UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

ATIVIDADE BACTERICIDA DE UM NOVO DERIVADO 1,2,4-OXADIAZOL-HIDRAZIDA FRENTE AO *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis*.

Iêda Cristina da Silva Vicente

Recife – 2003

Iêda Cristina da Silva Vicente

ATIVIDADE BACTERICIDA DE UM NOVO DERIVADO 1,2,4-OXADIAZOL-HIDRAZIDA FRENTE AO *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis*.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Área de concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadora: Profa Dra Eulália C.P. Azevedo Ximenes

Recife – 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

Iêda Cristina da Silva Vicente

Orientadora

Professora Dra. Eulália C.P. Azevedo Ximenes

Banca Examinadora

Professora Dra. Glícia Maria Torres Calazans
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Professora Dra. Maria do Carmo Alves de Lima
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

REITOR

Prof. Dr. Mozart Neves Ramos

VICE-REITOR
Prof. Dr. Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Paulo Roberto Freire Cunha

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Professora Dra. Leonor Costa Maia

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Dra. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Professora Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

Professora Dra. Alda de Andrade Chiappeta

VICE-COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

Professora Dra. Julianna Ferreira Cavalcante

Aos meus pais, Severino Ramos da Silva
e Lenita Vieira da Silva;

Ao meu esposo Jorge Augusto Vicente;

Aos meus filhos, Thais F. S. Vicente
e Ney A. S. Vicente;

Aos meus irmãos, Glauce C. da Silva,
Ana Júlia S. Nunes, Izaldo R. da Silva,
Paula Regina R. da Silva, Gleice R. da Silva
e Andréa R. da Silva.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela coragem necessária nas horas difíceis, e por me mostrar que nunca estou sozinha. Obrigada DEUS por ser PAI.

A ORIENTADORA, Professora Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, minha gratidão pela oportunidade de desenvolver este trabalho, oferecendo-me, além do acolhimento em seu laboratório, os conhecimentos necessários para o êxito dos objetivos propostos.

A José Maurício dos Santos Filho, e seus orientadores, Dr Ivan da Rocha Pitta, e Dra. Lúcia Fernanda C. da Costa Leite, em disponibilizar o derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, por dividir conosco seus preciosos conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, do setor de meios de cultura-lavagem e esterilização, José Orlando Silva, José Neves de Melo, Luis Carlos da Silva e Gerson Francisco dos Santos; da biblioteca, Janes Ribeiro da Cunha; e da secretaria, Joserina Gusmão de Oliveira e Marineide Pereira da Silva, pela ajuda no desenvolvimento do nosso trabalho.

A secretária do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Maria Suely R. Cavalcanti, pela amizade e presteza com que sempre nos atendeu.

Às companheiras do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Cristiane S. da Rocha, Fernanda Wellingrace, Roberta Rodrigues e Daniela Marinho, pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos meus companheiros do mestrado, Ana Rosa Galdino Bandeira, Andréa Vasconcelos Lobato, Antônio Mário Melo, Daniela Marinho de Souza Pereira, Josimar Alves de Santana, Laudelina Rodrigues Magalhães, Maria Betânia Belmiro dos Santos, Maria do Socorro Duarte e Maria Tereza Corrêa de Lima, pela cumplicidade e bons momentos.

À Coordenação de Apoio ao Ensino Superior, CAPES, pelo apoio financeiro.

Difícil descrever o que sentimos ao encerramento de uma tarefa.
Primeiro, imensa alegria, por termos vencido o desafio; depois alívio, por havermos concluído o que começamos; e por último, saudade de um período trabalhoso, mas profundamente gratificante, e que não voltará mais.

Espírito César Augusto Melero.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. **INTRODUÇÃO**	17
2. **OBJETIVOS**	20
3. **REVISÃO DA LITERATURA**	21
3.1. O Gênero: *Mycobacterium*	21
3.2. A Parede Celular da Micobactérias	23
3.3. Micobactérias Atípicas	26
3.3.1. Classificação	27
3.3.2. Micobactérias Atípicas e Meio Ambiente	29
3.3.3. micobactérias Atípicas e Patogenicidade	30
3.4. Estudo das Drogas	33
3.4.1. *p*-flúor-fenilalanina	34
3.4.2. 1,2,4-oxadiazóis	35
3.4.3. Quinolonas e Flúor-quinolonas	39
3.5. Associações de Drogas	41
4. **MATERIAIS E MÉTODOS**	44
4.1. Microrganismos	44
4.2. Meios de Cultura	44
4.3. Preparação e Padronização do Inóculo	44
4.4. Preparação das Soluções Estoques das Drogas	45
4.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	45
4.5.1. Enumeração Inicial das Bactérias	45

4.5.2. Exposição dos Microrganismos às Drogas 46
4.5.3. Leitura 46
4.6. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) 46
4.6.1. Leitura 47
4.7. Determinação do Efeito Bactericida 47
4.7.1. Princípio 47
4.7.2. Protocolo Experimental 48
4.7.3. Critérios de Interpretação 49

5. **RESULTADOS** 55
5.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima(CBM) 51
5.2. Efeito Bactericida das drogas e de suas associações 53
5.2.1. *Mycobacterium fortuitum* 54
5.2.2. *Mycobacterium smegmatis* 58

6. **DISCUSSÃO** 62

7. **CONCLUSÕES** 66

8. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 68

APÊNDICE A 81

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 – Modelo do envelope celular micobacteriano 24

Figura 2 – Estruturas dos ácidos micólicos do *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* 25

Figura 3 – Estrutura química dos derivados *orto*, *meta* e *p*-flúor-fenilalanina 35

Figura 4 – Estruturas químicas dos isômeros oxadiazóis 1,2,3-oxadiazol (1); 1,2,4-oxadiazol (2); 1,2,5-oxadiazol (3) 1, 3 4-oxadiazol (4) 35

Figura 5 – Estruturas químicas da Oxalamina (5); do Irrigor (6) e do Libexin (7) 36

Figura 6 – Derivados 1,2,4-oxadiazol-5-il-ácido propiônico 37

Figura 7 – Derivados 1,2,4-oxadiazóis, hidrazina (9) e hidrazida (10) 37

Figura 8 – Derivado 3-(4-hidroxi-fenil)-[1,2,4]-oxadiazol-5-ácido carboxílico hidrazida (11) 38

Figura 9 – Estruturas químicas dos derivados flúor-quinolonas, ácido nalidíxico (12); norfloxacina (13); enoxacina (14); ofloxacina (15); ciprofloxacina (16) e lemofloxacina (17) 40

Figura 10 – Típica curva de morte *versus* tempo; a=fase lag; b=fase log; c=fase de recrescimento 43

Figura 11 – Esquema da técnica para determinação *in vitro* da atividade bactericida 50

Figura 12 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum*. Método de diluição em meio líquido 52

Figura 13 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis.* Método de diluição em meio líquido 53

Figura 14 – Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum* 54

Figura 15 – Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum* 54

Figura 16 – Atividade bactericida da associação ofloxacina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum* 55

Figura 17 – Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + ofloxacina frente ao *M. fortuitum* 56

Figura 18 – Atividade bactericida da associação 1,2,4-oxadiazol-hidrazida + ofloxacina + *p*-flúor-fenilalanina frente ao *M. fortuitum* 57

Figura 19 – Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida em suas associações frente ao *M. fortuitum* 57

Figura 20 – Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis* 58

Figura 21 – Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis* 58

Figura 22 – Atividade bactericida da associação ofloxacina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis* 59

Figura 23 – Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + ofloxacina frete ao *M. smegmatis* 60

Figura 24 – Atividade bactericida da associação 1,2,4-oxadiazol-hidrazida + ofloxacina + *p*-flúor-fenilalanina frente ao *M. smegmatis* 61

Figura 25 – Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida em suas associações frente ao *M. smegmatis* 61

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 – As espécies de micobactérias e sua pigmentação 22

Tabela 2 – Micobactérias atípicas e sua presença no ambiente 30

Tabela 3 – Micobactérias atípicas que causam doença no homem 32

Tabela 4 – Valores das CIMs e CBMs para o *M. fortuitum e M. smegmatis* 51

Tabela 5 – Atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida,do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e de suas associações frente ao *M. fortuitum*. 81

Tabela 6 – Diminuição das UFC/mL ($\log_{10}$) do inóculo inicial exposto ao derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, ao p-flúor-fenilalanina , a ofloxacina e às suas associações frente ao *M. fortuitum* 81

Tabela 7 – Atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida,do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e de suas associações frente ao *M. smegmatis*. 82

Tabela 8 – Diminuição das UFC/mL ($\log_{10}$) do inóculo inicial exposto ao derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, ao p-flúor-fenilalanina , a ofloxacina e às suas associações frente ao *M. smegmatis.* 82

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – Arabinogalactana

aGPL – Glicolipopetídios apolares

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATP – Adenosina Trifosfato

ºC – Graus Centígrados

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CTL – Controle

DMSO – Dimetilssulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

ED – Densidade Eletrônica

ET – Transparência Eletônica

F-PHE – Flúor-fenilalanina

GPL – Glicolipopeptidios

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HHBA - Derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida

L_1 e L_2 – Camada Externa da Parede Celular das Micobactérias

LAM – Lipoarabinomanana

Log_{10} – Logaritmo Decimal

m – meta

µg – Micrograma

mL – Mililitro

MOTT – Micobactérias Outras que não as da Tuberculose

MP – Membrana Plasmática

NTM – Micobactérias não Tuberculose

OFLO – Ofloxacina

p – para

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PG – Peptidioglicano

T – Tempo

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

RESUMO

As infecções causadas pelas micobactérias atípicas são freqüentes em pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles contaminados com o HIV. Os quimioterápicos normalmente utilizados não são suficientes, devido a crescente deficiência no tratamento da tuberculose e micobacterioses. Por esta razão, novos experimentos são necessários para obtenção de novas drogas para o tratamento desses pacientes. O objetivo desse estudo foi determinar *in vitro* a atividade bactericida de uma nova hidrazida, [3-(4-hidroxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]- acil - hidrazida e de sua associação com o *p*-flúor-fenilalanina, um inibidor da biossíntese do micosídio-C. Os microrganismos testados *M. fortuitum* e *M. smegmatis* foram isolados de pacientes imunocomprometidos hospitalizados. A atividade bactericida *in vitro* do derivado hidrazínico e *p*-flúor-fenilalanina e sua associação foram estudadas pelo método da curva de morte *versus* tempo (Time Killing Curve). Após 120 horas de exposição foram observados um decréscimo no crescimento de 1,45 ± 0,39 $\log_{10}$ e 2,41 ± 0,17 $\log_{10}$ frente o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, respectivamente. Com a *p*-flúor-fenilalanina não foi observada nenhuma diminuição do crescimento. Nas associações foram observadas as diminuições do crescimento de 1,08 ± 0,59 $\log_{10}$ frente ao *M. fortuitum* e de 2,08 ± 0,25 $\log_{10}$ para o *M. smegmatis*. Não foi verificado recrescimento nas culturas. O derivado hidrazínico demonstrou atividade contra o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, contudo sua atividade não foi acentuada na associação com o *p*-flúor-fenilalanina.

ABSTRACT

Infections caused by atypical are frequent in imunodeficient patients, particularly in HIV infections. The chemoterapics currently used are not sufficient, due to the growing number of the failures in tuberculosis and mycobacteriosis treatments. In this sense, new essays are essential in order to obtain new drugs in this kind of patients. The aim of this study was to determine *in vitro* antimicrobial activities of a new hydrazide, [3-(4-hydroxy-phenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-yl]-acyl-hydrazide alone and combination with *p*-fluorophenylalanine, a inhibitor of mycoside-C biosynthesis. The test organisms *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* was isolated from imunodeficient patients hospitalized. *In vitro* bactericidal activity of hydrazide and *p*-fluorophenylalanine alone and in combination were studied by Time Killing Curve methods.. After 120 hours of exposure growth decreased by 1,45±0,39 $\log_{10}$ and 2,41±0,17$\log_{10}$ to *M. fortuitum* and *M. smegmatis*, respectively. With *p*-fluorophenylalanine alone was not growth decrease observed. In combination was observed growth decrease by 1,08 ± 0,59 $\log_{10}$ to *M. fortuitum* and 2,08 ± 0,25 $\log_{10}$ to *M. smegmatis*. Regrowth was not verified in cultures. Hydrazide show effectiveness against *M. fortuitum* and *M. smegmatis* however this activity was not increased in combination with *p*-fluorophenylalanine.

1 - INTRODUÇÃO

A tuberculose é a doença humana mais importante de etiologia micobacteriana, porém nas últimas décadas outro grupo de micobactérias tem se tornado importante no desenvolvimento de doenças humanas (WOLINSKY, 1979; O'BRIEN, 1989; GROSSET et al, 1991; FALKINHAM, 1996). Essas micobactérias são diferentes do *Mycobacterium tuberculosis*, o clássico bacilo de Koch, por não terem capacidade patogênica específica por isso foram denominadas micobactérias "atípicas" (YOUMANS, 1965; GOOD, 1985).

As micobactérias atípicas são responsáveis por infecções humanas denominadas micobacterioses. Embora a incidência das micobacterioses ainda seja pequena quando comparada com a tuberculose, que possui os alarmantes dados de dois a três milhões de mortes anualmente (incluindo os indivíduos infectados com o Víris da Imunodeficiência Humana, HIV), mais de 8 milhões de novos casos por ano, e a estimativa de 32% ou um terço da população mundial infectada (KOCHI, 1991; ELZINGA; NUM, 2002; GINSBERG, 2002), sua ocorrência tem aumentado principalmente após o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, AIDS. Juntamente com o descobrimento do HIV, o complexo *Mycobacterium avium* foi reconhecido como uma micobacteria oportunista, representando um papel importante na progressão e conseqüência da doença viral (DRAPER, 1998). Em pacientes HIV positivos os membros do complexo *M. avium-intracellulare*, o *M. kansasii*, o *M. fortuitum* e o *M. xenopi* são freqüentemente a causa de doença disseminada (HORSBURK; ELIK, 1989; ELLNER et al, 1991; HORSBURG, 1991).

As micobacterioses não são contagiosas, não se tem relato da transmissão entre pessoas. Seu desenvolvimento geralmente ocorre em pacientes imunocomprometidos, com algumas espécies comumente associadas à doença nosocomial isoladas da água utilizadas nos serviços hospitalares (RENAUD, 1989; DAILLOUX et al, 1999; CAMPOS, 2000).

A quimioterapia das infecções causadas pelas micobactérias atípicas é particularmente problemática, devido a resistência dessas espécies a quase todos os quimioterápicos utilizados contra o *M. tuberculosis* (HEIFETS, 1988, DAUTZENBERG; MIHALTAN, 1991; FALKINHAN, 1996). Tem sido proposto que a

resistência natural das micobactérias se deve a arquitetura da sua parede celular, uma estrutura com várias camadas medindo aproximadamente 33 nm de espessura, cuja camada externa é composta por complexas moléculas anfipáticas os glicolipopeptídios (GPL) ou micosídio-C (DAVID et al, 1987; DAVID; LÉVY-FREBAULT; THOREL, 1988). A camada externa da parede celular das micobactérias pode agir como uma eficiente barreira contra a penetração de algumas drogas (RASTOGI et al, 1981; RASTOGI, 1990; DRAPER, 1998); além de induzir respostas imonomodulatórias ao hospedeiro, e proteger a célula bacteriana no interior do macrófago das células infectadas (LANÉELLE; DAFFÉ, 1991; TAKAYAMA; DATA, 1991; RASTOGI; BARROW, 1994; BARROW, 1997; DRAPER, 1998). Diante da crescente preocupação com os problemas enfrentados durante a quimioterapia das infecções causadas pelas micobactérias, urge o desenvolvimento de novas e efetivas drogas, além do desenvolvimento de regimes quimioterápicos eficientes (RASTOGI; FALKINHAN, 1996).

Desde 1960, os derivados do núcleo 1,2,4-oxadiazóis tem despertado interesse nos químicos farmacêuticos de todo mundo, devido às suas extraordinárias propriedades farmacêuticas (ELOY, 1965; CLAPP, 1976; LEITE et al, 1999; LEITE et al, 2000; SANTOS FILHO, 2002). Alguns desses derivados oxadiazóis apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o *M. tuberculosis*, o *M. leprae*, o *M. fortuitum*, o *M. smegmatis*, e o *M. phlei* (MAILOLI; RUZZIER, 1957; ELOY, 1965; CLAPP, 1976; LEITE et al, 1999; LEITE et al, 2000; SANTOS FILHO, 2002).

