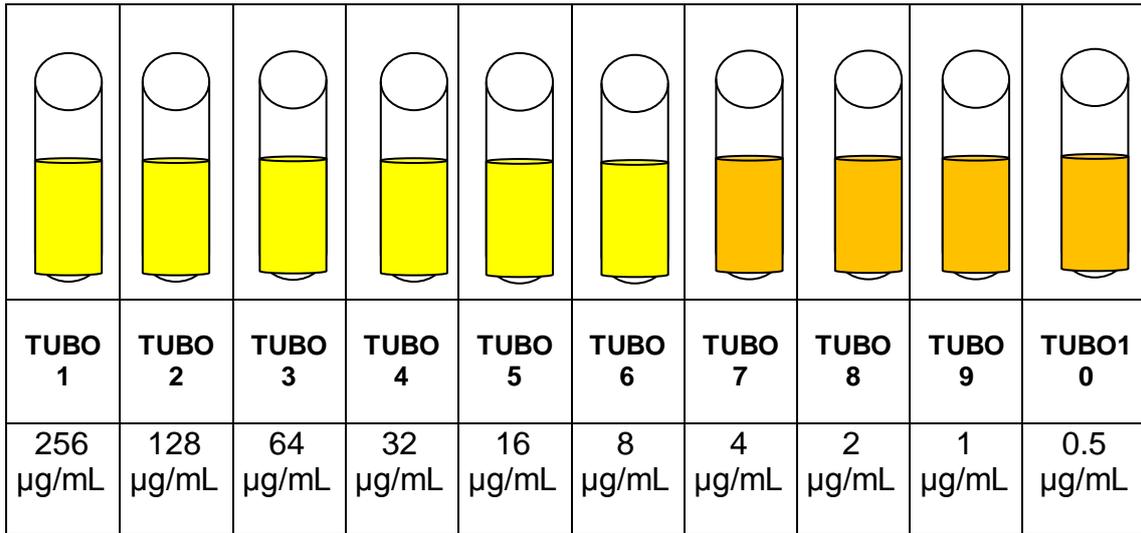


Figura 16: Representação do ensaio de Antibiograma quantitativo por macrodiluição, mostrando crescimento bacteriano a partir do quinto tubo de diluição e a determinação 8 $\mu\text{g/mL}$ como MIC.

Para a determinação do MIC dos derivados testados, foram usadas concentrações iniciais de 1024 e 256 $\mu\text{g/mL}$. Os controles usados no experimento incluíram o meio puro, o meio com DMSO, o meio com o inóculo e pelo menos um antibacteriano padrão.

4. RESULTADOS

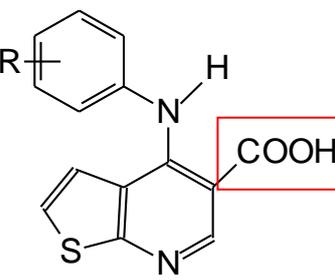
4.1 Teste de Sensibilidade em Disco (TSA)

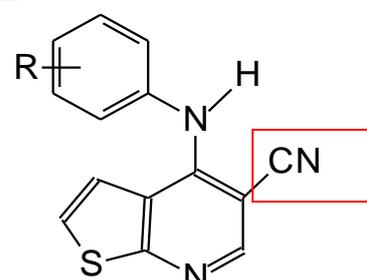
4.1.1 Derivados do Sistema Tienopiridina

Os derivados testados produzidos pelo grupo da Professora Alice Bernardino do Instituto de Química da UFF estão representados na Figura 17. Pode-se observar a presença da carboxila ligada ao sistema heterociclo na série A, nos quais os derivados apresentam diferentes substituintes (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H) nas posições *meta* ou *para* em R.

De forma similar, a série B dos derivados tienopiridinicos apresenta o mesmo núcleo base com substituição da carboxila por uma carbonitrila, contendo ainda os mesmos substituintes (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H) nas posições *meta* ou *para* em R. A terceira série (C) apresenta substituição da carbonitrila por um imidazol e os seus derivados foram gerados de acordo com os substituintes (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H) nas posições *meta* ou *para* em R.

A análise do perfil de antibacteriano inicial utilizando o TSA mostrou resultados negativos, no qual nenhum dos 41 derivados testados apresentou formação de halo de inibição (Halos = 0 mm) contra as 14 cepas hospitalares Gram-positivas ou Gram-negativas mantidas em nosso laboratório. Os controles (Vancomicina e Ciprofloxacina) apresentaram halos entre 16 mm e 32 mm (Figura 17).

| A | | Derivados - R e os Halos frente a 14 Cepas Gram-positivas ou negativas |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|  | 101 - H | Halos = 0 mm |
| | 103 - <i>m</i> -CH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 104 - <i>p</i> -CH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 106 - <i>m</i> -OCH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 107 - <i>p</i> -OCH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 109 - <i>m</i> -NO ₂ | Halos = 0 mm |
| | 110 - <i>p</i> -NO ₂ | Halos = 0 mm |
| | 112 - <i>m</i> -F | Halos = 0 mm |
| | 113 - <i>p</i> -F | Halos = 0 mm |
| | 115 - <i>m</i> -Cl | Halos = 0 mm |
| | 116 - <i>p</i> -Cl | Halos = 0 mm |
| | 118 - <i>m</i> -Br | Halos = 0 mm |
| | 119 - <i>p</i> -Br | Halos = 0 mm |

| B | | Derivados - R e os Halos frente a 14 Cepas Gram-positivas ou negativas |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|  | 201 - H | Halos = 0 mm |
| | 203 - <i>m</i> -CH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 204 - <i>p</i> -CH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 206 - <i>m</i> -OCH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 207 - <i>p</i> -OCH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 209 - <i>m</i> -NO ₂ | Halos = 0 mm |
| | 210 - <i>p</i> -NO ₂ | Halos = 0 mm |
| | 212 - <i>m</i> -F | Halos = 0 mm |
| | 213 - <i>p</i> -F | Halos = 0 mm |
| | 215 - <i>m</i> -Cl | Halos = 0 mm |
| | 216 - <i>p</i> -Cl | Halos = 0 mm |
| | 218 - <i>m</i> -Br | Halos = 0 mm |
| | 219 - <i>p</i> -Br | Halos = 0 mm |

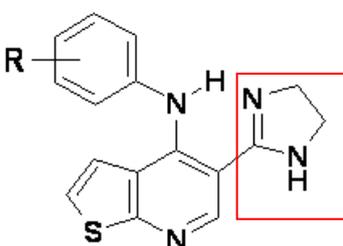
| C | | Derivados - R e os Halos frente a 14 Cepas Gram-positivas ou negativas |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|  | 601 - H | Halos = 0 mm |
| | 603 - <i>m</i> -CH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 604 - <i>p</i> -CH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 606 - <i>m</i> -OCH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 607 - <i>p</i> -OCH ₃ | Halos = 0 mm |
| | 609 - <i>m</i> -NO ₂ | Halos = 0 mm |
| | 610 - <i>p</i> -NO ₂ | Halos = 0 mm |
| | 612 - <i>m</i> -F | Halos = 0 mm |
| | 613 - <i>p</i> -F | Halos = 0 mm |
| | 615 - <i>m</i> -Cl | Halos = 0 mm |
| | 616 - <i>p</i> -Cl | Halos = 0 mm |
| | 618 - <i>m</i> -Br | Halos = 0 mm |
| | 619 - <i>p</i> -Br | Halos = 0 mm |

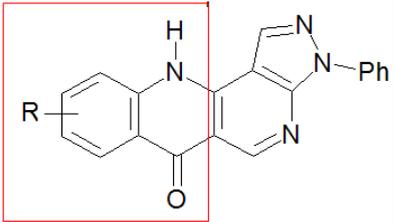
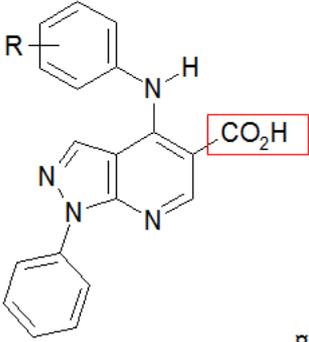
Figura 17: Estrutura das Tienopiridinas e resultados do Teste de Sensibilidade em Disco. O núcleo base contendo a carboxila forma a série A, carbonitrila a série B ou imidazol a série C. Os antibacterianos controles (Vancomicina e Ciprofloxacina) apresentaram halos entre 16 mm e 32 mm.

4.1.1 Derivados do Sistema Pirazolopiridina

Os derivados deste sistema foram sintetizados pelo grupo da Prof. Alice Bernardino mantendo uma rigidez conformacional nas moléculas da série A, variando-se os substituintes (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H) nas posições *meta* ou *para* em R (Figura 18). A série B de derivados foi sintetizada com a presença de uma carboxila e com liberdade conformacional, variando-se os substituintes (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H) nas posições *meta* ou *para* em R (Figura 18).

Das 26 moléculas testadas, apenas os derivados da segunda série do sistema Pirazolopiridina com substituintes na posição *meta* apresentaram atividade incluindo o AM19 com o substituinte CH₃ (Halo = 16 mm); AM22 com o substituinte OCH₃ (Halo= 15mm); AM25 com o substituinte Cl (Halo = 17 mm); AM54 com o substituinte F (Halo = 20 mm) e AM63 com o substituinte Br (Halo = 17 mm), apresentaram resultado significativo (Halo ≥ 14mm) frente as cepas de *S. epidermidis* 201 e 8126 produtoras de β-lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina (Figura 18). A única exceção foi o derivado AM29 com grupo nitro cujo substituinte apesar de na posição *meta* (m-NO₂) não apresentou atividade (Figura 18).