Os derivados *orto*, *para*, e mais freqüentemente o *m*-flúor-fenilalanina, foram testados com sucesso, como inibidor do micosídio-C (DAVID et al, 1988; RASTOGI; GOH; DAVID, 1990), e por essa propriedade foi capaz de acentuar a atividade de agentes antimicobacterianos conhecidos (RASTOGI; GOH; DAVID, 1990; RASTOGI; GOH; LABROUSSE, 1993; BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994). O micosídio-C contem um tripeptídio central formado pelos aminoácidos D-fenilalanina-D-halo-treonina-D-alanina, a hipótese é de que esse tripeptídio provavelmente seja sensível à inibição específica por análogos de seus aminoácidos componentes (DAVID et al, 1988; BARROW et al, 1993; DAFFÉ; DRAPER, 1997).

A ofloxacina é uma flúor-quinolona, agente antibacteriano sintético derivado do ácido nalidíxico (ROBBERS; SPEED; TYLER, 1997; TARANTINO, 1997; BRYSKIER; LOWTHER, 2002). As flúor-quinolonas exibem um largo espectro de

atividade antimicrobiana incluindo atividade antimicobacteriana (COLLINS; UTTLEY, 1985; DAVIES; SPAHAM; SPENCER, 1987; TEXIER-MAUGEIN et al, 1987; BRYSKIER; LOWTHER, 2002).

O presente trabalho relata o estudo da atividade bactericida de um novo derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, o [3-(4-hidroxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-acil-hidrazina, sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, do derivado de aminoácido *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e de suas associações frente ao *M. fortuitum* e *M.smegmatis*, isolados de pacientes HIV positivos.

2 – OBJETIVOS

2. 1 – Objetivo Geral

Estudar a atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, [3-(4-hidroxi-fenil)-1,2,4]-oxadiazo-5-il]-acil-hidrazina, da ofloxacina, do derivado de aminoácido *p*-flúor-fenilalanina, e de suas associações frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.

2. 2 – Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, da ofloxacina e do *p*-flúor-fenilalanina;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, da ofloxacina, e do *p*-flúor-fenilalanina;
- Determinar as Cinéticas Bactericidas do derivado 1,2,4-oxadiazol-didrazida, do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e de suas associações.

3 – REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – O Gênero: *Mycobacterium*

A família *Mycobacteriaceae* consiste de um único gênero o *Mycobacterium*. São bastonetes aeróbios, não móveis, não formam esporos, são bacilos retos em culturas novas, ou levemente encurvados em culturas velhas, medindo de 0,2 a 0,6μm de diâmetro por 1,0 a 10μm de comprimento. A propriedade mais distintiva do gênero *Mycobacterium* é a dificuldade de serem corados, contudo uma vez corados pela fucsina fenicada, são resistentes a descoloração por um sistema composto por álcool-ácido, por isso são denominados bacilos álcool-ácido-resistentes (SMITH; WILLETT, 1983; WAYNE; KUBICA, 1989; KONEMAN et al, 2001).

A família inclue uma ampla variedade de tipos nutricionais, com espécies saprófitas presentes nos solos, bem como organismos parasitos que não são cultivados *in vitro* (WOLINSKY, 1979; SMITH; WILLETT, 1983; FALKINHAN, 1996). Os membros patogênicos da família causam duas das infecções humanas mais importantes, a tuberculose e a lepra. Muitas espécies de pássaros, mamíferos e animais de sangue frio são suscetíveis às suas próprias espécies patogênicas, o que ocasionalmente permite, infecções cruzadas entre os animais e o homem (HOSTY; 1975; SMITH; WILLETT, 1983; BENET, 1991; BELAS; FALOON; HANNAFORD, 1995).

O gênero *Mycobacterium* contém atualmente em torno de 60 espécies (Tabela 1) reconhecidas e nomeadas, as quais são divididas em 3 grandes grupos: as micobactérias de crescimento rápido, as micobactérias de crescimento lento, e aquelas espécies ou cepas que não são cultiváveis *in vitro* (GRANGE, 1996). Em 1980, 41 espécies foram incluídas na “Approved Lists of Bacterial Names“ (SKERMAN et al, 1980).

Tabela 1: As espécies de micobactérias e sua pigmentação* (GRANGE, 1996).

Espécies na Approved Lists of Bacterial Names		
Crescimento lento		
M. tuberculosis (N)	*M. bovis* (N)	*M. africanum* (N)
M. microti (N)	*M. kansasii* (P)	*M. marinum* (P)
M. simiae (P)	*M. asiaticum* (P)	*M. gordonae* (S)
M. scrofulaceum (S)	*M. szulgai (S)*	*M. avium* (N)
M. intracellulare (N)	*M. lepraemurium* (N)	*M. paratuberculosis* (N)
M. malmoense (N)	*M. hemophilum* (N)	*M. farcinogenes* (N)
M. triviale (N)	*M. terrae* (N)	*M. nonchromogenicum* (N)
M. ulcerans (N)	*M. gastri* (N)	*M. xenopi* (N)
Crescimento rápido		
M. chelonae (N)	*M. fortuitum* (N)	*M. phlei* (S/P)
M. smegmatis (S/P)	*M. aurum* (S)	*M. gadium* (S)
M. neoaurum (S)	*M. vaccae* (S)	*M. chitae* (S)
M. duvalii (S)	*M. flavescens* (S)	*M. gilvum* (S)
M. komossense (S)	*M. senegalense* (N)	*M. M. parafortuitum* (S)
M. thermoresistibile (S)		
Não cultiváveis		
M. leprae		
Outras espécies devidamente descritas		
Crescimento lento		
M. shimoidei (N)		
M. celatum (N)		
Crescimento rápido		
M. diernhoferi (N)	*M. agri* (N)	*M. austroafricanum* (S)
M. aichense (S)	*M. chubuense* (S)	*M. abuense* (S)
M. rhodesiae (S)	*M. tokaiense* (S)	*M. shinshuense* (S)
M. porcium (S)	*M. fallax* (S)	*M. pulveris* (S)
M. sphagni (S)		
Não cultiváveis (ou muito fastidiosa)		
M. genavense		
M. interjectum		
M. confluentis		
M. intermedium		

* Pigmentação: N, não cromogênica; P, fotocromogênica; S, escotocromogênica.

3.2 - A Parede Celular das Micobactérias

A parede celular das bactérias é uma estrutura que fornece suporte e proteção para a célula, além de possuir mecanismos que permitem a troca de substâncias entre a célula e o meio onde se encontra. Apesar da grande similaridade química e estrutural entre as paredes celulares da maioria das bactérias, o comportamento da sua ultraestrutura diante da coloração de Gram, dividiu as espécies em duas grandes categorias: Gram-positivas e Gram-negativas (BRENNAN; DRAPER, 1994; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000)

As micobactérias são consideradas biologicamente, parte do grupo das bactérias Gram-positivas, embora seu comportamento seja irregular diante dessa coloração, e sua parede celular possua uma diferença considerável. As bactérias Gram-positivas possuem proteínas e polissacarídeos ligados ao peptideoglicano, um polímero responsável pela forma e aspecto próprio da célula bacteriana, enquanto nas micobactérias são encontrados predominantemente lipídios (MINNIKIN, 1991; BRENNAM; DRAPER, 1994; DRAPER, 1998; KHASNOBIS; ESCUYER; CHATERJEE, 2002). O conteúdo lipídico da parede celular das micobactérias é de 30 a 40% do seu peso total (RASTOGI; DAVID, 1988; RASTOGI, 1991; RASTOGI; BARROW, 1994).

Vários modelos da constituição e arquitetura da parede celular micobacteriana têm sido propostos, entretanto, o arranjo de vários componentes da parede celular ainda não está completamente entendido, e em alguns casos é contraditório (DRAPER, 1991; BARROW, 1997; DRAPER, 1998; KHASNOBIS; ESCUYER; CHATERJEE, 2002). Essencialmente, a parede celular micobacteriana é formada por várias camadas , figura 1.

A camada interna é a membrana plasmática, (MP, Figura 1), a qual é similar às membranas encontradas em outras bactérias. A membrana plasmática consiste de uma bicamada lipídica permeável interagindo com proteínas, que cerca o citoplasma da célula (MCNEIL; BRENNAN, 1991; MINNIKIN, 1991; RASTOGI, 1991; BARROW, 1997). A camada seguinte, que ao microscópio eletrônico aparece como uma camada de densidade eletrônica (ED, Figura 1), é encontrada a estrutura peptideoglicana/arabinogalactana que forma a base estrutural da parede celular

(DAVID et al, 1987; RASTOGI; FREHEL; DAVID, 1986; DAVID; LÉVY-FRÉBAULT; THOREL, 1988; BARROW, 1997).

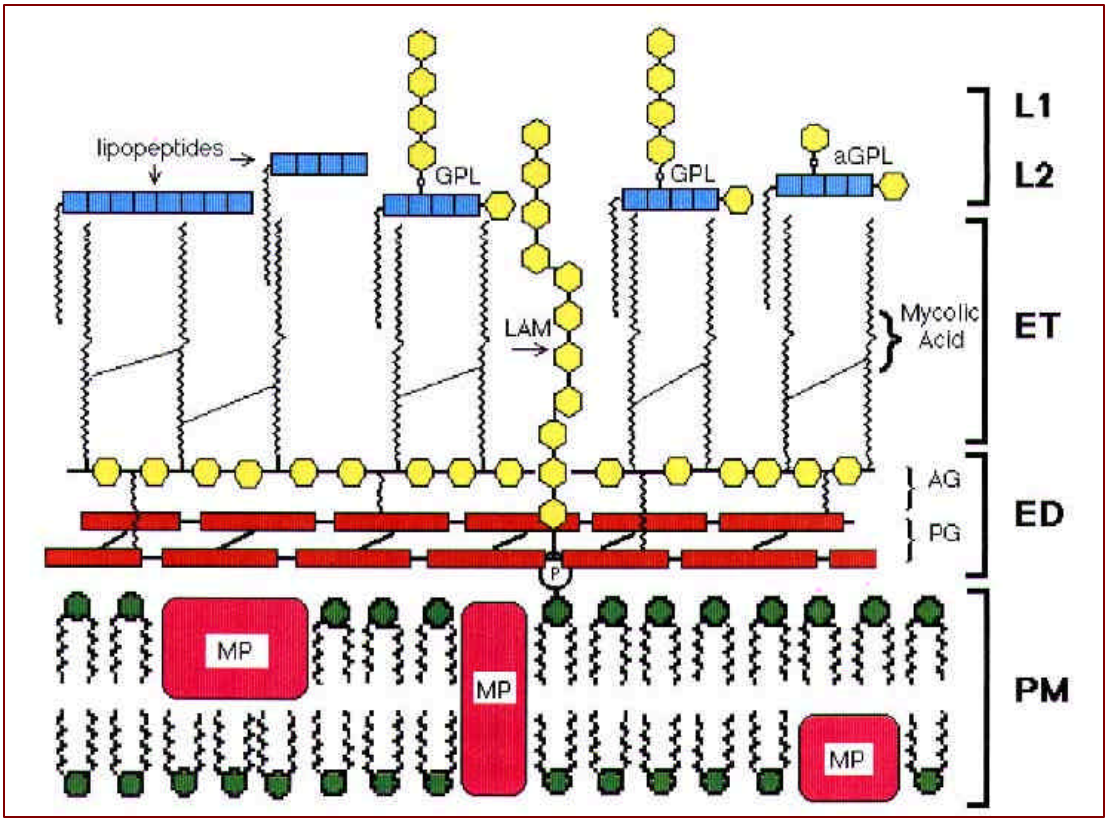


Figura 1: Modelo do envelope celular micobacteriano descrevendo a membrana plasmática (PM), as proteínas de membrana (MP), as camadas de densidade eletrônica (ED), transparência eletrônica (ET), e a camada externa representada por L_1 e L_2. Também estão representados peptideoglicanos (PG), arabinogalactana (AG), ácidos micólicos, lipoarabinimanana (LAM), glicolipopeptídios (GPL), e glicolipopeptídios apolares (aGPL) (BARROW, 1997).

A estrutura é uma macromolécula constituída do polímero peptidioglicano, um oligossacarídio formado por unidades dissacarídicas de *N*-acetil-glicosamina e ácido *N*-glicolilmurâmico contendo ligações cruzadas de pequenos peptídios, e arabinogalactana, um complexo polissacarídio ramificado. A camada seguinte é a camada de transparência eletrônica (ET) sob observação ao microscópio eletrônico. Na camada ET são encontrados os ácidos micólicos, que são ácidos graxos ramificados de cadeia longa 2-alquil-3-hidroxi, com variações entre as espécies bacterianas, como pode ser observada na figura 2 (BARRY; MDLULI, 1996;

BARROW, 1997; BARROW et al, 1998; DRAPER, 1998; KHASNOBIS; ESCUYER; CHATERJEE, 2002).

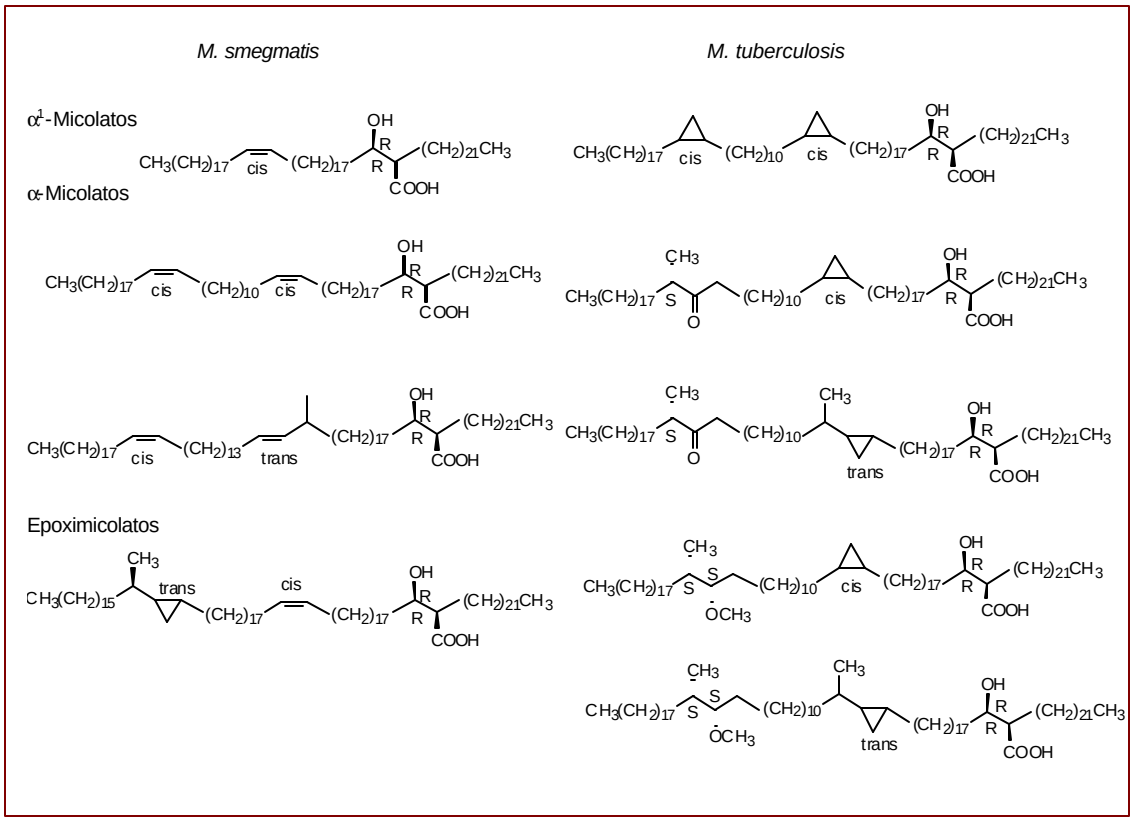


Figura 2: Estruturas dos ácidos micólicos do *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* (KHASNOBIS; ESCUYER; CHATTERJEE, 2002)

E finalmente a camada mais externa da parede celular, referida como L_1 e L_2 (Figura 1). A camada externa contém polissacarídios, glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios, sulfolipídios e outros lipídios complexos (MINNIKIN, 1991; RASTOGI, 1991), também são encontradas a arabinomanana extensão do polímero lipoarabinomanana (MCNEIL; BRENNAN, 1991; RASTOGI, 1991).

Entretanto, os principais componentes da camada externa são os glicolipopeptídios (GPL) ou micosídios-C, antígenos sorotipo específicos únicos nas micobactérias (BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994; BARROW, 1997; DRAPER, 1998), e também os componentes estruturalmente semelhantes os

glicolipopeptídios apolares (aGPL), os quais não possuem a extensão oligosacadírica da porção peptícica da molécula (BARROW et al, 1993).

Ao contrário da camada intermediária ET e da camada interna ED, a camada externa da parede micobacteriana é muito variável entre as espécies, sendo encontradas diferenças entre variantes da mesma espécie (MCNEIL; BRENNAN, 1991; BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994).

A camada externa da parede celular das micobactérias, juntamente com a camada intermediária contendo os ácidos micólicos, têm sido consideradas responsáveis pela resistência a múltiplas drogas dessas bactérias (RASTOGI et al, 1981; RASTOGI; FREHEL; DAVID, 1986; DRAPER, 1998).

A camada externa é ainda apontada como indutora de várias respostas ao hospedeiro, e ajudar a proteger a micobactéria dos efeitos danosos do ambiente fagolisossomal do macrófago hospedeiro (LANÉELLE; DAFFÉ, 1991; TAKAYAMA; DATA, 1991; RASTOGI; BARROW, 1994; BARROW, 1997; DRAPER, 1998).

3.3 – Micobactérias Atípicas

Koch descreveu o bacilo responsável pela tuberculose humana em 1882, uma década depois outras variedades conhecidas como bovinas, aviária, saprófitas dentre outras foram identificadas e nomeadas de acordo com a origem (WOLINSKY, 1979; BENET, 1991). Relatos esporádicos do isolamento oriundo de material humano de uma micobactéria diferente do clássico bacilo da tuberculose começaram em 1885, com a descrição do bacilo smegma (LUSGARTEN, 1985; WOLINSKY, 1992). Com o aumento desses isolamentos em meados da década de 30 e no início da década de 50, o conceito de micobacterioses humanas atribuídas a outras micobactérias foi estabelecido (WOLINSKY, 1992).

Em 1931, Piners descobriu que esses microrganismos são diferentes do *M. tuberculosis* por sua falta de virulência em cobaias e pouca resposta a drogas antituberculose (YOUMANS, 1963; KULLAVANIJAYA, 1999). Runyon em 1954 introduziu a denominação “atípicas”, para indicar que elas eram diferentes do *M. tuberculosis*, por não terem capacidade patogênica específica (GOOD, 1985).

As espécies *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* são as micobactérias que predominantemente são patogênicas para o homem. Contudo, outras micobactérias foram reconhecidas como potencialmente patogênicas para o homem. Essas micobactérias têm sido identificadas por uma variedade de termos, incluindo micobactérias não tuberculosas (NTM), micobactérias atípicas, micobactérias outras que não as da tuberculose (MOTT), e micobactérias patógenas oportunistas (GOOD, 1985; WAYNE, 1985; KULLAVANIJAYA, 1999).

A denominação micobactérias não tuberculose ou atípicas, porém, não é devidamente correta, visto que as espécies incluídas neste grupo, também são álcool-ácido-resistentes como os componentes do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, e *M. microti*). Desse modo, mesmo que as manifestações clínicas das infecções causadas por alguns componentes desse grupo sejam semelhantes àquelas da tuberculose, são consideradas atípicas, porque o agente etiológico não é um membro do complexo *M. tuberculosis* (GOOD, 1985; WAYNE, 1985).

3.3.1 – Classificação

Timpe e Runyon em 1954 descreveram micobactérias isoladas de 120 pacientes, as quais foram geralmente cromogênica, não patogênica em cobaias, e consideradas saprófitas. Os três grupos de isolados identificados foram divididos com base na morfologia da colônia e produção de pigmento (TIMPE; RUNYON, 1954; YOUMANS, 1963; GOOD, 1985; KULLAVANIJA, 1999).

Em 1959 Runyon introduziu a classificação das micobactérias atípicas em 4 grupos. Esta foi baseada na taxa de crescimento, morfologia da colônia, e produção de pigmento característico em meio Lowenstein-Jensen (RUNYON, 1959; YOUMANS, 1963; KULLAVANIJA, 1999).

De acordo com Runyon, as micobactérias atípicas quando cultivadas a 37ºC, são agrupadas em microrganismos de crescimento rápido (3-5 dias) e microrganismos de crescimento lento (2-3 semanas). As micobactérias de crescimento lento são classificadas de acordo com a formação de seus pigmentos

característicos no meio de cultura: grupo I ou fotocromogênicas, as que formam pigmento quando expostas à luz, as colônias são normalmente lisas; grupo II ou escotocromogênicas, quando formam pigmento independente de exposição à luz, as colônias são quase sempre lisas; grupo III ou não cromogênicas, são as micobactérias não pigmentadas, colônias pequenas, lisas e circulares; e o grupo IV das micobactérias de crescimento rápido (RUNYON, 1959; YOUMANS, 1963; KULLAVANIJA, 1999).

A classificação de Runyon continua sendo útil, para uma identificação prévia dos isolados clínicos. A descoberta de que o crescimento e a produção de pigmento variam com a temperatura, outros meios mais eficientes fizeram-se necessários (EISENSTADT; HALL, 1995; PORTAELS, 1995). Um novo sistema baseado no potencial patogênico das espécies, adicionado aos caracteres morfológicos constitui uma contribuição ao sistema de RUNYON (O'BRIEN 1987; WALLACE et al, 1990; EISENSTADT; HALL, 1995; PORTAELS, 1995).

Do ponto de vista clínico, as micobactérias podem ser divididas em três grupos: o primeiro inclui os patógenos estritos para o homem e os animais, são os membros do complexo *M. tuberculosis, M. leprae, M. paratuberculosis*, e *M. lepraemurium*; o segundo grupo consiste de micobactérias potencialmente patogênicas para o homem ou animais – patogênicos em circunstâncias especiais; o terceiro grupo é constituído por espécies saprófitas e não patogênicas ou somente excepcionalmente patogênicas. O segundo e terceiro grupo da classificação clínica constitui o grupo das micobactérias atípicas (O'BRIEN 1987; WALLACE et al, 1990; EISENSTADT; HALL, 1995; PORTAELS, 1995).

Atualmente tem aumentado o uso da tecnologia do DNA recombinante, para classificação taxonômica e identificação das micobactérias (BAESS; BENTZON, 1978; O'BRIEN et al, 1987; SALFINGER; PFYFFER, 1994; GRANGE, 1996; SOLA et al, 1998; HORGEN; SOLA; RASTOGI, 1998). Os primeiros estudos foram para estabelecer o percentual de homologia entre as espécies de micobactérias, em seguida sondas específicas para cada espécies foram desenvolvidas e disponibilizadas comercialmente (BAESS; BENTZON, 1978; SALFINGER; PFYFFER, 1994; BELAS; FALOON; HANNAFORD, 1995; SOLA et al, 1998). A vantagem do uso das técnicas do DNA recombinante é a possibilidade de identificação das micobactérias não-cultiváveis ou aquelas muito fastidiosas, uma vez que o DNA necessário pode ser amplificado por reação em cadeia da

polimerase, PCR, e analisada pela seqüência de extensão do “primer” (KIRSCHNER, 1993; BUTCHER et al, 1996; GRIFFITHS et al, 1998; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

3.3.2 – Micobactérias atípicas e Meio Ambiente

As micobactérias atípicas podem ser encontradas em toda parte no meio ambiente (Tabela 2). Elas são amplamente distribuídas em águas, solos úmidos, poeira caseira, laticínios, animais de sangue frio e plantas (HOSTY, 1975; GOSLEE; WOLINSKY, 1976; BELAS; FALOON; HANNAFORD, 1995). Certas espécies são comuns na natureza, enquanto outras são encontradas somente em ambientes artificiais, como reservatórios de água, piscinas, e tanques para piscicultura. Algumas espécies parecem ser raras na natureza, e outras tais como as patogênicas estritas, são isoladas do ambiente, após contaminação pelo homem ou animal infectado, como é o caso do *M. tuberculosis*, podendo algumas vezes ser encontrado em águas residuais (WALLACE, 1990; PORTAELS, 1995; FALKINHAM, 1996; DAILLUX, 1999). Por essa ampla distribuição no meio ambiente, ocorre uma colonização temporária ou permanente de alguns tecidos no homem como a pele, nasofaringe, bronquios e mucosa intestinal, sem serem responsáveis por nenhuma doença (WALLACE, 1990; PORTAELS, 1995; GRANGE, 1996).

Entre as espécies aquáticas, o *M. gordonae* e *M. flavescens*, normalmente não patogênicas, são as mais comuns. As espécies *M. fortuitum* e *M. chelonae*, que causam lesões em mucosas, ossos, e doença pulmonar, também são contaminantes comuns da água. O *M. avium*, agente inflamatório de nódulos cutâneos, é isolado freqüentemente de água fresca, aquários, e piscinas. O *M. kansasii* e *M. xenopi*, responsáveis por doenças pulmonares, são especialmente encontrados em sistemas de distribuição de água (FALKINHAM, 1996; DAILLOUX et al, 1999; CAMPOS, 2000).

Tabela 2: Micobactérias atípicas e sua presença no ambiente (PORTAELS, 1995).

Presença no ambiente	Potencialmente patogênicas	Normalmente saprófitas
Ambiente natural		
Freqüente	MAC*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*	*M. gordonae, M. terrae, M. nonchromogenicum*
Não freqüente	*M. avium, M. intracellulare, M. chelonae, M. simiae, M. asiaticum, M. marinum, M. malmoense*	*M. flavescens, M. vaccae, M. aurum, M. gastri, M. smegmatis, M. thermoresistibile*
Ambiente artificial		
Freqüente	*M. kansasii, M. xenopi, M. avium, MAC*	**M. gordonae**
Não freqüente	**M. marinum**	
Não(ainda) encontrada no ambiente	*M. ulcerans, M. szulgai , M. genavense, M. shimoidei, M. celatum, M. haemophilum*	**M. triviale**

*O complexo *M. avium* (MAC) inclui várias espécies "ambientais" parecidas com *M. avium* e *M. intracellulare* ou que tenham características intermediárias comuns a essas espécies.

O *M. ulcerans, M. haemophilum, M. genavense*, e *M. szulgai*, apesar de nunca terem sido isolados do meio ambiente, a epidemiologia das doenças causadas por essas micobactérias sugere que elas estão presentes no meio ambiente (PORTAELS, 1995).

3.3.3 – Micobactérias atípicas e Patogenicidade

Embora a incidência das micobacterioses ainda seja pequena quando comparada com a tuberculose, sua importância vem tornando-se crescente. Geralmente as micobacterioses não são contagiosas, a transmissão de pessoa-a-pessoa não é conhecida, e não se sabe se a doença se desenvolve rapidamente depois da infecção ou se, como no caso da tuberculose, permanece latente no

hospedeiro podendo se desenvolver ou ser reativada posteriormente (O'BRIEN, 1989; WALLACE et al, 1990; PORTAELS, 1995; FALKINHAM, 1996; DAILLOUX et al, 1999; CAMPOS, 2000).

A infecção se dá por inalação das micobactérias aerossolizadas, a ingestão de água ou alimento contaminado, penetração através das mucosas e percutânea; ferimentos, infecções e cirurgia também podem facilitar a micobactéria entrar no hospedeiro (O'BRIEN, 1989; RENAUD et al, 1989; WALLACE et al, 1990; FALKINHAM, 1996; KULLAVANIJAYA, 1999).

Os reservatórios de água são as fontes naturais, para a maior parte das infecções causadas pelas micobactérias atípicas, como o *M. fortuitum*, *M. chelonae* , e *M. abscessus*, comumente associadas à doença nosocomial (RENAUD, 1989; DAILLOUX et al, 1999; CAMPOS, 2000). Enquanto que as micobactérias aerossolizadas, têm um papel importante no comprometimento pulmonar, e a colonização gastrointestinal é apontada como ponto de partida para a infecção dos pacientes com AIDS (O'BRIEN, 1989; RENAUD, 1989; DAILLOUX et al, 1999; CAMPOS, 2000).

O desenvolvimento das micobacterioses habitualmente ocorre em pacientes com problemas médicos, como doença pulmonar preexistente ou imunocomprometidos. A condição imunológica do hospedeiro determina o avanço da doença, disseminada ou localizada, das suas principais manifestações clínicas: doença pulmonar, linfoadenite, lesões na pele ou tecidos moles, sendo a forma pulmonar mais freqüente (O'BRIEN, 1989; WALLACE, 1990; FALKINHAM, 1996; CAMPOS, 2000).

A incidência das micobactérioses aumentou com a disseminação da AIDS. Em pacientes infectados com o HIV, o complexo *M. avium-intracellulare* é a espécie predominante causando doença disseminada, envolvendo o sangue e múltiplos órgãos (ELLNER et al, 1991; HORSBURG, 1991).

Na tabela 3, estão representadas as espécies que causam doenças no homem, sua classificação de Runyon, e suas implicações clínicas.

Tabela 3: Micobactérias atípicas que causam doença no homem (O'BRIEN, 1989; GROSSET *et al.*, 1991).

Espécies	Principais apresentações clínicas
Grupo I: fotocromogênicas	
M. kansasii	pulmonar, linfoadenite
M. marinum	lesões na pele
M. simiae	pulmonar
M. asiaticum	pulmonar
Grupo II: escotocromogênicas	
M. scrofulaceum	linfoadenite, pulmonar
M. xenopi	pulmonar
M. szulgai	pulmonar
M. gordonae	não-patogênica*
M. flavescens	não-patogênica*
Grupo III: não-cromogênicas	
Complexo *M. avium-intracellulare*	pulmonar, doença disseminada, linfoadenite
M. malmoense	pulmonar
M. haemophillum	lesões na pele e mucosas
M. terrae	não-patogênica*
M. ulcerans	abscessos na pele
M. noncromogenicum	abscessos na pele
M. gastri	não-patogênica*
Grupo IV: crescimento rápido	
M. fortuitum	lesões nas mucosas e ossos, e pulmonar
M. chelonae	lesões nas mucosas e ossos, e pulmonar
M. thermoresistible	não-patogênica*
M. M. neoaurum	não-patogênica*
M. vaccae-aurum	não-patogênica*
M. phlei	não-patogênica*
M. smegmatis	não-patogênica*

*Normalmente saprófitas mas têm sido encontras em isolados clínicos.

3.4 – Estudo das Drogas

Desde 1982, a freqüência de doenças atribuídas as micobactérias atípicas, principalmente ao complexo *M. avium*, as chamadas micobacterioses, tem aumentado, especialmente em pessoas com AIDS e pessoas imunocomprometidas por: câncer, transplante de órgão ou administração de drogas imunossupressoras (PORTAELS, 1995; DAILLOUX et al, 1999). O complexo *M. avium* e outras micobactérias atípicas são geralmente a causa mais comum de infecções bacterianas sistêmicas em pacientes com AIDS nos Estados Unidos, e estão associadas com a morbidade e sobrevida destas pessoas imunocomprometidas (HORSBURGH, 1991; ELLNER et al, 1991; SEPKOWITZ et al, 1995; LAGRANGE et al, 2000).

Embora os regimes terapêuticos para o controle clínico das micobacterioses tenham melhorado, as opções de tratamento para estas infecções em pacientes imunocomprometidos permanecem limitadas por causa da intrínseca resistência a vários quimioterápicos por esses microrganismos. A maioria dos isolados clínicos das micobactérias atípicas é resistente a quase todos os medicamentos testados em concentrações clínicas estabelecidas para o *M. tuberculosis* (HEIFETS, 1988; WALLACE et al, 1990; CHAN-TOPKINS, 1995; MITCHISON, 1996).

A resistência das micobactérias atípicas é observada para várias drogas, quando essas são utilizadas sozinhas. Esse fato reforça o argumento de que a terapia com uma única droga deveria ser evitada (WALLACE et al, 1990; DAUTZENBERG, MIHALTAN, 1991; FALKINHAM, 1996).