Os testes de sensibilidade mostraram um halo de 16 mm para o controle (Vancomicina) frente a cepas de *S.epidermidis* 201 e 8126 (Figura 18) enquanto as demais cepas apresentaram halos entre 16mm e 32 mm para os controles utilizados neste ensaio (Vancomicina e Ciprofloxacina).

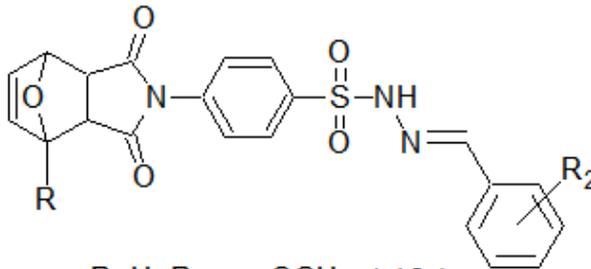
| <p>A</p>  | <p>Derivados - R e os Halos frente a 14 Cepas Gram-positivas ou negativas</p> <p>20 - H Halos = 0 mm 23 - <i>m</i>-CH₃ Halos = 0 mm 24 - <i>p</i>-CH₃ Halos = 0 mm 26 - <i>m</i>-OCH₃ Halos = 0 mm 27 - <i>p</i>-OCH₃ Halos = 0 mm 29 - <i>m</i>-NO₂ Halos = 0 mm 30 - <i>p</i>-NO₂ Halos = 0 mm 32 - <i>m</i>-F Halos = 0 mm 33 - <i>p</i>-F Halos = 0 mm 35 - <i>m</i>-Cl Halos = 0 mm 36 - <i>p</i>-Cl Halos = 0 mm 38 - <i>m</i>-Br Halos = 0 mm 39 - <i>p</i>-Br Halos = 0 mm</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------------------------|------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|----------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|
| <p>B</p>  | <p>Derivados - R e os Halos frente a 14 Cepas Gram-positivas ou negativas</p> <p>AM17 - H Halos = 0 mm AM 19 - <i>m</i>-CH₃ Halos = 0 mm para 12 cepas AM 20 - <i>p</i>-CH₃ Halos = 0 mm AM 22 - <i>m</i>-OCH₃ Halos = 0 mm para 12 cepas AM 23 - <i>p</i>-OCH₃ Halos = 0 mm AM 25 - <i>m</i>-Cl Halos = 0 mm para 12 cepas AM 26 - <i>p</i>-Cl Halos = 0 mm AM 29 - <i>m</i>-NO₂ Halos = 0 mm AM 30 - <i>p</i>-NO₂ Halos = 0 mm AM 54 - <i>m</i>-F Halos = 0 mm para 12 cepas AM 59 - <i>p</i>-F Halos = 0 mm AM 63 - <i>m</i>-Br Halos = 0 mm para 12 cepas AM 64 - <i>p</i>-Br Halos = 0 mm</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">CEPA</th> <th style="width: 10%;">AM 19</th> <th style="width: 10%;">AM22</th> <th style="width: 10%;">AM 25</th> <th style="width: 10%;">AM54</th> <th style="width: 10%;">AM63</th> <th style="width: 15%;">Controle (Vancomicina)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Staphylococcus epidermidis</i> 201</td> <td>16 mm</td> <td>15mm</td> <td>17mm</td> <td>20mm</td> <td>17mm</td> <td>16mm</td> </tr> <tr> <td><i>Staphylococcus epidermidis</i> 8126</td> <td>16 mm</td> <td>15mm</td> <td>17mm</td> <td>20mm</td> <td>17mm</td> <td>16mm</td> </tr> </tbody> </table> | | | | | | | CEPA | AM 19 | AM22 | AM 25 | AM54 | AM63 | Controle (Vancomicina) | <i>Staphylococcus epidermidis</i> 201 | 16 mm | 15mm | 17mm | 20mm | 17mm | 16mm | <i>Staphylococcus epidermidis</i> 8126 | 16 mm | 15mm | 17mm | 20mm | 17mm | 16mm |
| CEPA | AM 19 | AM22 | AM 25 | AM54 | AM63 | Controle (Vancomicina) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 201 | 16 mm | 15mm | 17mm | 20mm | 17mm | 16mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 8126 | 16 mm | 15mm | 17mm | 20mm | 17mm | 16mm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

• Sensibilidade (Halos em mm)

Figura 18: Estrutura e resultados do Teste de Sensibilidade em Disco dos derivados de pirazolo-piridina; O núcleo base contendo rigidez conformacional forma a série A enquanto aquele contendo a carboxila e liberdade conformacional forma a série B. O quadro abaixo mostra os derivados de Pirazolopiridina ativos frente as cepas multiresistentes de *S.epidermidis* produtoras de β-lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina (Halo em mm). Os controles utilizados para as demais cepas apresentaram halos entre 16mm e 32 mm para neste ensaio (Vancomicina e Ciprofloxacina).

4.1.2 Derivados de Hidrazonas

Neste trabalho foram testados 54 derivados de hidrazonas (série F) sintetizados pelo grupo do professor Ricardo Nunes da Universidade Federal de Santa Catarina frente as 14 cepas gram-positivas e gram-negativas. Dentre os 54 derivados, apenas o composto (F13), apresentou halo de inibição do crescimento bacteriano (14 mm) frente a cepa de *S. aureus* 8148 produtora de β -lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina e *S. aureus* ATCC resistente a Penicilina G. O valor obtido com este derivado foi próximo a vancomicina utilizada como controle que apresentou um halo de inibição de 16 mm (Figura 19).

|  R=H, R ₁ = p-OCH ₃ (13) | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------|
| CEPA | COMPOSTO F13 | CONTROLE Vancomicina |
| <i>S.aureus</i> 8148 | 14mm | 16mm |
| <i>S.aureus</i> ATCC | 14mm | 16mm |

Sensibilidade (halos em mm)

Figura 19: Núcleo base dos derivados de Hidrazonas e teste de sensibilidade (TSA) - Antibiograma qualitativo frente a cepa de *S. aureus* 8148 produtora de β -lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina e *S. aureus* ATCC resistente a Penicilina G.

4.1.3 Derivados de Chalconas

O grupo do professor Ricardo Nunes da Universidade Federal de Santa Catarina sintetizou 68 moléculas derivadas de Chalconas, que apresentaram substituintes em R1 e R2 (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H) além de diferentes substituições na posição da carboxila (Figura 20). Contudo, as modificações estruturais não levaram a formação de halo de inibição contra nenhuma cepa de referência, resistente ou multirresistente testadas.

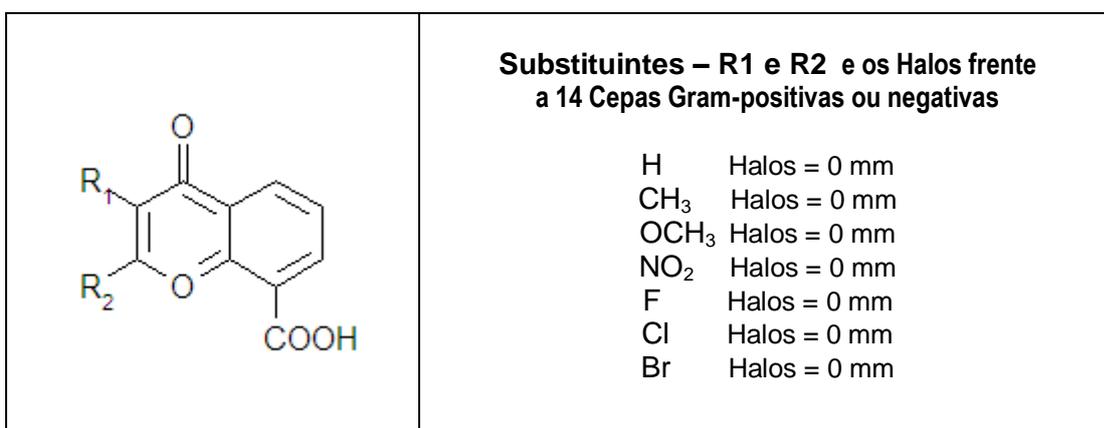


Figura 20: Núcleo básico dos derivados de chalconas com alguns de seus substituintes e resultados dos testes de sensibilidade.

4.1.4 Derivados de Quinolonas

Foram testados 42 derivados de quinolonas sintetizados pela Professora Cecília do Instituto de Química da UFF que frente as cepas utilizadas não apresentaram nenhuma formação de halo de inibição do crescimento bacteriano. A Vancomicina e a Ciprofloxacina, utilizadas como controle apresentaram halo de inibição entre 16 mm e 32 mm.