Algumas hipóteses sobre mecanismos de resistência para drogas das micobactérias têm sido relatadas. Mutações genéticas envolvendo mudanças em alvos específicos de determinadas drogas têm sido o mais importante mecanismo defendido pelos pesquisadores (ZHANG et al, 1992; BANERJEE et al, 1994, ROUSE; MORRIS, 1995; RASTOGI; FALKINHAM, 1996). Um outro possível mecanismo é a adaptação. A resistência por adaptação requer exposição contínua a droga, a causa sugerida tem sido o crescimento lento das micobactérias atípicas. Durante o seu desenvolvimento, as células são capazes de liberar substâncias como

proteínas, pigmento e polissacarídios, as quais podem ser agentes antagônicos à atividade da droga (FALKINHAM, 1996).

Outro mecanismo proposto é o da parede celular micobacteriana como barreira de exclusão. Nesse mecanismo proposto por estudos realizados com o *M. avium*, a resistência às drogas estaria associada, à arquitetura da parede celular. Dessa forma, o envelope do *M. avium* atuaria como uma barreira de exclusão, para prevenir ou reduzir a penetração da droga, evitando, assim atingir seus sítios-alvo (RASTOGI et al, 1981; RASTOGI; FREHEL; DAVID, 1986; RASTOGI, 1990; DRAPER, 1998). A camada externa da parede celular das micobactérias apontada como uma das responsáveis por essa barreira de exclusão é composta principalmente por glicolipopeptídios (GPL) ou micosídio-C, uma complexa molécula contendo lipídios, acúcares e um tripeptídio formado pelos aminoácidos D-fenilalanina-D-halo-treonina-D-alanina (DAVID et al, 1988; BARROW et al, 1993; DAFFÉ; DRAPER, 1997; EHLERS, 1998).

A inibição da biossíntese da parede celular não é somente uma importante estratégia antimicobacteriana, mas também aumenta a sensibilidade da bactéria para outros agentes quimioteápicos (TRIPATHI et al, 2002).

3.4.1 – *p*–flúor–fenilalanina

Os derivados de aminoácido *orto, meta*, e *p*-flúor-fenilalanina (Figura 3), nomenclatura oficial 2-Amino-3-(2-flúor-fenil)-ácido propriônico, 2-Amino-3-(3-flúor-fenil)-ácido propriônico, e 2-Amino-3-(4-flúor-fenil)-ácido propriônico, respectivamente, inibiram a biossíntese do micosídio-C. Eles foram testados como inibidores de uma hipotética enzima D-fenilalanina racemase, enzima requerida para converter a L-fenilalanina em D-fenilalanina na rota biossintética do núcleo peptídico do micosídio-C (DAVID et al, 1988). Contudo o flúor-fenilalanina não inibiu somente a incorporação da L-fenilalanina, mas também inibiu a incorporação da L-treonina e L e D-alanina, como efeito secundário (DAVID et al, 1988).

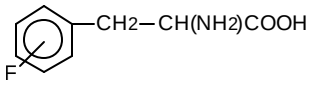


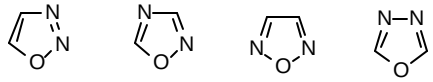
Figura 3: Estrutura química dos derivados o*rto*, *meta* e *p*-fluor-fenilalanina.

Esses derivados associados com a rifampina, a ofloxacina e a ciprofloxacina, em concentrações sub-CIM têm potencializado os seus efeitos antimicobacterianos. O dano causado na parede celular permite a passagem da droga, cujo efeito sinérgico foi observado (DAVID et al, 1988; RASTOGI; GOH; DAVID, 1990; BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994).

Tais resultados levaram os pesquisadores a concluírem, que o efeito inibitório dos derivados flúor-fenilalanina sobre a biossíntese do GPL não é letal, mas é suficiente para desorganizar a parede celular, e permitir o acesso do agente antimicobacteriano, resultando no efeito sinérgico observado (BARROW et al, 1994; RASTOGI et al, 1994).

3.4.2 – 1,2,4-oxadiazóis

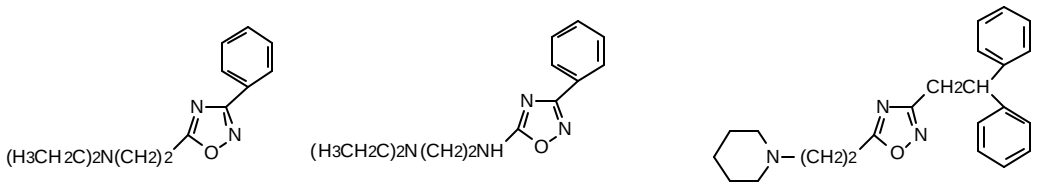
Desde 1960, o núcleo oxazolidínico despertou o interesse de pesquisadores por terem extraordinárias propriedades farmacêuticas (ELOY, 1965; CLAPP, 1976; LEITE et al, 2000). Embora existam quatro isômeros dos oxadiazóis (Figura 4), os anéis 1,2,4-oxadiazol (2) e 1,3,4-oxadiazol (4), têm sido os mais explorados, uma vez que é com eles que tem se obtido melhores resultados farmacológicos e por possuírem maior número de bioisósteros ativos (SANTOS FILHO, 2002).



(1) (2) (3) (4)

Figura 4 - Estruturas químicas dos isômeros oxadiazóis 1,2,3-oxadiazol (1); 1,2,4-oxadiazol (2); 1,2,5-oxadiazol (3) e 1,3,4-oxadiazol (4).

Três oxadiazóis (Figura 5), o dietil-[2-(3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-etil]-amina (5), o *N,N*-dietil-*N*-(3-fenil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-atano-1,2-diamina (6) e o [3-(2,2-difenil-etil-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-2-piperidina-1-il-etil (7) , alcançaram popularidade como drogas terapêuticas sendo conhecidas pelos seguintes nomes comerciais: Oxolamina (5) desenvolvido em 1960, Irrigor (6) em 1964, e Libexin (7) em 1966. A Oxolamina e o Libexin são agentes inibidores da tosse e o Irrigor é um vaso dilatador caronariano e anestésico local.

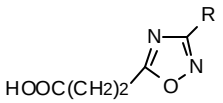


(5) (6) (7)

Figura 5 - Estruturas químicas, da Oxolamina (5); do Irrigor (6) e do Libexin (7).

Os derivados oxadiazóis têm demonstrado uma grande variedade de atividades terapêuticas, tais como: antipasmódica, dilatadores coronários, anestésicos bcais, sedativos, anticonvulsinantes, inibidores da tosse, redutores da tonicidade, analgésico, anti-inflamatório, anti-helmíntico, e atividade ganglioplégica (ELOY, 1965; CLAPP, 1976).

Os derivados oxadiazóis 1,2,4-oxadiazol-5-il-ácido propiônico (8), figura 6, em baixa concentração, possui atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* e outras bactérias, sejam elas, Gram-positivas ou Gram-negativas (MAIOLI; RUZZIER, 1957).



(8)

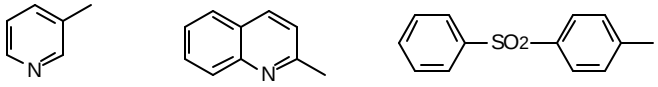
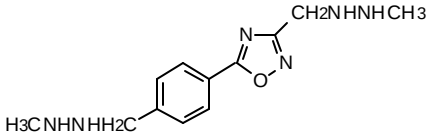
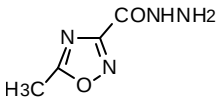
R = 

Figura 6 - Derivados 1,2,4-oxadiazol-5-il-ácido propiônico (8).

O derivado *N*-metil-*N*-{5-[4-(*N*-metil-hidrazina-metil)-fenil]-[1,2,4]oxadiazol-3-il-metil}-[hidrazina (9) - figura 7, possui atividade anticâncer, e o derivado (5-metil-1,2,4]oxadiazol-3-il-metil)-hidrazida (10) - figura 7, é eficaz contra tuberculose e lepra (CLAPP, 1976).



(9)



(10)

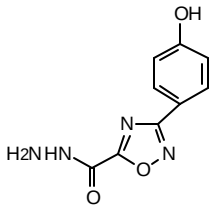
Figura 7 - Derivados 1,2,4-oxadiazóis, hidrazina (9) e hidrazida (10).

O crescente interesse pelo anel 1,2,4-oxadiazol, figura 3 estrutura (4) levou a obtenção de derivados com atividade antiviral (DIANA et al, 1994), antifúngica (RAI; KAUR, 1982), herbicida (ANON, 1990), analgésica e anti-inflamatória (AFIATPOUR et al, 1994; LEITE et al, 1999).

Leite et al (2000), sintetizaram e testaram a atividade anti-inflamatória e antimicrobiana de uma série de derivados 1,2,4-oxadiazóis peptidomiméticos. Alguns destes derivados demonstraram boa atividade anti-inflamatória dose dependente

contra o edema provocado pela carragenina, e atividade antimicrobiana frente microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Santos Filho (2002) planejou, sintetizou e testou a atividade de uma série de novos derivados 1,2,4-oxadiazol-acil-hidrazona e 1,2,4-oxadiazol-tiossemicarbazida. Esses derivados apresentaram-se ativos frente a duas linhagens de *Plasmodium falciparum*. Estes mesmos derivados foram testados contra duas espécies de bactérias Gram-positivas, duas Gram-negativas, três bacilos álcool-ácido resistentes, e duas leveduras, sem ter sido evidenciada qualquer atividade frente aos microrganismos testados. Entretanto, foram observados resultados interessantes para o derivado [3-(4-hidroxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]- acil-hidrazina (11), figura 8, frente ao *M. fortuitum*, *M. phlei* e *M. smegmatis* . No teste de atividade utilizando o método de Kirby-Bauer, o derivado 1,2,4-oxadiazol-didrazida apresentou halos de inibição de 3,5cm, para o *M. fortuitum*; 3,0cm para o *M. phlei*, e 1,6cm para *o M. smegmatis*.



(11)

Figura 8 - Derivado 3-(4-hidroxi-fenil)-[1,2,4]-oxadiazol-5-ácido carboxilico-hidrazida (11).

Pela versatilidade das ações biológicas e por possuir grande número de bioisósteros eficientes, o anel 1,2,4-oxadiazol é matéria de interesse de químicos medicinais do mundo inteiro (SANTOS FILHO, 2002).

3.4.3 – Quinolonas e Flúor-quinolonas

Desde a introdução do ácido nalidíxico (12), figura 9, em 1962, como agente antimicrobiano, outras drogas estruturalmente relacionadas tem sido sintetizadas (JANKNETGT, 1986; BRYSKIER; LOWTHER, 2002). As quinolonas de primeira geração apresentavam um perfil farmacocinético desfavorável com baixas concentrações séricas, uma curta meia-vida, e uma baixa atividade antimicrobiana *in vitro*, o que restringiu o seu uso apenas contra infecções do trato urinário (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; TARANTINO, 1997).

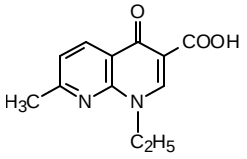
Na década de 80, a introdução de um átomo de flúor na posição 6 do anel 1,8-naftiridina, resultou em um melhor espectro de atividade, daí a denominação flúor-quinolonas, figura 9 (JANKNETGT, 1986; TARANTINO, 1997; PAGE et al, 1999). A primeira droga sintetizada nesse grupo foi a norfloxacina (13), seguida da enoxacina (14), ofloxacina (15), a ciprofloxacina (16), e a lomefloxacina (17) (COURVALIN, 1985; TARANTINO, 1997; ROBBERS; SPEED; TYLER, 1997; PAGE, 1999).

A estrutura química de todas as flúor-quinolonas é caracterizada pela presença de um ciclo piridina-β-carboxilíco, com uma função cetona na posição 4 e a função ácido carboxílico na posição 3. Elas diferem entre si pela natureza do radical ligado ao átomo de nitrogênio na posição 1, e pelos substituintes aril na posição 7 (COURVALIN, 1985; TARANTINO, 1997; PAGE et al, 1999).

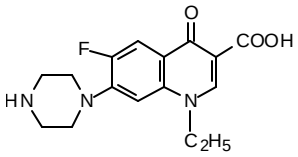
As flúor-quinolonas exibem um amplo espectro antibacteriano de atividade (WOLFSON; HOOPER, 1985; JANKNEGT, 1986; BRYSKIER; LOWTHER, 2002). Estudos demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BAUERNFEIND; ULLMANN, 1984; CAEKENBERGUE; PATTYN, 1984), bactérias aeróbicas (SUTTER; KWOK; BULKACZ, 1985; AUCKENTHALER; MICHÉA-HAMZEHPOUR; PECHÉRE, 1986), e micobactérias (COLLINS; UTTLEY; 1985; DAVIES; SPARHAM; SPENCER, 1987; TEXIER-MAUGEIN et al, 1987).

A sua atividade antimicrobiana é devida à inibição da DNA girase (STRATTON, 1996), uma enzima ATP dependente, membro do grupo das topoisomerases, enzimas que regulam a superhelicidade do DNA das células (SNYDER; CHAMPNESS, 1997). A DNA girase é composta por duas subunidades, a

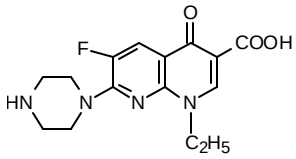
subunidade A e B, que se ligam juntas ao DNA durante os processos de replicação ou transcrição, hidrolisa o ATP e introduz o super-enrolamento negativo do DNA bacteriano, a inibição desse super-enrolamento negativo provoca inibição da replicação do DNA e morte celular (DESPLACES et al, 1986; STRATTON, 1996; SNYDER; CHAMPNESS, 1997). O mecanismo exato de ação não é conhecido, porém supõe-se ocorrer a quebra do DNA cromossomal pela DNA girase (WOLFSON; HOOPER, 1985). A resistência às flúor-quinolonas envolve principalmente a mutação na DNA girase, permeabilidade alterada, ou a combinação dos dois mecanismos (WOLFSON; HOOPER, 1985; HALLETT; MAXWELL, 1991; MONIOT-VILLE et al, 1991; RISE; BONOMO, 1996).



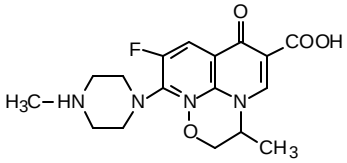
(12)



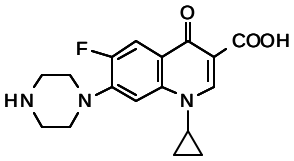
(13)



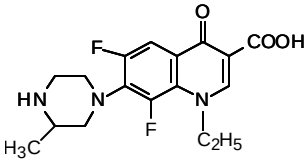
(14)



(15)



(16)



(17)

Figura 9 - Estruturas químicas dos derivados flúor-quinolonas, ácido nalidíxico (12); norfloxacina (13); enoxacina (14); ofloxacina (15); ciprofloxacina (16) e lomefloxacina (17).

3.5 – Associações de drogas

No tratamento clínico, a combinação de drogas é freqüentemente utilizada, no tratamento de infecções graves em pacientes com suspeita de sepsis (KROGSTAD; MOELLERING, 1986). No geral, as circunstâncias essenciais que motivam a utilização de uma associação de drogas na terapia são: tratamento urgente de uma infecção grave não diagnosticada; infecção por múltiplos germes (infecção polimicrobiana); o risco de seleção de mutantes resistentes; aumento do efeito microbicida; diminuição de doses tóxicas relatadas (COURVALIN, 1985; KROGSTAD; MOELLERING, 1986).

A avaliação *in vitro* do efeito das associações é realizada utilizando a técnica da curva de morte *versus* tempo, onde a dinâmica da atividade microbicida das drogas ou de suas associações, são acompanhadas por um determinado período de tempo. Os dados são interpretados, comparando-se os resultados obtidos da associação com a droga mais ativa. A associação é classificada como sinérgica, antagônica, indiferente ou aditiva. Sinergismo é definido como um aumento de ≥100 vezes do número de morte microbiana em um período de 24 horas, comparado com o efeito da droga mais ativa; o antagonismo como uma diminuição de ≥100 vezes no número de mortes microbiana em 24 horas; efeito indiferente ocorre quando a variação é inferior a 10 vezes, aumento ou diminuição, no número de mortes em 24 horas; e o efeito aditivo ocorre, quando o resultado da associação é igual a soma dos efeitos de cada antibiótico estudado isoladamente na mesma concentração (KROGSTAD; MOELLERING, 1986; PAGE et al, 1999).