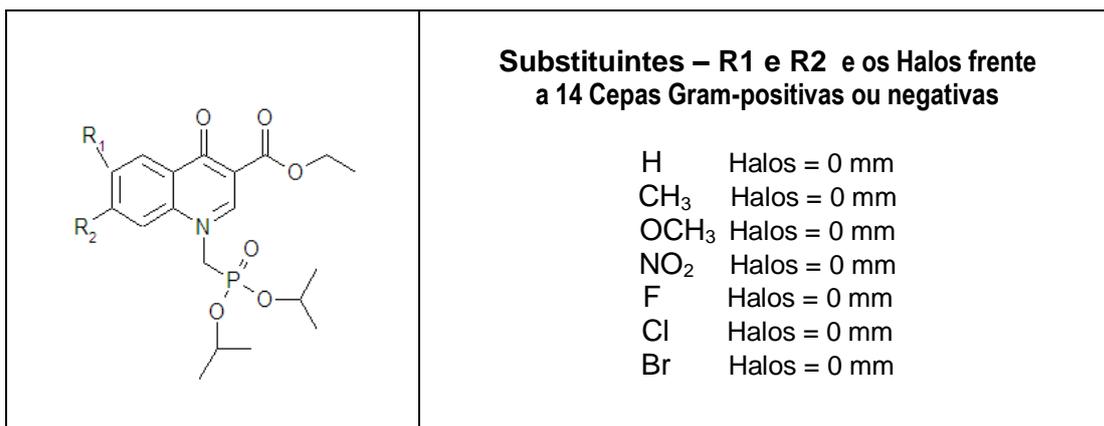


Figura 21: Núcleo básico dos derivados de quinolonas com alguns de seus substituintes e resultados dos testes de sensibilidade.

4.1.4 Derivados de Lapachonas

Seis moléculas contendo o núcleo base naitiridina com algumas modificações estruturais (Quinfu 03A; Quinfu 08A, Quinfu 09A, RC-22, RC-23 e Norbeta) foram sintetizadas pelo grupo do Prof. Vitor Ferreira do Instituto de Química da UFF, para testes de sensibilidade em disco utilizando as 14 cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 22).

Das moléculas testadas apenas a Norbeta (halo de 20 mm) e RC-23 (halo de 26 mm), apresentaram halo de inibição do crescimento bacteriano frente a cepa de *P. aeruginosa* 36408 produtora de β -lactamases, resistentes ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos. A Ciprofloxacina, utilizada no controle experimental, apresentou um halo de inibição de 31 mm.

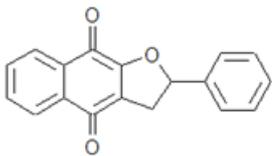
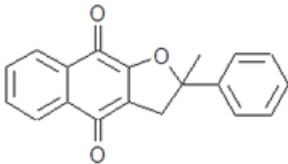
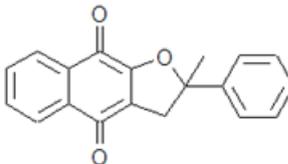
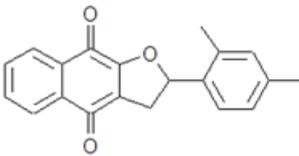
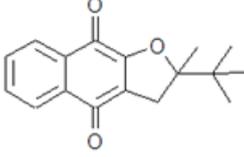
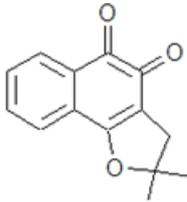
| | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 1 Quinfu 03A  | 2 Quinfu 08A  | 3 Quinfu 09A  | |
| 4 RC 22  | 5 RC 23  | 6 Norbeta  | |
| CEPAS | NORBETA | RC-23 | CONTROLE (Ciprofloxacina) |
| <i>Pseudomonas. aeruginosa</i> | 20mm | 26mm | 31mm |

Figura 22: Estrutura química dos derivados de Lapachona e resultados dos testes de sensibilidade (Halos em mm) frente *Pseudomonas aeruginosa* 36408 produtora de β -lactamases, resistentes ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos.

4.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

4.2.1 Derivados dos Sistema Pirazolopiridina

Os derivados de Pirazolopiridina que apresentaram halo de inibição significativo no crescimento bacteriano (≥ 14 mm), (AM19, AM22, AM25, AM54 e AM63) foram analisados de acordo com o MIC frente as cepas de *Staphylococcus epidermidis* 201 e 8126 produtoras de β -lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina. Os derivados AM19, AM54, AM63 e AM25 apresentaram o valor de MIC idêntico a Amicacina e a Cefoperazona (16 $\mu\text{g/mL}$), menor que a Nitrofurantoina (32 $\mu\text{g/mL}$) e maior que a Vancomicina (2 $\mu\text{g/mL}$) enquanto o derivado AM22

apresentou o maior valor de MIC comparado a todas as moléculas analisadas (64 µg/mL) (Figura 22).

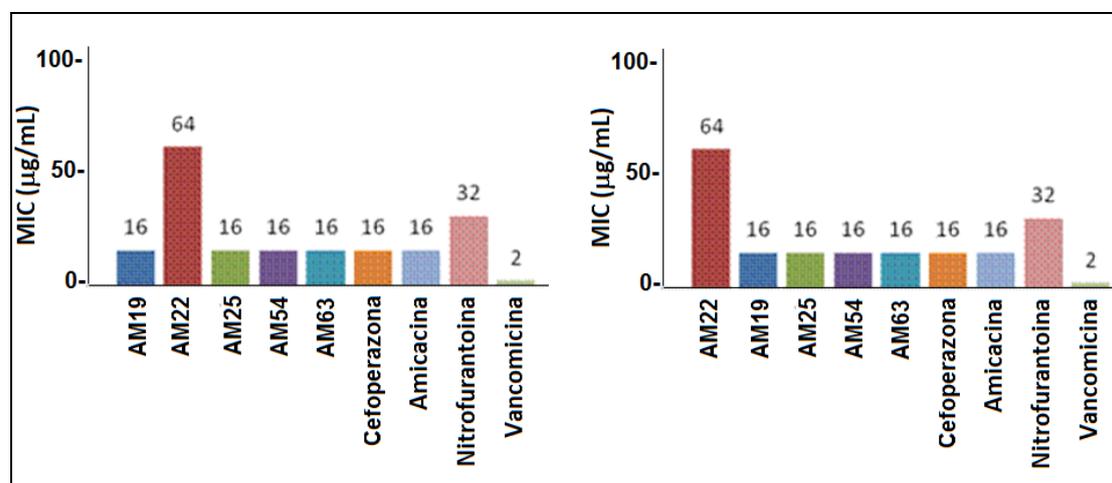


Figura 23: Comparação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC) dos antibacterianos de uso clínico e dos derivados de Pirazolopiridina frente as cepas de *Staphylococcus epidermidis* 201 e 8126 produtoras de β -lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina.

4.2.2 Derivados de Hidrazonas

Dos derivados de hidrazonas avaliados, apenas o composto F13, que apresentou um halo de inibição de 14 mm, foi analisado quanto ao MIC frente a cepa de *S.aureus* 8148 produtora de β -lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina e *S. aureus* ATCC resistente a Penicilina G. O derivado inibiu o crescimento bacteriano visível em uma concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$, valor mais alto que os encontrados nos antibacterianos de uso clínico (Vancomicina - 2 $\mu\text{g/mL}$; Cefoperazona - 32 $\mu\text{g/mL}$; Amicacina e a Nitrofurantoina - 16 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 23).

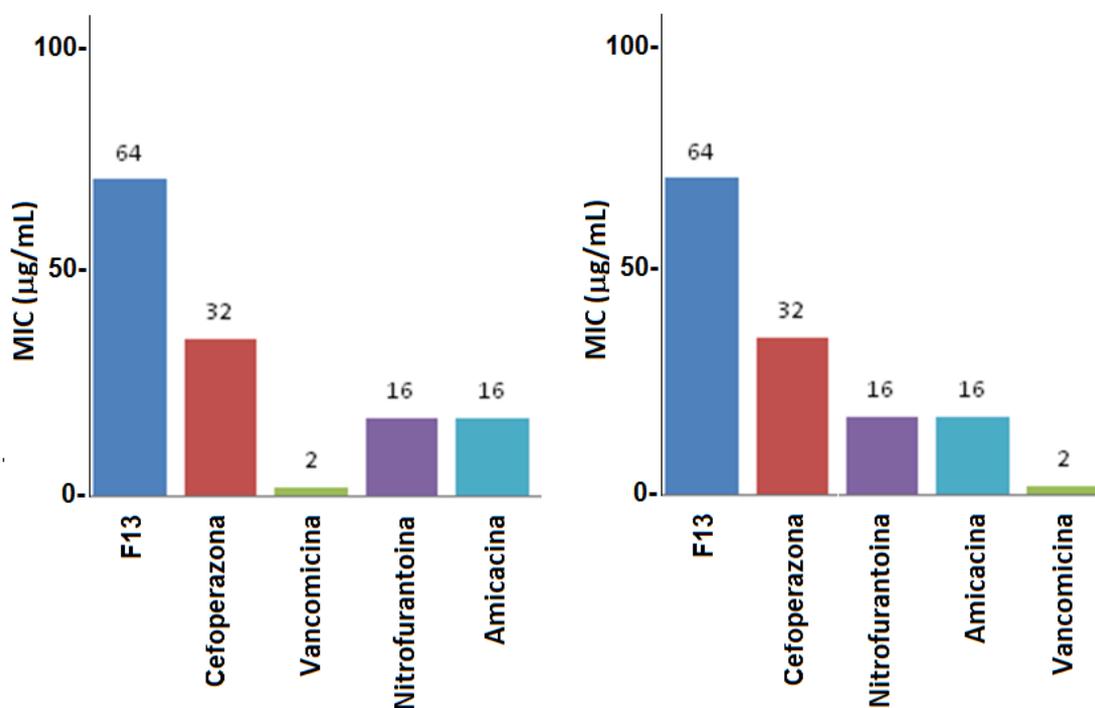


Figura 24: Comparação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC) dos antibacterianos de uso clínico e o derivado de Hidrazonas frente as a cepa de *S. aureus* 8148 produtora de β -lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina (direita) e *S. aureus* ATCC resistente a Penicilina G (esquerda).