Nas últimas três décadas, tem se dado um contínuo aumento no uso da farmacodinâmica, para descrever o andamento da atividade antimicrobiana exibida por várias drogas. A farmacodinâmica estuda a relação da concentração no soro e os efeitos farmacológicos e toxicológicos de uma determinada droga em teste (CRAIG, 1995; 1998; LI, 2000).

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), são técnicas realizadas *in vitro*, que têm sido os parâmetros mais usados para quantificar a atividade de um antibiótico frente a um patógeno infectante, além de serem medidas convencionalmente utilizadas para ajudar na seleção de drogas

para uso clínico (CRAIG, 1995; LI, 2000). A CIM é definida como a menor concentração da droga, que não permite o desenvolvimento microbiano visível de inóculos padronizados, após serem expostos a uma série de diluições da droga e incubados por 18-24 horas a 35-37ºC em caldo; enquanto a CBM é a menor concentração da droga, que provoca uma diminuição de 99,99% de bactérias viáveis, em comparação com o inóculo inicial não submetido ao antibiótico, nas mesmas condições experimentais estabelecidas para a determinação da CIM (COURVALIN, 1985; CRAIG, 1995; LI, 2000).

Contudo, esses parâmetros fornecem um único ponto de observação durante o experimento. A CIM e CBM são determinadas após uma noite de exposição a uma concentração estável de um antimicrobiano, é um processo falho para avaliar a taxa ou extensão do início da ação bactericida, bem como os efeitos da mudança na concentração do inóculo e mudanças da concentração da droga sobre os eventos antibacterianos.

A CIM e CBM não informam as mudanças ocorridas no decorrer do tempo na quantidade de células bacterianas viáveis, além de não fornecer dados sobre a seqüência de eventos, que ocorre entre o antibiótico e a bactéria durante o período de incubação, o que torna insuficientes o uso funcional dessas medidas para definir a farmacodinâmica da droga (LI, 2000).

Essas informações adicionais são fornecidas pelo estabelecimento da curva de morte *versus* tempo, que avalia *in vitro* o andamento e extensão da ação bactericida, realizando subculturas quantitativas em intervalos de tempo regulares, após à exposição do microrganismo a concentrações farmacológicas da droga ou associações de drogas. Uma curva de morte *versus* tempo, figura 10, é gerada pela exposição do organismo teste a concentrações constantes do antibiótico, consiste de uma fase *lag*, uma fase *log*, e uma fase de *recrescimento*. A fase *lag* representa o tempo requerido para a penetração do antimicrobiano dentro da célula; a fase *log* é considerada como a medida quantitativa para a intensidade do efeito bactericida; enquanto a fase de recrescimento reflete a habilidade do microrganismo, para adaptar-se ao ataque da droga nem sempre representado (CRAIG, 1995; LI et al, 1999; LI,2000).

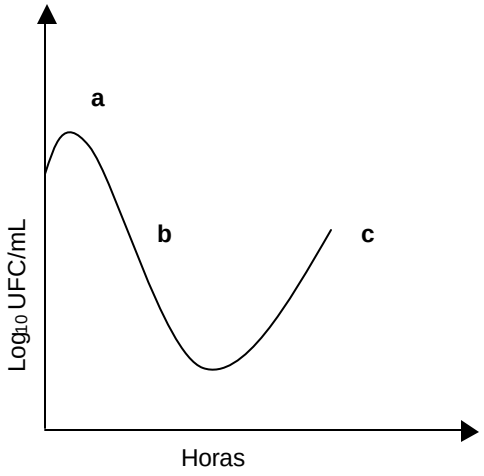


Figura 10: Típica curva de morte *versus* tempo; a= fase lag; b=fase log; c= fase de recrecimento (LI *et al*, 1999).

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Microrganismos

Os estudos da CIM e CBM foram realizados sobre dois isolados clínicos de pacientes HIV positivos do Hospital das Clínicas da UFPE: *Mycobacterium fortuitum* e o *Mycobacterium smegmatis*.

4.2 – Meios de Cultura

O meio de cultura para a manutenção destes microrganismos foi o meio sólido de Löwenstein-Jensen, BIO-MERIEUX. Os meios para os experimentos foram o meio líquido de Mueller-Hinton, OXOID, e o meio sólido de Mueller-Hinton, MERCK.

4.3 – Preparação e Padronização do Inóculo

A partir das culturas mantidas em meio sólido de Löwenstein-Jensen foram preparadas culturas em meio líquido de Mueller-Hinton contendo 0,1% (v/v) de Tween 80. O *M. fortuitum* e *M. smegmatis* foram incubados por um período de 120 horas a 37ºC, originando assim, culturas primárias. Estas culturas primárias foram diluídas em novo meio de Mueller-Hinton, e incubadas por 72 horas à 37ºC. Após incubação, as culturas foram diluídas em caldo de Mueller-Hinton a fim de obter um inóculo padronizado em 10^6 UFC/mL (VALENÇA, 1999; SILVA, 2001; SOUSA, 2001).

4.4 – Preparação das Soluções Estoque das Drogas

As soluções estoque das drogas de concentração equivalente a 1000µg/mL foram preparadas a partir das substâncias de referência *p*-flúor-fenilalanina (F-PHE) 98%, ACROS ORGANICS, o derivado 1,2,4 oxadiazol-hidrazida, [3-(4-hidroxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-acil-hidrazida, sintetizado no Laboratório de Planejamento e SÍntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, e a ofloxacina (OFLO) 99%, BAYER.

O derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida foi dissolvido num sistema composto por DMSO/ Tween 80/ H_2O na proporção de (1:1:48). A ofloxacina foi dissolvida em etileno glicol P.A., VETEC, e a *p*-flúor-fenilalanina em água a 100ºC. As soluções das drogas foram diluídas em água destilada esterilizada seguindo uma progressão geométrica de razão dois, de modo a obter uma série de soluções com concentrações que variaram de 1000 a 1,56µg/mL.

4.5 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.5.1 – Enumeração Inicial das Bactérias

Para uma possível enumeração inicial da população bacteriana, 0,5mL do inóculo padronizado foi coletado e diluído seriadamente. de 10^{-1} a 10^{-7} em água destilada esterilizada.

Em placas contendo meio sólido de Mueller-Hinton, foram semeadas cinco alíquotas de 10µL de todas estas diluições. As placas foram incubadas por 72 horas a 37ºC (COURVALIN, 1985; AZEVEDO-XIMENES, 1993; VALENÇA,1999; SILVA, 2001). Após incubação as colônias formadas foram contadas para determinar a população bacteriana presente no inoculo inicial.

4.5.2 – Exposição dos microrganismos às drogas

De cada concentração das drogas foi transferido 0,5mL para uma série de tubos esterilizados, e em seguida foi adicionado 4,5mL do caldo de Mueller-Hinton contendo o inóculo padronizado. Com esse procedimento as soluções das drogas sofreram nova diluição na ordem de 1:10, resultando em concentrações que variaram de 100 a 0,156µg/mL. No tubo controle foi utilizado 0,5mL de água destilada esterilizada. Os tubos foram incubados por um período de 72 horas a 37ºC (COURVALIN, 1985; AZEVEDO-XIMENES, 1993; VALENÇA, 1999). Também foram realizados controles para os solventes, com a exposição do *M. fortuitum* e *M. smegmatis* a uma solução do DMSO e etileno glicol com o dobro do volume utilizado para a diluição do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e ofloxacina, respectivamente, para assegurar que o efeito inibitório das drogas não fora devido a ação dos solventes.

4.5.2 – Leitura

Após de incubação foi observado desenvolvimento dos microrganismos, comparando os tubos que continham as drogas com o tubo controle. A CIM é definida como a menor concentração da droga que inibe todo o crescimento visível do microrganismo (COURVALIN, 1985; AZEVEDO-XIMENES, 1993; VALENÇA, 1999).

4.6 – Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada utilizando a técnica em meio sólido, pela enumeração das bactérias sobreviventes após o contato de 72 horas com as drogas. Assim, após a determinação da CIM, foram plaqueadas cinco alíquotas de 10µL sobre meio sólido de Mueller-Hinton de cada tubo contendo o inóculo exposto à

droga que não apresentaram crescimento visível. As placas foram incubadas por 72 horas a 37ºC (COURVALIN, 1985; AZEVEDO-XIMENES, 1993).

4.6.1 – Leitura

Após incubação foi realizada a enumeração das colônias. A CBM foi estabelecida em função da enumeração do inóculo inicial, como a menor concentração das drogas que inibiu 99,99% da população bacteriana (COURVALIN, 1985; AZEVEDO-XIMENES, 1993).

4.7 – Determinação do Efeito Bactericida

4.7.1 - Princípio

A atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e de suas associações, foi determinada pela técnica das cinéticas bactericidas (Time Killing Curve) (COURVALIN, 1985; KROGSTAD; MOELLERING, 1996). A técnica consiste em determinar por enumeração das unidades formadoras de colônias, o número de bactérias sobreviventes de um inóculo previamente padronizado exposto à concentrações conhecidas de drogas, em função do tempo (COURVALIN, 1985; KROGSTAD; MOELLERING, 1996). A concentração da droga utilizada no experimento foi igual à CIM, previamente estabelecida.

Os inóculos bacterianos foram obtidos segundo metodologia descrita no item 4.3. Volumes de 9,0mL do meio líquido de Mueller-Hinton contendo a suspensão bacteriana devidamente padronizada, foram transferidos para tubos rosqueados esterilizados que continham um volume total de 1,0mL das soluções das drogas ou de suas duplas associações. Na tripla associação foi utilizado volume final de 1,5mL das drogas associadas e 8,5mL do inóculo padronizado. No tubo controle foi

adicionado 1,0mL de água destilada esterilizada (COURVALIN, 1985; AZEVEDO-XIMENES, 1993).

4.7.2 – Protocolo Experimental

A enumeração inicial das bactérias (T_0), foi efetuada a partir de 0,5mL do inóculo padronizado diluído de 10^{-1} a 10^{-6}. Destas diluições foram plaqueadas cinco alíquotas de 10µL de todas as diluições sobre meio sólido de Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a 37ºC por um período de 72 horas.

O acompanhamento da atividade bactericida das drogas e de suas associações foi realizado durante um período de 120 horas. Alíquotas de 0,5mL foram retiradas de cada tubo contendo os microrganismos expostos às drogas ou às suas associações e do tubo controle; diluídas de 10^{-1} a 10^{-6}, e em seguida plaqueadas cinco alíquotas de 10µL de todas as diluições em meio sólido de Muellur-Hinton. As placas foram incubadas por 72 horas a 37ºC.

Este procedimento foi repetido após 24 (T_1), 48 (T_2), 72 (T_3), 96 (T_4) e 120 horas (T_5), de exposição das bactérias às drogas ou as suas associações (COURVALIN, 1985; AZEVEDO-XIMENES, 1993).

Os valores obtidos permitiram traçar para as drogas e suas associações, uma curva (Time Killing Curve) representando o número de bactérias viáveis, expresso em logaritmo decimal (ordenada), em função do tempo de exposição em horas (abscissa).

Cada experimento foi realizado três vezes em semanas consecutivas. Desse modo, os dados apresentados são resultados das médias aritméticas e o desvio padrão das três manipulações.

A figura 11 apresenta um esquema da técnica para determinação *in vitro* da atividade bactericida.

4.7.3. – Critérios de Interpretação

Os critérios estabelecidos para uma boa atividade bactericida de uma droga, determinam como uma atividade relevante, os resultados cujo decréscimo do inóculo bacteriano seja igual ou superior a 2 $\log_{10}$, independente de estarem as drogas em associação ou não, uma vez que os valores iguais a 2 $\log_{10}$ obtidos nas manipulações *in vitro*, apresentam resultados significativos *in vivo* (COURVALIN et al, 1990).

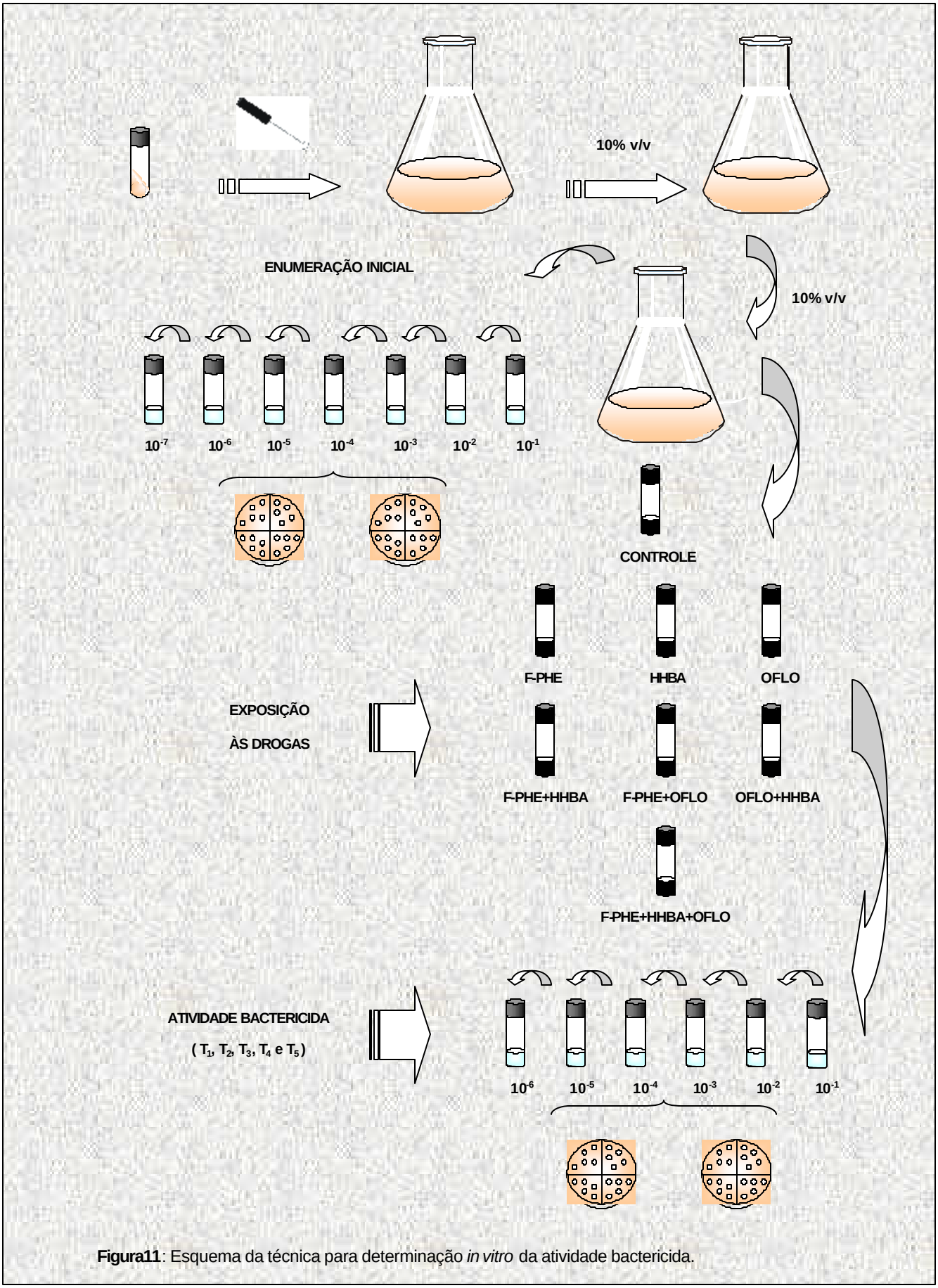


Figura11: Esquema da técnica para determinação *in vitro* da atividade bactericida.

5 – RESULTADOS.

5.1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Os valores das CIMs e das CBMs para a ofloxacina, para o derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e para o *p*-flúor-fenilalanina frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis* estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Valores das CIMs e CBMs para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.

MICRORGANISMOS	HHBA		OFLO		F-PHE	
	CIM µg/mL	CBM µg/mL	CIM µg/mL	CBM µg/mL	CIM µg/mL	CBM µg/mL
M. fortuitum	25	100	1	1	>200	ND*
M. smegmatis	50	>100	1	2	>200	ND*

*ND - não determinado.

Das drogas testadas, a ofloxacina demonstrou ser a mais efetiva, apresentando CIM de 1µg/mL para *o M. fortuitum* e *M. smegmatis*. O derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida mostrou-se mais ativo frente ao *M. fortuitum* com uma CIM de 25µg/mL, enquanto para o *M. smegmatis* foi de 50µg/mL. A CIM do *p*-flúor-fenilalanina frente às duas micobactérias foi superior a 200µg/mL.

A CBM encontrada para o derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum* foi de 100µg/mL, enquanto que frente o *M. smegmatis* foi maior do que 100µg/mL.

Não foi realizado o procedimento para ser estabelecida a CBM para o *p*-flúor-fenilalanina, uma vez que a CIM não foi determinada.

Para a ofloxacina estes valores foram de 1µg/ml para *M. fortuitum*, e de 2µg/mL para o *M. smegmatis*.

A atividade inibitória do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, encontra-se ilustrada nas figuras 12 e 13 respectivamente. Pode ser visualizada uma ausência de turbidez, que é o indicativo da ação inibitória, a partir do tubo contendo a concentração de 25µg/mL para o *M. fortuitum*, figura 12, e 50µg/mL para o M. smegmatis, figura 13.

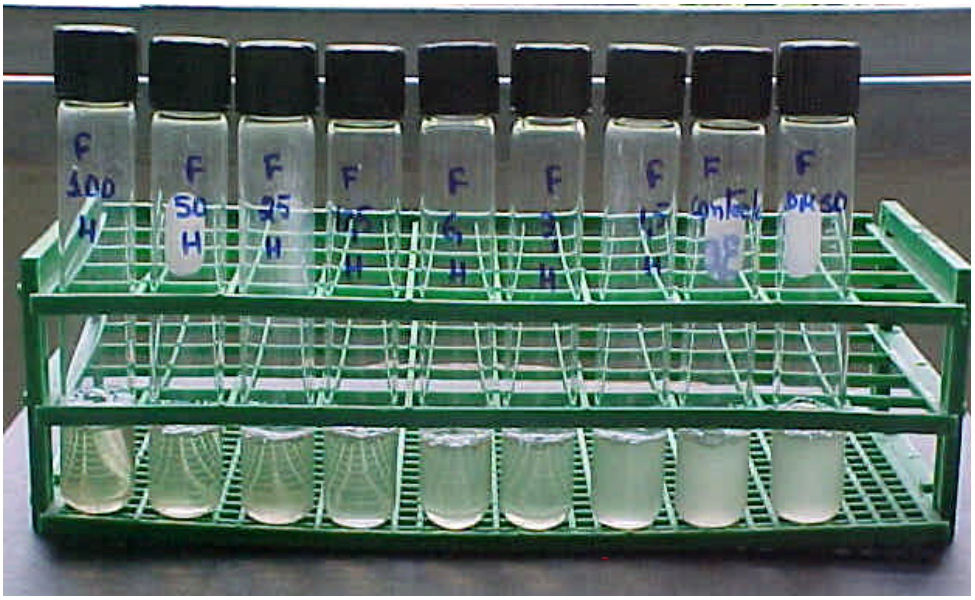


Figura 12: Determinação da Concentração Mínima Inibitória do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum*. Método de diluição em meio líquido.

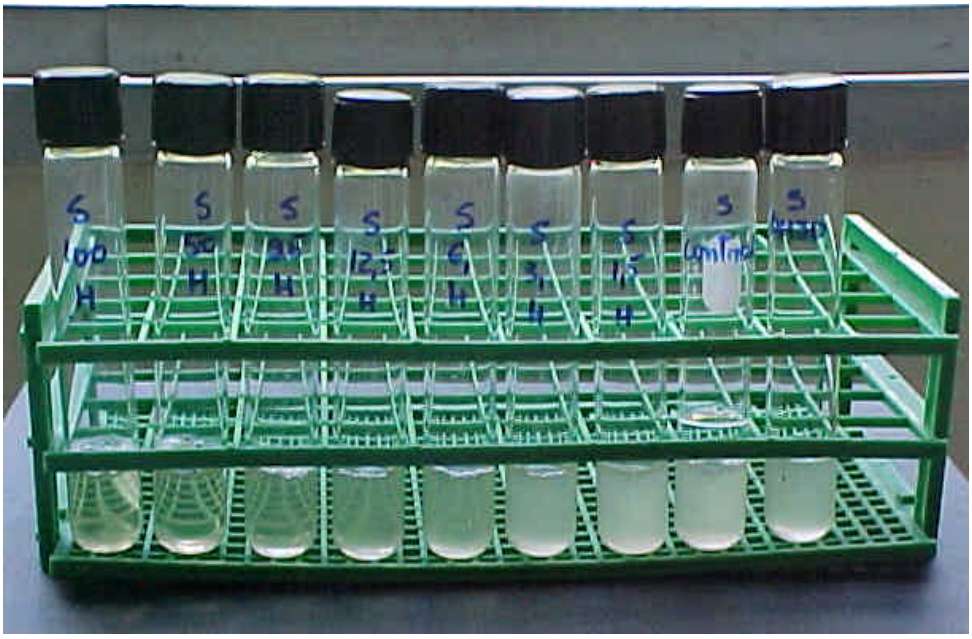


Figura 13: Determinação da Concentração Mínima Inibitória do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis*. Método de diluição em meio líquido.

5.2 – Efeito Bactericida das drogas e de suas associações.

Os resultados expressos pelo logaritmo das Unidades Formadoras de Colônias após contato com as drogas e suas associações estão representados na tabela 5 para o *M. fortuitum* e tabela 7 para o *M. smegmatis*. Os valores da diminuição do inóculo ao longo das 120 horas de incubação, para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, encontram-se na tabelas 6 e na tabela 8, respectivamente. As tabelas 5, 6, 7 e 8 estão no Apêndice A. As curvas traçadas a partir das médias calculadas das três manipulações estão ilustradas nas figuras 14-19 para o *M. fortuitum*, e nas figuras 20-25, para o *M. smegmatis*. Elas facilitam a comparação da atividade das drogas e de suas associações sobre as duas espécies de micobactérias estudadas.

5.2.1 – *Mycobacterium fortuitum*.

O derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida demonstrou uma redução do inóculo de 1,00 $\log_{10}$ após 48 horas de incubação. Esta inibição progressiva continuou até uma diminuição no número de bactérias de 1,45 $\log_{10}$ após 120 horas de exposição, figura 14. Esta atividade não foi acentuada na associação com o *p*-flúor-fenilalanina, ver figura 15.

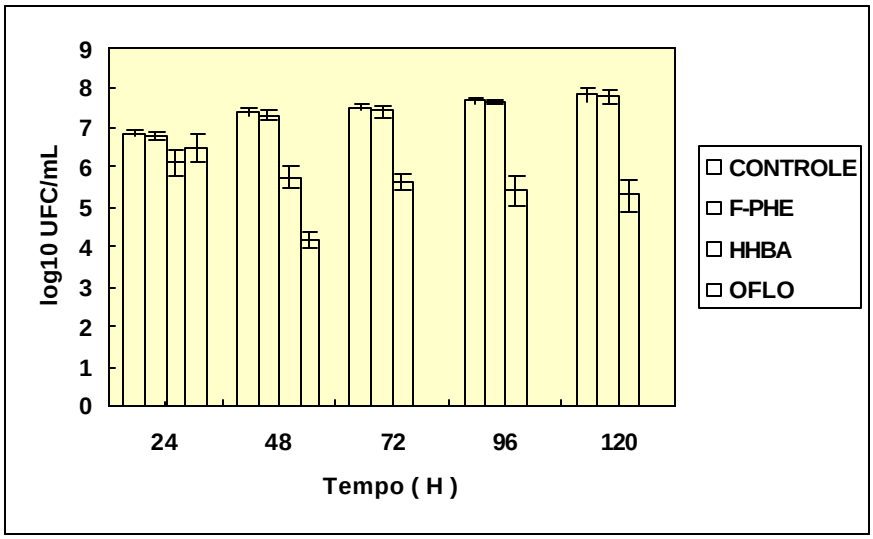


Figura 14: Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum*.

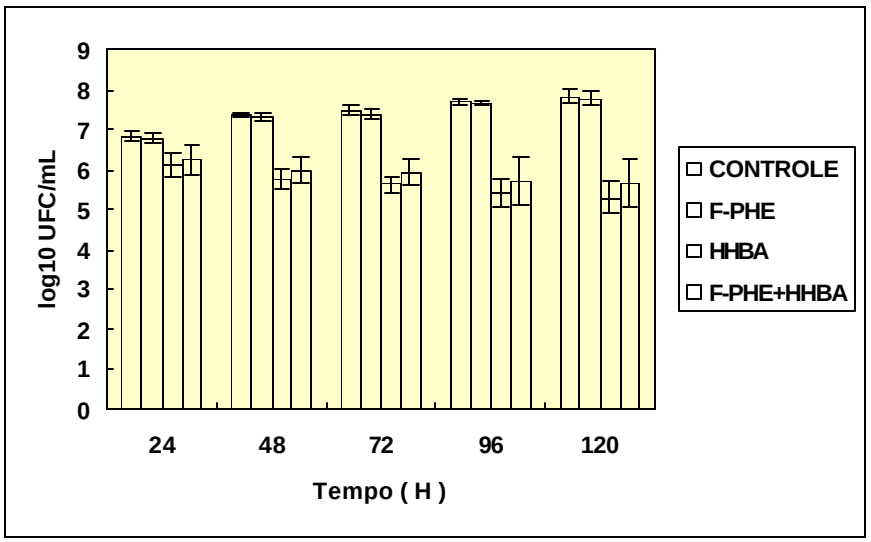


Figura 15: Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum*.

Quando o derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida foi combinado à ofloxacina observou-se um aumento na atividade bactericida. Nas primeiras 24 horas houve um efeito aditivo desta atividade, que resultou na redução de 1,23 $\log_{10}$ da população bacteriana inicial, chegando à metade com 48 horas de contato, figura 16.

Após 72 horas de contato esta associação foi capaz de esterilizar a cultura de *M. fortuitum*. Esta resposta à ação bactericida das drogas também foi observada com a ofloxacina, figura 16.

Quando o *p*-flúor-fenilalanina foi associada à ofloxacina houve um discreto aumento da atividade inibitória apenas nas primeiras 24 horas, apresentando um decréscimo do inóculo de 0,5 $\log_{10}$. Após este período o perfil de inibição desta associação foi igual ao da ofloxacina, figura 17.

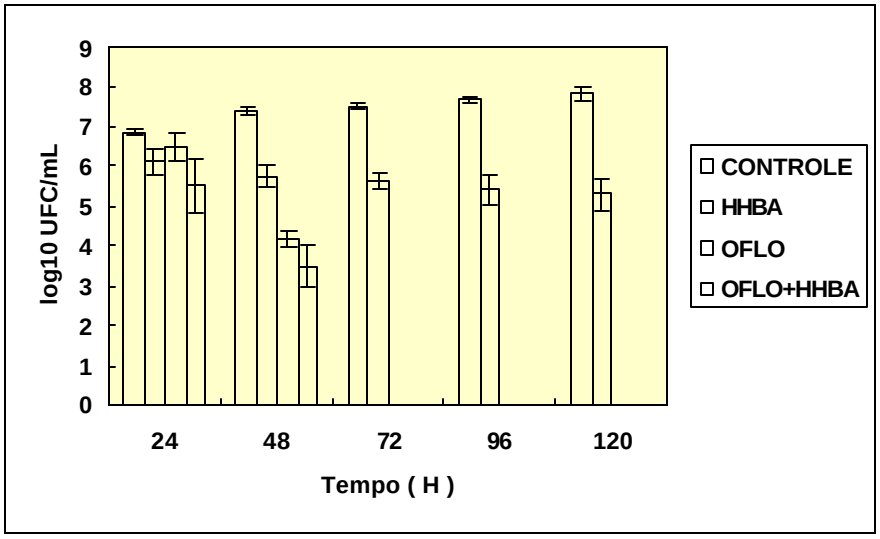


Figura 16: Atividade bactericida da associação ofloxacina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. fortuitum*.

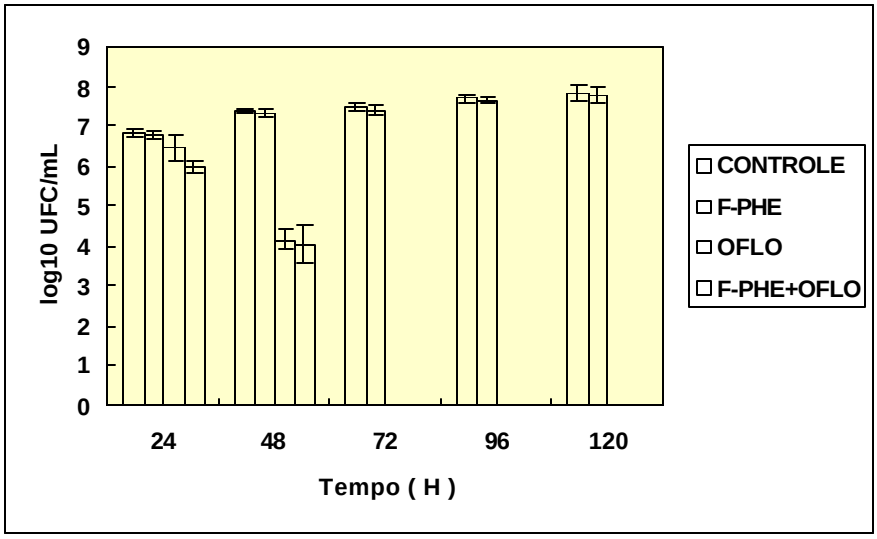


Figura 17: Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + ofloxacina frente ao *M. fortuitum*.

Quando foi comparado o efeito bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida com o da ofloxacina nas primeiras 24 horas de exposição, verificou-se que a ofloxacina mostrou uma redução 2,5 vezes maior do que a apresentada pelo derivado hidrazínico, figura 14.

O *p*-flúor-fenilalanina não demonstrou nenhuma ação bactericida. Ao longo das 120 horas foi verificado um crescimento microbiano da ordem de 1,04 $\log_{10}$. Este resultado foi semelhante ao controle que apresentou um crescimento de 1,09 $\log_{10}$, figura 14.

A associação da ofloxacina, do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e do *p*-flúor-fenilalanina, figura 18, demonstrou uma redução de 1,45 $\log_{10}$ com 24 horas de contato, chegando à metade do inóculo inicial após 48 horas, seguida de esterilização da cultura a partir das 72 horas de exposição. A atividade bactericida observada para a associação ofloxacina+1,2,4-oxadiazol-hidrazida não foi alterada com a introdução do *p*-flúor-fenilalanina, figura 19.

A figura 19 apresenta uma visão geral do efeito bactericida da ofloxacina, do 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e do *p*-flúor-fenilalanina em suas associações frente ao *M. fortuitum*.

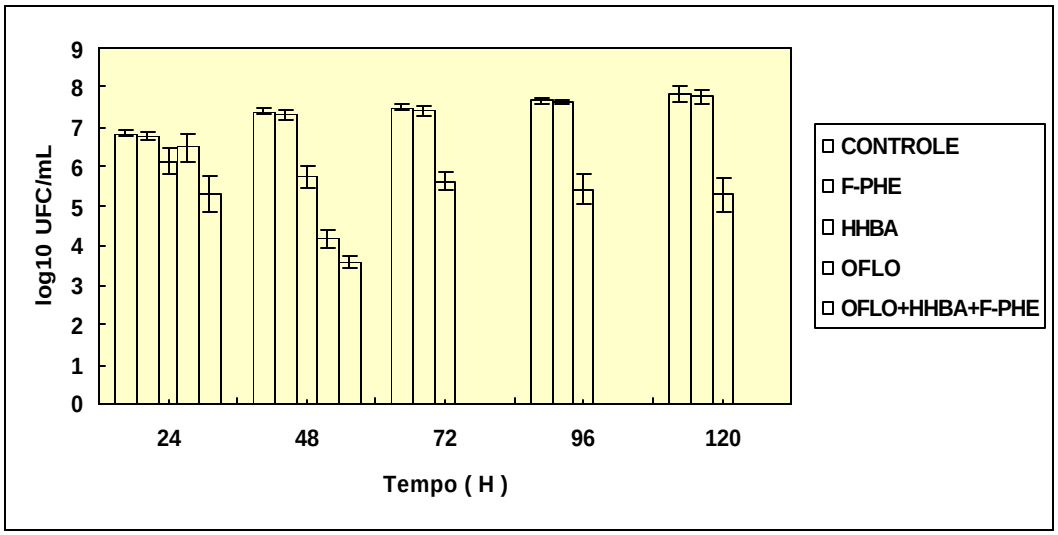


Figura 18: Atividade bactericida da associação 1,2,4-oxadiazol-hidrazida + ofloxacina + *p*-flúor-fenilalanina frente ao *M. fortuitum*.