4.1.4 Derivados de Lapachonas

Os derivados de Lapachonas que apresentaram halo de inibição do crescimento bacteriano (Norbeta e RC-23) foram avaliados quanto ao MIC frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 36408 produtora de β -lactamases, resistente ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos. O derivado Norbeta inibiu o crescimento bacteriano visível em uma concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ enquanto o derivado RC-23 inibiu o crescimento bacteriano visível em uma concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$, ambos apresentando um valor menor que os antibacterianos de uso clínico utilizados (Mezlocilina 64 $\mu\text{g/mL}$ e a Cefoperazona 16 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 24).

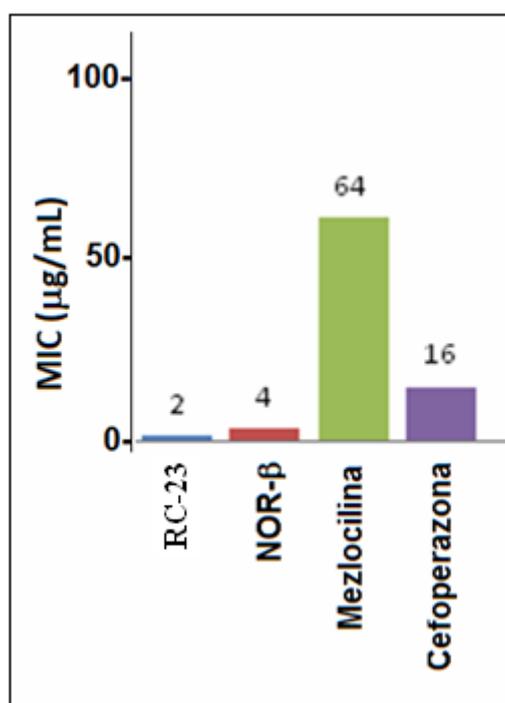


Figura 25: Comparação dos valores da concentração mínima inibitória (MIC) dos antibacterianos de uso clínico e derivados de Lapachonas frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 36408 produtora de β -lactamases, resistente ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Teste de Sensibilidade: Análise Biológica e Estrutural

Neste trabalho, diferentes sistemas e funções foram avaliados quanto ao perfil antibacteriano (Tabela 3). Com os resultados observados nos testes de sensibilidade (*screening*) podemos notar que a atividade antibacteriana apresentada pelas moléculas testadas está intimamente relacionada com sua estrutura, seja pela presença dos substituintes ou devido posição dos mesmos.

No caso do sistema tienopiridina, o núcleo tienopiridinico parece não ser um determinante farmacofórico, visto que apesar de descrito na literatura como importante para a modulação da atividade (Lohray *et al.*, 2004; Caminero *et al.*, 2010), os derivados testados em nosso laboratório não proporcionaram a detecção da atividade antibacteriana frente as cepas hospitalares Gram-positivas ou Gram-negativas utilizadas.

As modificações estruturais, variando-se entre a carboxila, a carbonitrila e o imidazol, assim como a troca de substituintes nas posições *meta* e *para* não favoreceram o aparecimento da atividade antibacteriana. Isso reforça nossos resultados anteriores que indicam que outros requerimentos estruturais seriam mais importantes para a atividade antibacteriana do que o núcleo tienopiridinico propriamente dito (Ferreira, *comunicação pessoal*).

Tabela 3: Comparação dos sistemas testados considerando o número de compostos ativos, cepas sensíveis e Concentração Mínima Inibitória (MIC).

| Sistema | Número de Derivados | | Cepas Sensíveis aos Derivados | | MIC em µg/mL | |
|-------------------|---------------------|--------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Testados | Ativos | Nome | Características | Derivados Ativos | Antibacterianos Padrão |
| Pirazolopiridinas | 26 | 5 | <i>S.epidermidis</i> 201 | produtoras de β-lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina | AM19, AM54, AM63 e AM25 = 16 µg/mL AM22 = 64 µg/mL | Vancomicina = 2 µg/mL Amicacina = 16 µg/mL Cefoperazona = 16 µg/mL Nitrofurantoina = 32 µg/mL |
| | | | <i>S.epidermidis</i> 8126 | | AM19, AM54, AM63 e AM25 = 16 µg/mL AM22 = 64 µg/mL | Vancomicina = 2 µg/mL Amicacina = 16 µg/mL Cefoperazona = 16 µg/mL Nitrofurantoina = 32 µg/mL |
| Lapachonas | 6 | 2 | <i>P. aeruginosa</i> 36408 | produtora de β-lactamases, resistente ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos | RC-23 = 2 µg/mL Norbeta = 4 µg/mL | Mezlocilina = 64µg/mL Cefoperazona = 16 µg/mL |
| Hidrazonas | 60 | 1 | <i>S.aureus</i> ATCC | resistente a Penicilina G | F13 = 64 µg/mL | Vancomicina= 2 µg/mL Amicacina =16 µg/mL Nitrofurantoina =16 µg/mL e Cefoperazona =32 µg/mL |
| | | | <i>S.aureus</i> 8148 | produtora de β-lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina | F13 = 64 µg/mL | Vancomicina= 2 µg/mL Amicacina =16 µg/mL Nitrofurantoina =16 µg/mL e Cefoperazona =32 µg/mL |
| Quinolonas | 42 | 0 | Nenhuma | - | - | - |
| Chalconas | 68 | 0 | Nenhuma | - | - | - |
| Tienopiridinas | 41 | 0 | Nenhuma | - | - | - |

Entretanto a importância do núcleo base na atividade antibacteriana é sugerida quando comparamos os resultados obtidos sobre os derivados de tienopiridina com derivados de pirazolopiridina.

De forma importante, mesmo apresentando algumas similaridades estruturais e utilizando os mesmos substituintes, apenas os derivados de pirazolopiridina apresentaram atividade antibacteriana frente a algumas das cepas testadas. Observamos ainda que apesar de algumas similaridades estruturais, o heterociclo que forma o núcleo base dos derivados de pirazolopiridina apresenta três nitrogênios, enquanto o heterociclo que forma os derivados de tienopiridina apresenta um enxofre e um nitrogênio. Assim, é possível que a presença do enxofre no heterociclo do núcleo base do tienopiridina interfira de tal maneira na distribuição dos elétrons das novas moléculas desenhadas que inviabilize a atividade antibacteriana; ou que ainda que a presença do anel aromático próximo do núcleo base dos derivados de tienopiridina esteja evitando a interação com o alvo bacteriano.

Se compararmos a estrutura molecular da oxacilina com os derivados de pirazolopiridina veremos similaridades na presença do anel aromático ligado ao heterociclo (Figura 26). Na oxacilina, tal estrutura é um dos fatores que determina sua resistência as beta-lactamases (enzimas que degradam o anel beta-lactâmico), visto que ele é um antibacteriano semi-sintético de escolha médica para casos de infecções com cepas Gram positivas produtoras de beta-lactamases (Trabulsi *et al.*, 2005).

De maneira interessante, nossos testes mostraram que alguns dos derivados de pirazolopiridina mostraram-se resistentes a ação das beta-

lactamases, uma vez que apresentaram atividade antibacteriana contra a cepas de *S. epidermidis* 201 e 8126 produtora de beta-lactamases (Gadjeva *et al.*, 2010) (Tabela 3). Contudo, o resultado mostra a importância da posição da substituição, neste caso especificamente.

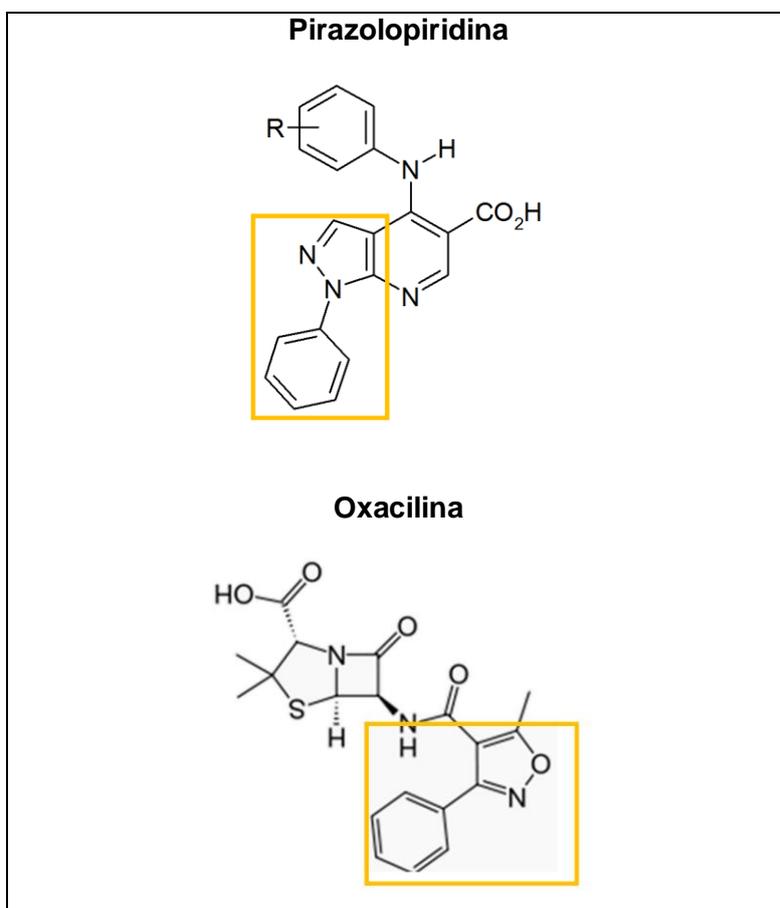


Figura 26: Comparação estrutural entre Pirazolopiridina e Oxacilina

Com a análise inicial dos derivados nos testes de sensibilidade permitiu perceber que outros elementos estruturais interferem na atividade antibacteriana como o substituinte e sua posição na molécula. Observamos, em nossos testes, que substituintes como metil (CH₃), metox (OCH₃), fluor