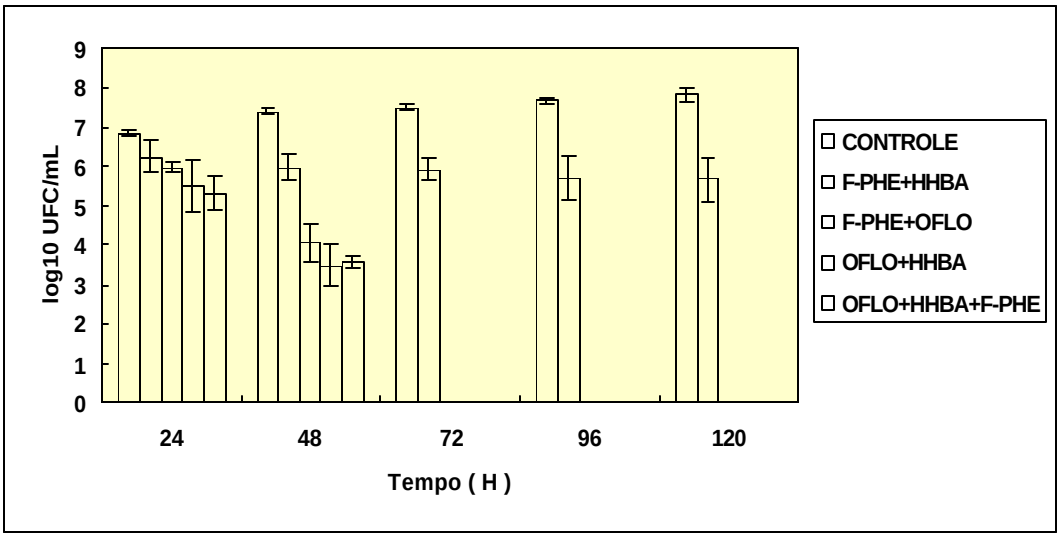


Figura 19: Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do 1,2,4-oxadiazol-hidrazida em suas associações frente ao *M. fortuitum*.

5.2.2 – *Mycobacterium smegmatis*.

O derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida demonstrou uma atividade bastante interessante frente ao *M. smegmatis*, causando uma redução do inóculo de 1,30 log_{10} após 48 horas de exposição. A inibição foi contínua e progressiva até uma redução de 2,41 log_{10} da população inicial, após 120 horas de contato, figura 20. Esta atividade não foi acentuada na associação com o *p*-flúor-fenilalanina, figura 21.

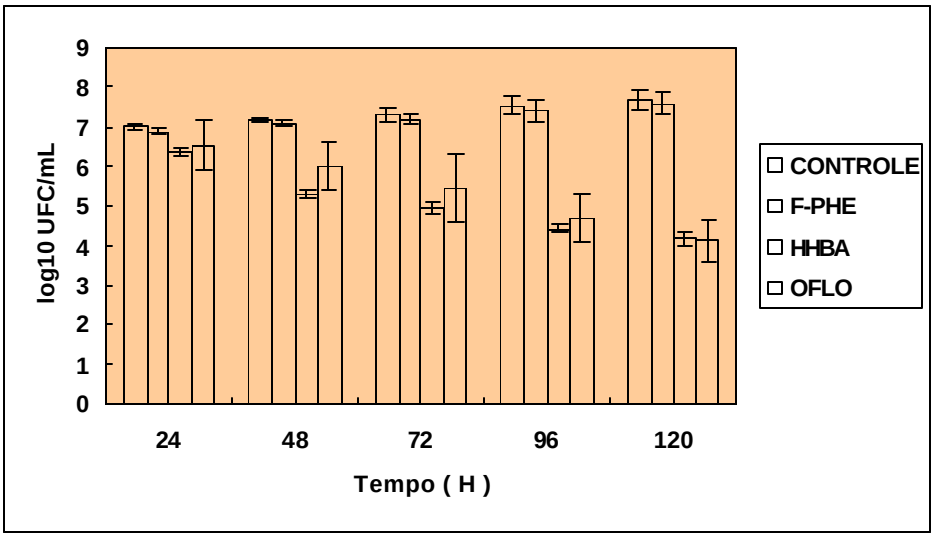


Figura 20: Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis*.

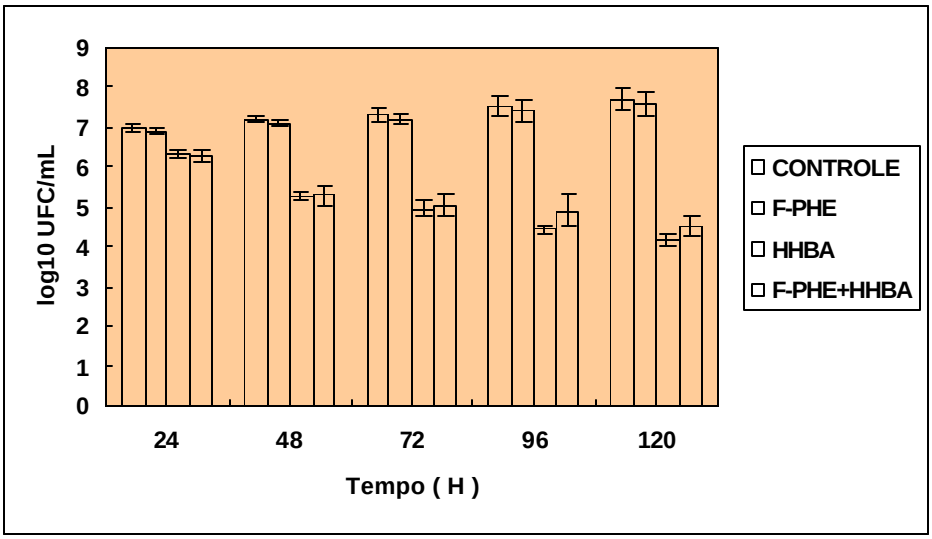


Figura 21: Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + 1,2,4-oxazdiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis*.

O derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida quando associado à ofloxacina, provocou uma redução equivalente à 2,74 log_{10} após 120 horas de exposição, figura 22. Esta redução foi superior à observada para o derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e para a ofloxacina neste mesmo período.

A ofloxacina quando associada a *p*-flúor-fenilalanina foi observada uma redução de 3,09 log_{10} em 120 horas de contato, figura 23.

Esta redução da população inicial foi maior do que a associação ofloxacina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, cujo decréscimo do inóculo inicial foi de 2,74 log_{10} após o mesmo período, figura 22.

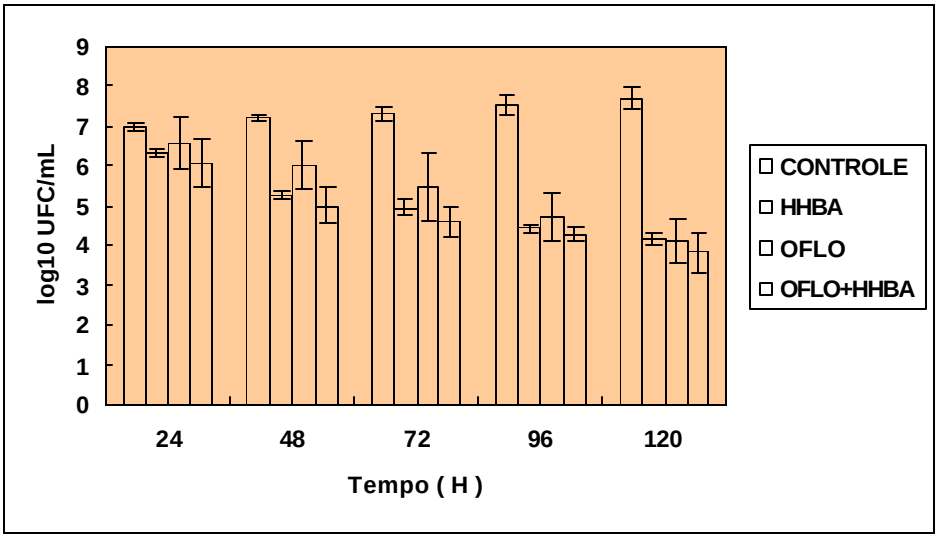


Figura 22: Atividade bactericida da associação ofloxacina + 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M. smegmatis*.

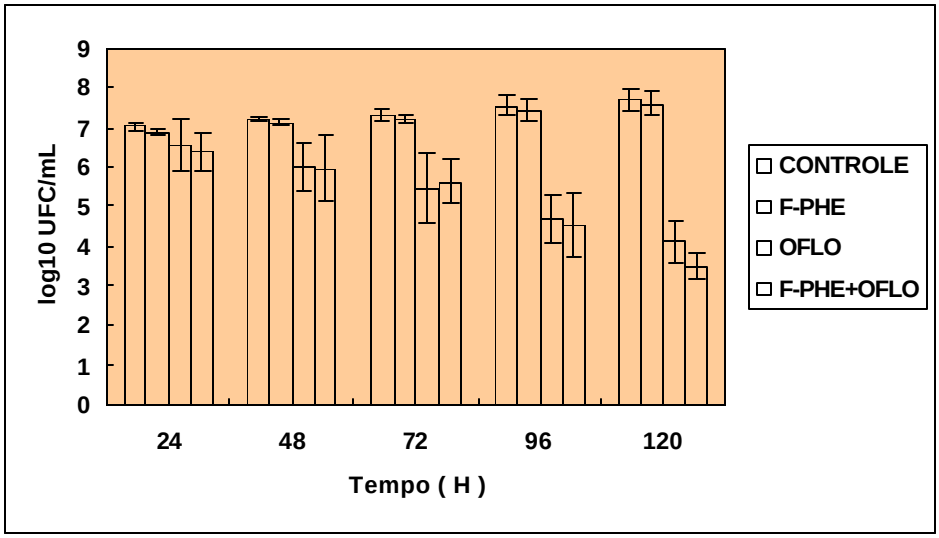


Figura 23: Atividade bactericida da associação *p*-flúor-fenilalanina + ofloxacina frente ao *M. smegmatis*.

Quando foi comparado o efeito bactericida do derivado hidrazínico com a ofloxacina, foi verificado que com 48 horas de exposição, o 1,2,4-oxadiazol-hidrazida foi mais ativo, apresentando um decréscimo de 1,30 $\log_{10}$ contra 0,51 $\log_{10}$ da ofloxacina. Contudo, a partir das 72 horas as duas drogas apresentaram efeitos semelhantes até o término do experimento, figura 20.

O *p*-flúor-fenilalanina não demonstrou nenhuma ação bactericida. Ao longo das 120 horas do experimento foi verificado um crescimento microbiano da ordem de 1,01 $\log_{10}$. Este resultado foi semelhante ao controle que apresentou um crescimento da ordem de 1,12 $\log_{10}$, figura 20.

A associação da ofloxacina, do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e do *p*-flúor-fenilalanina foi responsável por uma diminuição de 2,99 $\log_{10}$ do inóculo original ao final das 120 horas, figura 24. A introdução do derivado *p*-flúor-fenilalanina na associação ofloxacina+1,2,4-oxadiazol-hidrazida não apresentou um aumento importante ao final das 120 horas de exposição, figura 25.

A figura 25 apresenta uma visão geral do efeito bactericida da ofloxacina, do 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e do *p*-flúor-fenilalanina em suas associações frente *ao M. smegmatis*.

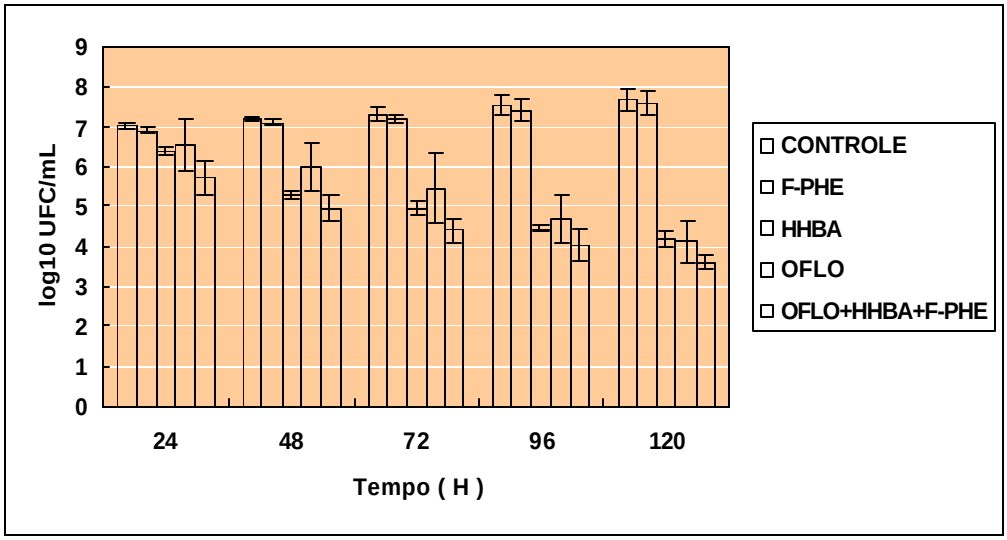


Figura 24: Atividade bactericida da associação 1,2,4-oxadiazol-hidrazida + ofloxacina + *p*-flúor-fenilalanina frente ao *M. smegmatis*.

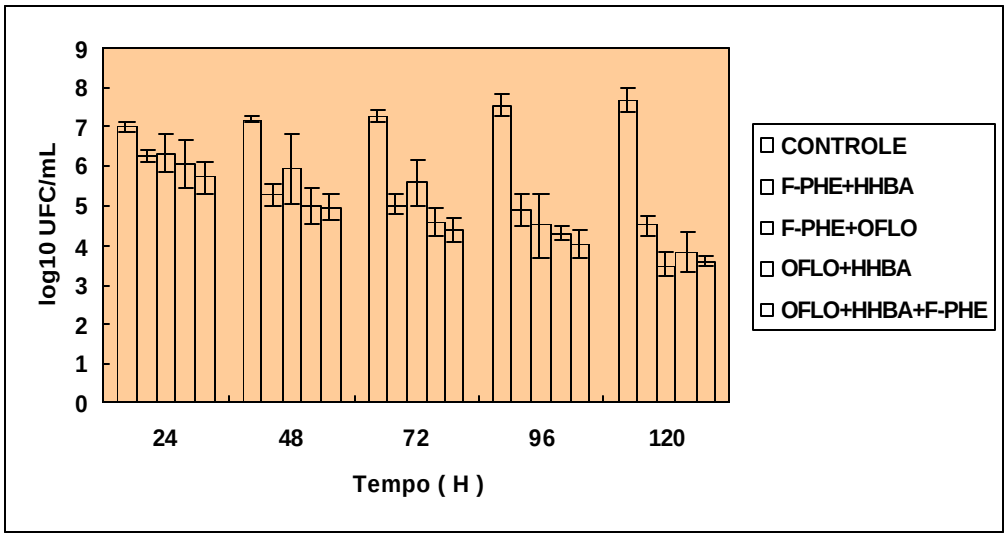


Figura 25: Atividade bactericida do *p*-flúor-fenilalanina, da ofloxacina e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida em suas associações frente ao *M. smegmatis*.

6 – DISCUSSÃO.

RASTOGI et al (1981); DAVID et al (1986); SUZUKI; INAMINE (1994); MORRIS; ROUSE (1996), propuseram que a resistência do *M. avium* e *M. tuberculosis* a múltiplas drogas não pode ser apenas explicado por fatores genéticos ou permeabilidade seletiva associada a membrana, mas, além disso, é provável que a causa seja a arquitetura do envelope celular bacteriano, a qual pode agir como uma eficiente barreira para a penetração de algumas drogas (RASTOGI *et al*, 1981; RASTOGI; FREHEL; DAVID, 1986; DRAPER, 1998). Para superar o mecanismo de exclusão pelo qual a estrutura da camada externa impediria a difusão das drogas através da parede, foi sugerida a possibilidade de que inibindo a síntese de um componente da parede poderia romper sua arquitetura, permitindo dessa forma a difusão da droga através da parede, para eventualmente atingir seus respectivos alvos (DAVID et al, 1988; RASTOGI; GOH, 1990).