(F), Cloreto (Cl) e Bromo (Br), quando inseridos na posição *meta* dos derivados pirazolopiridina, são essenciais para a atividade antibacteriana da molécula. Quando, em nossos testes, trocamos de substituintes ou mudamos para posição *para*, as moléculas sintetizadas não apresentaram atividade antibacteriana. Surge então a hipótese de que tais substituintes possibilitam a interação da molécula com seu provável alvo bacteriano por orientarem a estrutura para uma melhor interação ou/e por interferirem na distribuição eletrônica, possibilitando assim, uma distribuição que origina um encaixe favorecido no sítio de ligação bacteriano (Wermuth, 2008).

Antibacterianos de uso clínico como as sulfamidinas, eritromicina, rifampicina, tetraciclina e penicilina G apresentam o grupo metil enquanto outros como o cloranfenicol apresentam o cloreto. Embora não possamos comparar a função destes substituintes entre os derivados de pirazolopiridina e os antibacterianos de uso clínico, pois possuem estruturas singularmente diferentes, é fato que os grupamentos têm sua importância em um conjunto de fatores que influenciam a atividade antibacteriana de uma molécula (Wermuth, 2008). Embora não possamos afirmar o seu papel na atividade antibacteriana, por desconhecer o mecanismo de ação da molécula, não podemos deixar de notar que a presença de tais substituintes é relevante para a atividade apresentada pelos derivados de pirazolopiridina (Qiao *et al.*, 2009).

O grupo carboxílico inserido no núcleo principal do Pirazolopiridina parece também ajudar na atividade antibacteriana dos derivados. Alguns testes no laboratório demonstraram que a substituição do grupamento

carboxílico interfere na atividade antibacteriana dos derivados pirazolopiridina frente as cepas testadas (Ferreira, *comunicação pessoal*). Antibacterianos de uso clínico como as penicilinas e a ciprofloxacina, apresentam o grupamento carboxílico também associado ao núcleo principal, o que poderia sugerir a importância da acidez conferida pelo grupamento na atividade destas moléculas (Yamane *et al.*, 2010).

No que se refere aos derivados de chalconas e quinolonas testados, mesmo apresentando grupamento carboxílico e derivados formados por modificações dos substituintes em posições *meta* e *para*, não houve atividade antibacteriana.

É provável que o núcleo base destes derivados interfira de maneira significativa na atividade antibacteriana, impedindo que o derivado faça interações com o alvo bacteriano, ou ainda, impedindo a sua permeabilidade dentro da célula bacteriana. Com relação as chalconas, a literatura descreve a ação sinérgica das chalconas e o ácido Rodanina-3-acético em uma atividade antibacteriana contra cepas de *S. aureus* e *E. coli* em um MIC de 64µg/mL, onde a ação antibacteriana só foi evidenciada na presença do ácido (Chen *et al.*,2010). A literatura mostra ainda que novas quinolonas como N-[2-(Tiofen-3-il)etil] Piperazinil Quinolonas com derivados que apresentam como substituintes (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br, N e H) e modificações no seu núcleo base apresentam um amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e negativas (Letafat *et al.*, 2007). Os trabalhos mencionados evidenciam a importância dos substituintes e de modificações no núcleo base das moléculas para que se alcance a atividade antibacteriana.

Quanto os derivados de Lapachonas RC-23 e Norbeta, a posição dos anéis cíclicos no núcleo central da molécula parece interferir diretamente na atividade antibacteriana. É provável que a configuração molecular facilite a interação destes derivados com algum alvo na célula bacteriana possibilitando a sua ação antibacteriana. A literatura mostra a atividade das lapachonas em células neoplásicas (da Silva *et al.*, 2010) e contra o *Trypanosoma cruzi* (Salas *et al.*, 2010), destacando a importância da composição estrutural da molécula para a permeabilidade do fármaco nas células. Como as *Pseudomonas* são bactérias Gram negativas, é provável que alguma estrutura comum as células eucarióticas e a camada lipídica em torno da estrutura celular das *Pseudomonas*, facilite a permeabilidade da molécula possibilitando a atividade antibacteriana, uma vez que tais moléculas não apresentaram atividade contra bactérias Gram positivas desprovidas de tais estruturas lipídicas.

É interessante notar que apenas um dos derivados de hidrazonas, derivado F13, apresentou atividade antibacteriana. É possível que alguma modificação na estrutura da molécula, provavelmente devido ao seus substituintes, possam ter conferido a atividade antibacteriana do composto.

A literatura descreve moléculas derivadas de hidrazonas, com atividade antibacteriana. Tais atividades estão relacionadas com modificações efetuadas na troca de substituintes (CH₃, OCH₃, NO₂, F, Cl, Br ou H) e conseqüente formação de derivados (Sriram *et al.*, 2010), o que parece similar ao comportamento observado em nosso derivado.

5.2 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) DOS DERIVADOS DE LAPACHONAS, HIDRAZONAS E SISTEMA PIRAZOLOPIRIDINA COMO PROTÓTIPOS DE AGENTES ANTIBACTERIANOS

5.2.1 Derivados de Pirazolopiridina

O *Staphylococcus epidermidis* é um importante agente de infecção hospitalar, e uma das razões que podem ter contribuído para isto é a sua capacidade de formar biofilmes em superfícies de polímeros, sendo este um importante fator de virulência, dificultando a penetração e a difusão de antibacterianos e dos elementos de defesa do organismo (Sławek *et al.*, 2010).

A resistência destas bactérias aos antibióticos é uma das principais preocupações em clínica. Novas cepas de bactérias resistentes (e multirresistentes) a essas moléculas, como cepas resistentes a metilina e a oxacilina, constituem um grande desafio no tratamento contra infecções ocasionadas por *S. epidermidis* (Ebrahim *et al.*, 2010).

Testes realizados com as cepas de *S. epidermidis* 201 e 8126 produtoras de beta-lactamases, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina, mostraram sensibilidade aos derivados de pirazolopiridina analisados neste estudo. A determinação do MIC revelou que os derivados Pirazolopiridínicos (AM19, AM25, AM54 e AM63) apresentam concentrações capazes de inibir o crescimento visível de cepa multiresistente de *S. epidermidis* 201 e 8126 a partir de 16µg/mL mesmo na presença de beta-lactamases, enzimas estas que atuam como uma das principais causas de resistência desta cepas (Ravat *et al.*, 2010).

Antibióticos de uso clínico como Amicacina, Cefoperazona e Nitrofuratoína, utilizados no pós operatório para evitar infecções de *S. epidermidis*, apresentaram concentrações similares (Amicacina e Cefoperazona = 16µg/mL) ou maiores (Nitrofuratoína = 32µg/mL) que os derivados Pirazolopiridínicos. Assim, em virtude dos crescentes casos de cepas de *S. epidermidis*, os derivados Pirazolopiridínicos poderiam se tornar futuramente uma alternativa viável ao tratamento de infecções ocasionadas por estas cepas multirresistentes.

Os derivados Pirazolopiridínicos mostraram especificidade por cepas de *S. epidermidis* 201 e 8126, o que pode nos indicar um possível mecanismo de ação em uma etapa metabólica vital presente apenas neste tipo de células e que está sendo modulado por estes derivados. Apesar de não ser possível assegurar com os ensaios realizados até então realizados, a via pela qual os compostos exercem sua ação antibacteriana, o fato de serem afetadas cepas resistentes a Oxacilina, cuja resistência é determinada pela modificação do alvo das penicilinas semi-sintéticas, nos orienta em direção a um possível mecanismo de ação para os derivados testados.

A Oxacilina se liga as Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs), impedindo que estas proteínas, que são de fundamentais para a síntese de parede celular das bactérias, exerçam sua função. Bactérias resistentes a Oxacilina modificam as PBPs, produzindo proteínas que apresentam baixa afinidade as penicilinas semi-sintéticas (PBPs2' e PBPs2a)(Zhanel *et al.*, 2009).

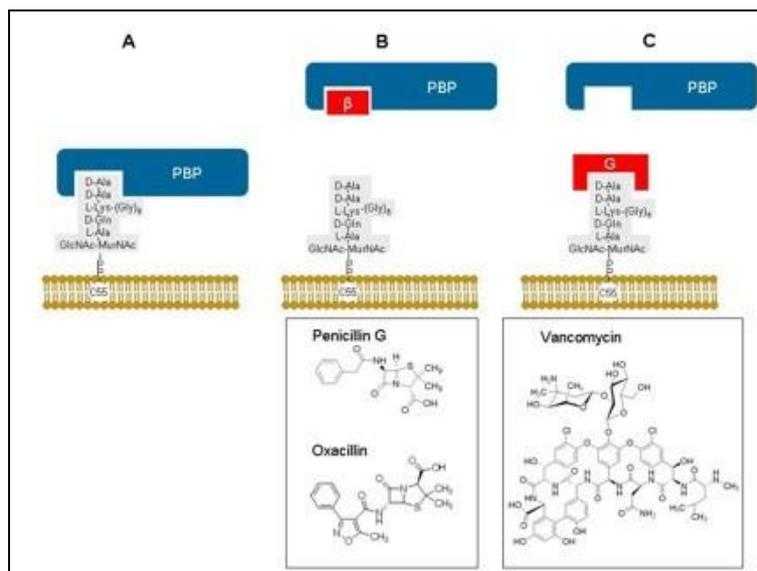


Figura 27: Representação esquemática do modo de ação dos antibacterianos beta-lactâmicos e glicopeptídeos. As Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs), enzimas que catalizam as etapas finais da síntese da parede bacteriana se liga a região terminal de resíduos D-alanil-D-alanine dos precursores peptidoglicanos para realizar a transpeptidação (A). Os antibacterianos beta-lactâmicos (β) são estruturalmente análogos ao D-Ala-D-Ala e as PBPs podem reagir com esses antibacterianos pela clivagem da ligação beta-lactâmica e formar um intermediário estável que não segue em reação. A acilação posterior das PBPs devido a esse processo inativa a enzima (B). Os glicopeptídeos (G) inibem a síntese de parede celular impedindo a ligação do substrato a enzima pela ligação ao D-Ala-D-Ala (C). Adaptado <http://www.itqb.unl.pt/labs/bacterial-cell-biology>.

De maneira interessante, nossos resultados demonstram que os derivados Pirazolopiridínicos apresentaram uma atividade específica contra cepas de *S. epidermidis* resistentes a Oxacilina (Tabela 3). Existe a possibilidade então que os derivados Pirazolopiridinas apresentem uma afinidade por tais proteínas, em especial pela PBP2', proteína com baixa afinidade a oxacilina e que é comumente encontrada em cepas de *S. epidermidis* resistentes a Oxacilina (Yamane *et al.*, 2010).

5.2.2 Hidrazonas

O *S. aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas

saudáveis. Entretanto ela pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves e fatais (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (Morris *et al.*, 2009).

O *S. aureus* também traz riscos para pacientes que fazem diálise, queimados, diabéticos e HIV-positivos, agravados pela presença de cepas resistentes ao antibacterianos de uso clínico metilina (cepas MRSA) (Andersson *et al.*, 2010).

O MIC do derivado de hidrazona F13 (64µg/mL) comparado ao antibacterianos de uso clínico testados mostra uma menor potência em relação a concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano frente cepas de *S. aureus* 8148 produtoras de β-lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina e *S. aureus* ATCC resistente a Penicilina G. A eficácia do composto, entretanto, pode ser melhorada através de modificações estruturais ou ainda com a formação de nanopartículas que poderia permitir o uso de uma concentração maior, possivelmente diminuindo possíveis efeitos colaterais.

Com base na ação desse derivado hidrazônico em relação a cepa em questão, é provável que este derivado sofra resistência cruzada a oxacilina, uma vez que as demais bactérias Gram positivas utilizadas nos testes são resistentes a oxacilina e o composto não se mostrou eficaz contra as cepas oxacilina resistentes.

A parede celular de bactérias Gram-negativas pode ainda representar um obstáculo para o respectivo derivado hidrazônico, como ocorre com os

antibacterianos macrolídeos (Ravat *et al.*, 2010), determinando uma resistência natural ao derivado e a ineficácia do mesmo sobre estas cepas.

A possível resistência cruzada a oxacilina poderia inferir que o provável mecanismo de ação do derivado de hidrazona é similar ao da Oxacilina, com resistência a ação das penicilinasas, enzimas que degradam o sítio ativo dos beta-lactâmicos, e a sua possível entrada na bactéria e ligação com PBPs (Astrid *et al.*, 2004). Uma vez que a resistência a Oxacilina é dada pela modificação das PBPs e que foi observado que o composto F13 apresentou atividade apenas em cepas *S. aureus* sensíveis a Oxacilina, as PBPs podem ser consideradas como possíveis alvos do composto F13.

5.2.3 *Lapachonas*

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fazem parte do grupo de bactérias gram-negativas encontradas em diversos ambientes, principalmente solo, água ou associadas a plantas e animais (Ebrahim *et al.*, 2010).

Em seres humanos, as *Pseudomonas* podem causar infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com AIDS, câncer, vítimas de queimaduras e fibrose cística (Ebrahim *et al.*, 2010). A utilização dos atuais antibacterianos no ambiente clínico exerce uma pressão seletiva isolando cepas multirresistentes, como as cepas KPCs, ao longo do tempo favorecendo que estas cepas isoladas troquem plasmídios com genes de resistência com cepas de mesma espécie e entre cepas de espécies diferentes (Da silva *et al.*, 2010).

A *promiscuidade* com relação a troca de material genético entre as cepes *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli* é grande (Ebrahim *et al.*, 2010). A troca de pacientes entre hospitais e até mesmo de um ambiente hospitalar para o outro favorece ainda mais a disseminação dos elementos plasmidiais móveis entre diferentes grupos previamente isolados. Uma vez que a antibioticoterapia pode variar entre os diferentes hospitais, a possibilidade de aquisição de diferentes genes de resistência aumenta ainda mais (Meletis *et al.*, 2010).

Cepas de *P. aeruginosa*, produtora de beta-lactamases, resistente ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos, foram testadas frente aos derivados de Lapachonas que apresentaram baixas concentrações de MIC (2-4µg/mL) se compararmos com uma possíveis alternativas de uso clínico, a Mezlocilina e a Cefoperazona (16µg/mL), antibacterianos de uso clínico.

A importância clínica da identificação destes derivados é clara e está relacionada com a difícil erradicação da infecção por cepas gram-negativas e contínuos fracassos terapêuticos, no tratamento dessas infecções (Theuretzbacher *et al.*, 2009). Essa situação é uma consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como da resistência natural e a adquirida a muitos antibacterianos. Assim, novas opções como as Lapachonas aqui identificadas podem, no futuro, ser utilizadas como alternativas ao tratamento de infecções ocasionadas por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*.

5.3 Novas Alternativas de Antibioticoterapia

Em virtude da grande escalada mundial da resistência bacteriana, a descoberta de novas moléculas com atividade bacteriostática ou bactericida é cada vez mais necessária. A cada ano cerca de sete milhões de novas moléculas são testadas; no qual destes apenas 0,01% apresentam atividade antibacteriana. Daqueles que apresentam atividade, problemas como síntese complexa, custo comercial e principalmente toxicidade acabam por limitar a produção comercial em uma molécula a cada 10-15 anos (Wijagkanalan *et al.*, 2010, Theuretzbacher *et al.*, 2009). Em comparação com o quadro mundial que é de 0,01%, do total de moléculas que apresentam atividade antibacteriana, do total de moléculas que testamos neste estudo, cerca de 3,2% apresentaram atividade antibacteriana dentro do período de tempo de 3 anos e seis meses, sobrando apenas de 7 a 12 anos para o restante da realização de todas as outras etapas. Esse cálculo indica que a projeção sobre a descoberta de uma molécula antibacteriana no meio acadêmico até torna-la comercializável com base em fins não lucrativos, dificulta o acesso deste conhecimento de forma aplicada, tendo em vista a não associação com empresas que se interessem em acelerar esse processo de descoberta e comercialização.

Exemplos como a daptomicina como uma nova alternativa no tratamento de cepas multiresistentes ainda assim estimulam a continuação dos estudos. A daptomicina é um antibiótico lipoprotéico produzido por fermentação do *Streptomyces roseosporus*, cuja ação *in vitro* contra cepas

Gram Positivas aeróbias e anaeróbias, inclui cepas de *S.aureus* MRSA e *Enterococcus* VRE. A ação da daptomicina ainda não está estabelecida, mas acredita-se que ela aja na despolarização da membrana celular, assim como possa também agir em vários outros sítios como enzimas e material genético celular (Salama *et al.*, 2009).

Um dos problemas na utilização dos novos agentes antibacterianos está na sua alta dosagem e efeitos colaterais ocasionados pelo tratamento. A daptomicina é excretada pelos rins e assim, e ajustes de dose são necessários em caso de insuficiência renal (Salama *et al.*, 2009). Não só a daptomicina, mas a maioria dos antibacterianos de uso clínico apresentam algum grau de toxicidade, como a vancomicina, que pode causar alergias, efeitos nefrotóxicos e lesões na retina entre outros (Zhanel *et al.*, 2009), e a ciprofloxacina que pode estar envolvida na formação de tumores e insuficiência renal (Senadhi, 2010).

Nanoparticular os antibacterianos pode ser uma saída para o problema da citotoxicidade. Alguns antibacterianos necessitam passar por etapas metabólicas no organismo para que se tornem ativos. Os derivados aqui avaliados e que apresentaram atividade antibacteriana (Pirazolopiridina, Hidrazonas e Lapachonas) aparentemente não apresentam necessidades metabólicas ou químicas que inviabilizem a formação de nanopartículas (Ranjan *et al.*, 2009). Desta forma, os derivados testados que apresentaram atividade antibacteriana teoricamente podem ter seus efeitos otimizados e possíveis danos colaterais reduzidos pela futura nanoparticulação.

6. CONCLUSÕES

1) Quanto a Identificação do perfil antibacteriano contra cepas resistentes e multirresistentes em 243 moléculas de origem sintética derivados de diferentes sistemas e funções para atuarem como futuros protótipos a quimioterápicos e posterior nanoparticulação para redução de possíveis efeitos colaterais pudemos concluir que:

- Dos 243 compostos testados frente cepas multiresistentes, 8 derivados apresentaram um perfil antibacteriano significativo segundo padronização do *Clinical and. Laboratory Standards Institute* (CLSI).

2) Quanto a determinação e a comparação específica segundo o sistema avaliado do perfil antibacteriano frente a cepas multiresistentes Gram-positivas e Gram-negativas, isoladas de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) segundo padronização do CLSI (*Clinical and. Laboratory Standards Institute*) observamos que dos derivados sintéticos avaliados apenas aqueles do sistema ou função:

- Pirazolopiridina (n=5) apresentaram atividade frente as cepas de *S.epidermidis* 201 e *S.epidermidis* 8126 produtoras de β -lactamase, resistentes a Penicilina-G, Oxacilina, Gentamicina e a Eritromicina.
- Hidrazona (n=1) apresentou atividade frente as cepas de *S. aureus* 8148 produtora de β -lactamases, resistentes a Penicilina-G e a Gatifloxacina e *S. aureus* ATCC resistente a Penicilina G.
- Lapachonas (n=2) apresentaram atividade frente a cepa *P. aeruginosa* 36408 produtora de β -lactamases, resistente ao Imipenem, Meropenem e aos Carbapenêmicos.

- As Tienopiridinas, Quinolonas e Chalconas não apresentaram qualquer atividade frente as 14 cepas Gram positivas e Gram negativas testadas, ressaltando a ausência do perfil antibacteriano nestas moléculas.

3) Quanto a determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (MICs) para os oito derivados dos sistemas Pirazolopiridina, Hidrazonas e Lapachonas que apresentaram perfil antibacteriano significativo e a comparação com antibacterianos utilizados comercialmente para avaliação do potencial como protótipo para o desenho de novos antibacterianos observamos que:

- Os valores de MIC mostraram que derivados de Pirazolopiridina (AM19; AM22; AM25; AM54 e AM63), Hidrazonas (F13) e Chalconas (Norbeta e RC-23) são protótipos de antibacterianos promissores (2-64 µg/mL) visto que estão dentro de uma escala comum aos antibacterianos em uso clínico (Ciprofloxacina, Vancomicina, Cefoperazona, Nitrofurazonina, Amicacina e Mezlocilins) podendo esses derivados se tornarem alternativas viáveis ou que podem ser trabalhadas estruturalmente para o futuro tratamento de infecções com cepas multiresistentes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

7. REFERÊNCIAS

ALAGOZLU H., CINDORUK M., UNAL S. (2006) Severe INR elevation in a patient with choledocholithiasis receiving cefoperazone. *Clin Drug Investig.* 26:481-4.

AL-HUNITI M. H., EL-ABADELAH M. M., ZAHRA J. A., SABRI S. S., INGENDO 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.

ANDERSSON D. I., HUGHES D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 8:260-71.

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

BARCENILLA F., GASCO E., RELLO J., ALVAREZ R. 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., PINHEIRO L. C., RODRIGUES C. R., Loureiro N. I. V., CASTRO H. C., LANFREDI R. A., SABATINI L. J., BORGES J. C., CARVALHO J. M., ROMEIRO G. A., FERREIRA V. F., FRUGULHETTI I. C. P. P., VANNIER S. 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.

BLANCHARD S. C., COOPERMAN B. S., WILSON D. N. (2010) Probing translation with small-molecule inhibitors. *Chem Biol.* 17:633-45.

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

BRIGOTTI M., TAZZARI P. L., RAVANELLI E., CARNICELLI D., BARBIERI S., ROCCHI L., ARFILLI V., SCAVIA G., RICCI F., BONTADINI A., ALFIERI R. R., PETRONINI P.G., PECORARO C., TOZZI A. E., CAPRIOLI A. (2010) Endothelial damage induced by Shiga toxins delivered by neutrophils during transmigration. *J Leukoc Biol.* 6: 715-20.

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

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

CAMINERO J. A., SOTGIU G., ZUMLA A., MIGLIORI G. B. (2010) Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 4: 126-30.

CASSONE M., OTVOS L. J. R. (2010) Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* ;8:703-16.

CATALDO M. A., TAGLIETTI F., PETROSILLO N. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a community health threat. *Postgrad Med.* 122:16-23.

CHEN Z. H., ZHENG C. J., SUN L. P., PIAO H. R. (2010) Synthesis of new chalcone derivatives containing a rhodanine-3-acetic acid moiety with potential anti-bacterial activity. *Eur J Med Chem.* 45:5739-43.

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.

CLANCY K. W., MELVIN J. A., MCCAFFERTY D. G. (2010) Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. *Biopolymers.* 94:385-96.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). (2010): Site do CLSI, http://www.clsi.org/AM/Template.cfm?Section=About_CLSI

CLINTON S. R., BINA J. E., HATCH T. P., WHITT M. A., MILLER M. A. (2010) Binding and activation of host plasminogen on the surface of *Francisella tularensis*. *BMC Microbiol.* 12;10-76.

CROSS R. M., MANETSCH R. (2010) Divergent Route: Access Structurally Diverse 4-Quinolones via Mono or Sequential Cross-Couplings. *J Org Chem.* 17: 23-40.

CUENCA-ESTRELLA M. (2010) Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Rev Esp Quimioter.* 23:169-176.

DA SILVA E. N. J., CAVALCANTI B. C., GUIMARÃES T. T., PINTO M. D. C., CABRAL I. O., PESSOA C., COSTA L. V., DE MORAES M. O., DE ANDRADE C. K., DOS SANTOS M. R., DE SIMONE C. A., GOULART M. O., PINTO A. V. (2010) Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *Eur J Med Chem.* 46:399-410.

DE MELLO H., ECHEVARIA A., BERNARDINO A. M. R., CANTO C. 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 1H-pirazolo[3,4-b]piridina: Síntese e Assinalamentos de Hidrogênio e Carbono por 1D e 2D. *Química Nova.* 22 : 45-49.

DELEO F. R., CHAMBERS H. F. J. (2009) Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *Clin Invest.* 119:2464-74.

DEURENBERG R. H., STOBBERINGH E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet. Evol.* 8(6):747-63.

DIENSTMANN R., PICOLI S. U., MEYER G., SCHENKEL T., STEYER. J. (2010) Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae*

carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. J Bras Patol Med Lab. 81: 133-35.

EBRAHIM G. J. J. (2010) Bacterial resistance to antimicrobials. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 56:141-3.

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.

EUMKEB G., SAKDARAT S., SIRIWONG S. (2010) Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. Phytomedicine. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 29: 345-8.

FLUHR J. W., DEGITZ K. (2010) Antibiotics, azelaic acid and benzoyl peroxide in topical acne therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 1:24-30.

FLUIT A. C., SCHMITZ F. J. (2004) Resistance integrons, super-integrans. *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.

GADJEVA M., NAGASHIMA J., ZAIDI T., MITCHELL R. A., PIER G. B. (2010) Inhibition of macrophage migration inhibitory factor ameliorates ocular *Pseudomonas aeruginosa*-induced keratitis. *PLoS Pathog.* 26: 6-13.

GERIA A. N., SCHWARTZ R. A. (2010) Cutis Impetigo update: new challenges in the era of methicillin resistance. *Anti Age Chem.* 85:65-70.

GRIFFIN M. O., FRICOVSKY E., CEBALLOS G., VILLARREAL F. (2010) Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:539-48.

HAENNI M., TARGANT H., FOREST K., SÉVIN C., TAPPREST J., LAUGIER C., MADEC J. Y. (2010) Retrospective study of necropsy-associated coagulase-positive *staphylococci* in horses. *J Vet Diagn Invest.* 22:953-956.

HALL R. M. (2010) *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol.* 5:1525-38.

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

HOIBY N., BJARNSHOLT T., GIVSKOV M., MOLIN S., CIOFU O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 35:322-32.

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

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

KALPANA N., SHAIENDRA K. S., DINA N. M. C. (2010) Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chem. Pharm. Bull.* 58: 1423—1430.

KAMYAR S., MANSOR B. A., WAN M. Z., NOR A. B., RUSSLY A. R., MARYAM J., MAJID D. (2010) Silver/poly (lactic acid) nanocomposites: preparation, characterization, and antibacterial activity. *Int. J. of Nanomedicine.* 5: 573–579.

KANNAN M. K. (2010) Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. *IEEE Trans Magn.* 46: 2523–2558.

KIM Y. J., KIM H. C., KO H., AMOR E. C., LEE J. W., YANG H. O. (2010) Stercurensin inhibits nuclear factor- κ B-dependent inflammatory signals through attenuation of TAK1-TAB1 complex formation. *J Cell Biochem.* 8: 105-14.

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.

KUPSTAITE R., BARANAUSKAITE A., PILECKYTE M., SVEIKATA A., KADUSEVICIUS E., MUCKIENE G. (2010) Severe vancomycin-induced anaphylactic reaction. *Medicina (Kaunas).* 46: 30-3.

FERREIRA B., AFONSO I. F., RODRIGUES C. R., ABREU P. A., GARRETT R., PINHEIRO L. C. S., AZEVEDO A. R., BORGES J. C., VEGI P. F., SANTOS C. C. C., DA SILVEIRA FRANCISCO C. A, CABRAL L. M., FRUGULHETTI I. C. P. P., BERNARDINO A. M. R., SANTOS D. O., CASTRO H. C. (2008) Antibacterial profile against drug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical strain and structure–activity relationship

studies of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine and thieno[2,3-b]pyridine derivatives. Bioorg. & Med. Chem. 16: 8196–8204.

LETAFAT B., EMAMI S., MOHAMMADHOSSEINI N., FARAMARZ M. A., SAMAD N., SHAFIEE A., FOROUMAD A. (2007) Synthesis and Antibacterial Activity of New N-[2-(Thiophen-3-yl)ethyl] Piperazinyl Quinolones. Chem. Pharm. Bull. 55: 894 898.

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

LU Y., WU C. M., WU G. J, ZHAO H. Y., HE T., CAO X. Y., DAI L., XIA L. N., QIN S. S., SHEN J. Z. (2010) Prevalence of Antimicrobial Resistance Among *Salmonella* Isolates from Chicken in China. Foodborne Pathog Dis. 15: 2455-60.

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.

MANS J. J., VON LACKUM K., DORSEY C., WILLIS S., WALLET S. M., BAKER H. V., LAMONT R. J. (2009) The degree of microbiome complexity influences the epithelial response to infection. Handfield M. BMC Genomics. 18;10:380.

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

MCDONALD M., BLONDEAU J. M. (2010) Emerging antibiotic resistance in ocular infections and the role of fluoroquinolones. J Cataract Refract Surg. 36: 1588-98.

MELETIS G., TZAMPAZ E., PROTONOTARIOU E., SOFIANOU D. (2010) Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM and blaKPC genes. Hippokratia. 2: 139-140.

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

MÔNICA P., ELSA M. M., NILTON L. (2009) Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. Anti Age Chem. 8: 2702.

MORRIS W. E., FERNÁNDEZ-MIYAKAWA M. E. (2009) Toxins of *Clostridium perfringens*. Rev Argent Microbiol. 41:251-60.

MURASE Y., MAEDA S., YAMADA H., OHKADO A., CHIKAMATSU K., MIZUNO K., KATO S., MITARAI S. (2010) Clonal Expansion of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis, Japan. Emerg. Infect. Diseases. 6(6):948-54.

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

NAYAK-RAO S. (2010) Aminoglycoside use in renal failure. Indian J Nephrol. 4: 733-35.

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; 257: 1064-77.

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.

NOMURA E., UCHIMI K., ABUE M., KON H., NOGUCHI T., SUZUKI S., SUZUKI M., ONODERA H., TATENO H., OTA Y. (2010) Regression of MALT lymphoma of the rectum after *Helicobacter pylori* eradication therapy in a patient negative for *Helicobacter pylori*. *Nippon S. G. Zasshi*. 107:1466-73.

OBATA F. (2010) Influence of *Escherichia coli* shiga toxin on the mammalian central nervous system. *Adv Appl Microbiol*. 71:1-19.

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

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

QIAO L., CHOI S., CASE A., GAINER T. G., SEYB K., GLICKSMAN M. A., LO D. C., STEIN R. L., CUNY G. D. (2009) Structure-activity relationship study of EphB3 receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*.. 19: 6122-6.

RADIGAN E. A., GILCHRIST N. A., MILLER M. A. (2010) Management of aminoglycosides in the intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 9: 456-58.

RAMAKRISHNAN M., MOÏSI J. C., KLUGMAN K. P., IGLESIAS J. M., GRANT L. R., MPOUDI M., LEVINE O. S. (2010) Increased risk of invasive bacterial infections in African people with sickle-cell disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 10: 329-37.

RANJAN A, POTHAYEE N., SELEEM M. N., TYLER R. D J., BRENSEKE B., SRIRANGANATHAN N., RIFFLE J. S., KASIMANICKAM R. (2009) Antibacterial efficacy of core-shell nanostructures encapsulating gentamicin against an in vivo intracellular *Salmonella* model. *Int J Nanomedicine*. 4: 289-97.

RAVAT F., LE-FLOCH R., VINSONNEAU C., AINAUD P., BERTIN-MAGHIT M., CARSIN H., PERRO G. (2010) Antibiotics and the burn patient. *SFETB .Burns*. 5: 20510-518.

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.

SALAMA N. N., SEGAL J. H., CHURCHWELL M. D., PATEL J. H., GAO L., MUELLER B. A. (2009) Intradialytic administration of daptomycin in end stage renal disease patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 4: 1190-4.

SALAS C. O., FAÚNDEZ M., MORELLO A., MAYA J. D., TAPIA R. A. (2010) Natural and Synthetic Naphthoquinones Active Against *Trypanosoma Cruzi*: An Initial Step Towards New Drugs for Chagas Disease. *Curr Med Chem.* 29: 235-39.

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 Series of A1– Adenosine Receptor (A1AR). *Bioorg Med Chem Letters.* 98: 11-2.

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

SENADHI V. (2010) A rare cause of chronic mesenteric ischemia from fibromuscular dysplasia: a case report. *J Med Case Reports.* 19: 374:373.

SENTHI S., MUNRO J. T., PITTO R. P. (2010) Infection in total hip replacement: meta-analysis. *Int Orthop.* 18:556-58.

SEPUTIENE V., POVILONIS J., ARMALYTE J., SUZIEDELIS K., PAVILONIS A., SUZIEDELIENE E. (2010) Tigecycline - how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Medicina (Kaunas).* 53: 152-55

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.

SŁAWEK J., CAR H., BONIKOWSKI M., BOGUCKI A., KOZIOROWSKI D., POTULSKA-CHROMIK A., RUDZIŃSKA M. (2010) Are botulinum toxin type A preparations really the same medication? A comparison of three botulinum toxin. *Neurol Neurochir Pol.* 44: 43-64.

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.

SRIRAM D., YOGEE SWARI P., VYAS D. R., SENTHILKUMAR P., BHAT P., SRIVIDYA M. (2010) 5-Nitro-2-furoic acid hydrazones: design, synthesis and in vitro antimycobacterial evaluation against log and starved phase cultures. Bioorg Med Chem Lett. 20: 4313-6.

STRYJEWski M. E., COREY G. R. (2009) New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Crit Care. 15:403-12.

THEURETZBACHER U. (2009) Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? International Journal of Antimicrobial Agents. 1: 15-20

THOMAS D., GOOTZ M. K. L., FADIA D. H., BRIAN A. D., WEN H., P. D., RICHARD C. H. (2009) Genetic Organization of Transposase Regions Surrounding blaKPC Carbapenemase Genes on Plasmids from *Klebsiella* Strains Isolated in a New York City Hospital. Anti Age Chem. 12: 1998–99

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

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

VAN S., DAS S. K., WANG X., FENG Z., YI JIN, HOU Z., CHEN F., PHAM A., JIANG N., HOWELL S. B., YU LEI. (2010) Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly(L- γ -glutamyl-glutamine)- paclitaxel nanoconjugate. Int. J. of Nanomedicine. 5: 825–837.

WARDAL E., SADOWY E., HRYNIEWICZ W. (2010) Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. *Pol J Microbiol*. 59: 79-87.

WERMUTH C. G. (2003). *The Practice of Medicinal Chemistry*. Elsevier second edition.

WIJAGKANALAN W., KAWAKAMI S., HASHIDA M. (2010) Designing Dendrimers for Drug Delivery and Imaging: Pharmacokinetic Considerations. *Pharm Res*. 23: 4567-69.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010) WHO Health, Geneva: Site do WHO, <http://www.who.int/en> acessado em outubro de 2010.

YAMANE K., ARAKAWA Y. M. (2010) Recent trend and research issues related to antimicrobial-resistant bacteria. *Massui*. 59: 4-16.

YONG D., TOLEMAN M. A., GISKE C. G., CHO H. S., SUNDMAN K., LEE K., and WALSH T. R. (2009) Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. Anti Age Chem, 4: 5046–5054.

YU G., MASON H. J., WU X., WANG J., CHONG S., DOROUGH G., HENWOOD A., PONGRAC R., SELINGER L., 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.

ZERVOSEN A., LU W., CHEN Z., WHITE R. E., DEMUTH T. P. (2004) Interactions between Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Two Novel Classes of PBP Inhibitors, Arylalkylidene Rhodanines and Arylalkylidene Iminothiazolidin-4-ones. Anti Age Chem. 4: 230-34.

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

ZHANEL G. G., SNIEZEK G., SCHWEIZER F., ZELENITSKY S., LAGACÉ W. P. R., RUBINSTEIN E., GIN A. S., HOBAN D. J., KARLOWSKY J. A. (2009)

Ceftaroline: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against
meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs*. 69: 809-31.

APÊNDICES

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](#)