O conhecimento em torno da estrutura da parede celular micobacteriana é incompleto (DRAPER, 1991; BARROW, 1997; DRAPER, 1998; KHASNIBIS; ESCUYER; CHATERJEE, 2002), contudo, existe uma visão generalizada de que ela é composta por várias camadas distintas (DAVID; LÉVI-FRÉBAULT; THOREL, 1988; MCNEIL; BRENNAN, 1990; DAFFÉ; DRAPER, 1997), na qual a camada mais externa é composta por complexas moléculas anfipáticas, denominadas micosídios (RASTOGI; FREHEL; DAVID, 1986; DAVID et al, 1988; RASTOGI; GOH; DAVID, 1990). Os micosídios são fenolglicolipídios (PGLs) ou glicolipopeptídios (GLPs) espécie específicos, únicos das micobactérias (DAFFÉ, DRAPER, 1997). De acordo com o modelo , essas moléculas estariam ligadas à superfície celular por interações lipídio-lipídio estabelecidas entre seus lipídios componentes e os ácidos micólicos, que por sua vez, estão esterificados ao mucopeptídio arabinogalactana no esqueleto da parede celular (DAVID et al, 1987; DAVID et al, 1988; RASTOGI; GOH; DAVID, 1990).

Por causa da sua ligação não covalente no envelope celular, os GPLs se depositam em torno da micobactéria e acumulam-se durante o crescimeno prolongado nos macrófagos após a infecção (RASTOGI, 1989; RASTOGI; HELIO, 1990; RASTOGI; LABROUSSE; SOUSA, 1992), são tidos como substâncias

lentamente degradadas, com propriedades imunomodulatórias, e contribuem para a patogenicidade e resistência às drogas (RASTOGI; DAVID, 1988; RASTOGI; BARROW, 1994; ROBERTS, 1996; BARROW, 1997; DRAPER, 1998).

Os GPLs ou micosídio-C são glicoconjugados, compostos por lipídios glicosilados contendo um tripeptídio central formado por D-fenilalanina-D-halo-treonina-D-alanina (DAVID et al, 1988; BARROW et al, 1993; DAFFÉ; DRAPER, 1997), provavelmente sensível a inibição específica por análogos de aminoácidos usados como antimetabólitos desses aminoácidos.

O exame de lipídios marcados (RASTOGI et al, 1994), revelou a presença de um componente lipopeptídico, não glicosilado compartilhado por todas as cepas estudadas (RASTOGI et al, 1994; DAFFÉ; DRAPER, 1997), que contêm fenilalanina, alanina e isoleucina e pode ter um papel na biossíntese do GPL (BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994). Foi proposto que esse lipopeptídio tem similaridade com o lipopeptídio glicosilado identificado em algumas cepas do *M. avium*. Por causa da presença da fenilalanina, treonina, alanina e alaninol, foi sugerido que esse lipopeptídio glicosilado seja o provável precursor na biossíntese do GPL (BARROW et al, 1993). A biossíntese do GPL procede de uma rota que inicia com a síntese do peptídio central, e que inibindo esta primeira etapa seria possível inibir as etapas posteriores da biossíntese do GPL (RASTOGI et al, 1994). Isso auxiliaria na debilitação do envelope celular e assim aumentaria a atividade dos agentes antimicobacterianos.

No esforço para vencer o obstáculo da camada externa do envelope celular micobacteriano, tem sido usado drogas que afetem a biossíntese dos GPLs em três sítios: glicosilação, biossíntese do peptídio, e biossíntese dos ácidos graxos (RASTOGI et al, 1994). Os derivados de aminoácido *orto*, *para*, e mais freqüentemente o *m*-flúor-fenilalanina, têm sido testados com sucesso, como inibidores do micosídio-C (DAVID et al, 1988; RASTOGI; GOH; DAVID, 1990), e em combinações com agentes antimicobacterianos conhecidos (RASTOGI; GOH; DAVID, 1990; RASTOGI; GOH; LABROUSSE, 1993; BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994).

Variações fisiológicas na composição do micosídio-C e sua topografia na arquitetura da camada externa, encontrada de cepa para cepa dentro da mesma espécie micobacteriana (BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994), seria a

explicação para a diferença no padrão de atividade dos derivados da fenilalanina frente às cepas do *M. avium* .

Essa variação não ocorre com a composição do arabinogalactana e dos ácidos micólicos, os dois outros grandes constituintes do envelope micobacteriano, que não varia significantemente entre as cepas da mesma espécie (BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994).

Neste trabalho, o derivado *p*-flúor-fenilalanina não apresentou nenhum efeito bactericida, confirmando sua ação apenas de inibidor da biossíntese do micosídio-C sem afetar o metabolismo celular no geral (DAVID et al, 1988), também não foi estabelecida uma CIM até uma concentração de 200µg/mL. Esta foi a Concentração Inibitória Mínima encontrada para o derivado *meta* frente ao *M. avium* (RASTOGI et al, 1994). Esses resultados demonstraram, que além de não possuir atividade bactericida, o *p*-flúor-fenilalanina também não apresenta atividade bacteriostática, fato esse observado pelos valores elevados de sua CIM para o *M.fortuitum* e *M. smegmatis*.

O derivado *m*-flúor-fenilalanina acentuou a atividade do derivado anfipático da isoniazida, 1-isonicotinil-2-palmitoil hidrazina (RASTOGI; GOH, 1990); da rifampicina, ofloxacina e ciprofloxacina (RASTOGI; GOH; DAVID, 1990); da amicamicina, esparfloxacina e claritromicina (BARROW et al, 1993; RASTOGI et al, 1994); e da dapsona (RASTOGI; GOH; LABROUSSE, 1993) frente a várias cepas do *M. avium*. Neste estudo, não foi observado nenhum aumento significativo, quando o *p*-flúor-fenilalanina foi combinado com o derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e ofloxacina frente ao *M. fortuitum*, enquanto um discreto aumento foi observado contra o *M. smegmatis*, com a associação do *p*-flúor-fenilanina com a ofloxacina. Estes resultados poderão ser explicados pela variação fisiológica na composição do micosídio-C e na topografia na arquitetura da camada externa da parede celular micobacteriana destes microrganismos.

O derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *M.fortuitum* demonstrou atividade, mas não apresentou um decréscimo do inóculo de 2 $\log_{10}$, preconizado como parâmetro para a droga ter boa atividade *in vivo*. No entanto, sua atividade contra o *M. smegmatis* foi bastante promissora, cujo decréscimo do inóculo inicial foi de 2,41 $\log_{10}$ após 120 horas de exposição. O derivado hidrazínico não permitiu um recrescimento das micobactérias até as 120 horas de exposição, demonstrando que

durante esse período, numa concentração igual a CIM não houve surgimento de microrganismos resistentes.

A CIM de 1µg/mL encontrada para a ofloxacina frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, e a CBM de 1µg/mL para o *M. fortuitum* e de 2µg/mL para o *M. smegmatis*, confirmam sua boa atividade frente as micobactérias, e a não observação de recrescimento dos microrganismos durante o período de exposição corroboram aos estudos anteriores desenvolvidos por AZEVEDO-XIMENES (1993), frente as mesmas espécies de micobactérias.

A atividade bactericida da ofloxacina, frente as duas micobactérias, foi visualizada pela esterilização do inóculo bacteriano do *M. fortuitum* a partir das 72 horas de contato, e uma redução na ordem de 2,68 $\log_{10}$ frente ao *M. smegmatis*.

7 – CONCLUSÕES

Os resultados apresentados pelo derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida demonstraram que este possue atividade inibitória e bactericida sobre as duas micobactérias. No contato com o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, a atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida causou uma diminuição progressiva e contínua no número de células viáveis do inóculo bacteriano, sem apresentar recrescimento das culturas durante as 120 horas de exposição.

Esses resultados do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida são bastante interessantes e promissores, incentivando o investimento em novos experimentos tanto *in vitro* quanto em *in vivo*, para determinar a eficácia desta nova hidrazida no tratamento das micobacterioses.

O derivado *p*-flúor-fenilalanina não apresentou atividade inibitória a uma concentração igual a 200µg/mL, não sendo determinadas a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima. Este derivado não aumentou a atividade nas associações com o derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e com a ofloxacina frente ao *M. fortuitum*. O derivado da fenilalanina acentuou apenas discretamente a atividade da ofloxacina contra o *M. smegmatis*.

Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que além de se considerar a grande variedade encontrada na constituição e arranjo dos componentes da camada externa da parede celular das micobactérias, deve-se levar em conta a influência da configuração estrutural do derivado da fenilalanina no seu padrão de atividade. Dessa forma sugerimos o uso do derivado com a configuração *meta* ao invés do derivado com configuração *para*.

A ofloxacina demonstrou ser mais efetiva droga frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*. A ofloxacina foi responsável pela maior redução do inóculo inicial, quando comparada às outras drogas utilizadas neste estudo. Utilizada na Concentração Mínima Inibitória, a ofloxacina foi capaz de esterilizar a cultura do *M. fortuitum* em 72 horas de exposição.

A associação das três drogas, da ofloxacina, da *p*-flúor-fenilalanina, e do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida não apresentou aumento importante na atividade apresentada com as associações de duas drogas, que obtiveram os melhores resultados.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANON, U.K. Herbicidal oxadiazole derivatives. **Res. Discl.**, v. 317, p. 777. 1990.

AFIATPOUR, P. et al. Analgesic and anti-inflamatory effects of 3-[3-(phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-il] propionic acid. **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 27, p. 1403. 1994.

AUCKENTHALER, R.; MICHÉA-HAMZEHPOUR; M., PECHÈRE, J.C.In vitro activity of newer quinolones against aerobic bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 17, p. 29-39. 1986.

AZEVEDO-XIMENES, E.C.P. **Contribution a l'etude de l'activite *in vitro* de divers antibiotiques sur des mycobacteries atypiques**. 1993. 184 f. Thèse (Docteur en Bacté riologie) – L'Universite de Montpelier I, França.

BAESS, I.; BENTZON, M.W. Deoxyribonucleic acid hybridization between different species of mycobacteria. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, v. 86, p. 71-76. 1978. In: GRANGE, J.M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 81, p. 1-9. 1996.

BARROW, W.W.; et al. Activities of flourquinolone, macrolide, and aminoglycoside drugs combined with inhibitors of glycosylation and fatty acid ans peptide biosynthesis against *Mycobacterium avium* . **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 37, p.652-661. 1993.

BARROW, W.W. Processing of mycobacterial lipids and effects on host. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 387-400. 1997.

BAUERNFEIND, A.; ULLMANN, U. In vitro activity of enoxacin, ofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 14, p. 33-37. 1984.

BANERJEE, A. et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science** , v. 263, 227-230. 1994.

BARROW, W.W. Processing of mycobacterial lipids and effects on host responsiveness. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 387-400. 1997.

BARRY, C.E.; MDLULI, K. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 275-281, july. 1996.

BARRY, C.E. et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. **Prog. Lipid Res**., v. 37, n. 2/3, p. 143-179. 1998.

BELAS, R.; FALOON, P.; HANNAFORD, A. Potencial applications of molecular biology to the study of fish micobacteriosis. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 5, p. 133-173. 1995.

BENET, J.J. Les infections à mycobactéries atypiques chez l'animal. **Méd. Mal. Infect**., v. 21, p. 26-34. 1991.

BRENNAN, P.J.; DRAPER P. Ultrastruture of *Mycobacterium tuberculosis*. In: BLOOM, B.R. **Tuberculosis**: pathogenesis, protection, and cntrol. Washington, DC: ASM Press, 1994. p. 271-284.

BRYSKIER, A., LOWTHER, J. Fluoroquinolones and tuberculosis. **Expert Opin. Investg. Drugs**, v. 11, p. 233-258. 2002.

BUTCHER, P.D. et al. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 53-71. 1996.

CAEKENBERGHE, D.L.; PATTYN, S. In vitro activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperazinyl-substituted quinolone derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 25, p. 518-521. 1984.

CAMPOS, H.S. Manejo da doença micobacteriana não-tuberculosa. **Boletim, de Pneumologia Sanitária**, v. 8. 2000.

CHAN-TOMPKINS, N.H. Toxic effects and drug interactions of antimycobacterial therapy. **Clinics in Dermatology**, v. 13, p. 223-233. 1995.

COLSTON, M.J. The molecular basis of mycobacterial infection. **Molec. Aspects Med.**, v. 17, p. 385-454. 1996.

COURVALIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON A.; SIROT, J. **L'antibiogramme**. Bélgica: MPC, 1985. p.343.
COURVALIN, P. et al. **J. Bactéricidie**. Aspects théoriques et therapeutiques. Paris: Maloine, p. 333-334. 1990.

CLAPP, L.B. 1,2,4-Oxadiazoles. In: **Advances in heterocyclic chemistry**. Katrizky, A.R.; New York: Academic Press, v. 20, p. 65-116. 1976.

CRAIG, W.A. Interrelationship between pharmacokinetics na pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-epectrum cephalosporins. **Diagn Microbiol. Infect Dis**. v.22, p.89-96. 1995.

CRAIG, W.A. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. **Clinical Infectious Diseases**, v.26, p.1-12. 1998.

DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 131-203. 1997.

DAILLOUX, M. et al. Water and nontuberculous mycobacteria. **Wat. Res.** V.33, n. 10, p.2219-2228. 1999.

DAUTZENBERG, B., MIHALTAN, F. Traitement des mycobactérioses à mycobactéries non tuberculoses. **Méd. Mal Infect**., v. 21, p. 115-120. 1991.

DAVID et al. Structure of the envelope of *Mycobacterium avium*. **Zbl. Bakt. Hyg**. v. A264, p. 49-66. 1987.

DAVID, H.L.; LÉVY-FRÉBAULT; THOREL, M. F. Characterization of distinct layers of the *Mycobacterium avium* envelope in respect of their composition by fatty acids, proteins, oligosaccharides and antigens. **Zbl. Bakt. Hyg**., v. A 268, 193-208. 1988.

DAVID, H.L.; et al. Alterations in the outer wall architecture caused by the inhibition of mycoside C biosynthesis in *Mycobacteium avium*. **Curr. Microbiol.**, v.17, p.61-68. 1988.

DAVIES, S.; SPARHAM, P.D.; SPENCER, R.C. Comparative *in vitro* activity of five fluoroquinolones against mycobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 19, p. 605-609. 1987.

DAUTZENBERG, B.; MIHALTAN, F. Traitment des mycobactérioses à mycobactéries non tuberculeuses. **Méd. Mal Infect**, v. 21, p. 115-120. 1991.
DESPLACES, N. et al. The new quinolones and their combinations with other egents of severe infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 17, p. 25-39. 1986.

DEVALLOIS et al. Le typage moléculaire des mycobactéries. **Pathologie Biologie**, v. 46, p. 625-636. 1998.

DIANA, G.D. et al. An avaliation of the antivirhinoviral of acylfuran replacements for 3-methylisoxazoles. Are 2-acetylfurans bioisosteres for 3-methylisoxazoles?. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 4177. 1994.

DRAPER, P. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. **Res. Microbiol.**, v. 142, p. 420-422. 1991.

DRAPER, P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 1253-1261. 1998.

EHLERS, R.W.; DAFFÉ, M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobatiral sugars the key ?. **Trends in Microbiology**, v.6, n.8, p. 328-335. 1998.

EISENSTADT, J.; HALL, G.S. Microbiology and classification of mycobacteria. **Clinics in Dermatology**, v.13, p.197-206. 1995.

ELLNER, J.J. et al. *Mycobacterium avium* infection and AIDS: a therapeutic dilemma in rapid evolution. **The journal of Infectous Diseases**, v. 163, p. 1326-1335. 1991.

ELOY, F. A review of the chemistry of 1,2,4-oxadiazoles. **Fortschr. Chem. Forsch.**, v. 4, p. 807-876. 1965.

ELZINGA, G.; NUNN, P. TB and HIV: joint problems, joint solutions**? Bulletin of the World Health Organization**, v. 80, p. 469-470. 2002.

FALKINHAM, J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p.177-215. 1996.

GINSBERG, A.M. What's new in tuberculosis vaccines? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 80, p. 483-488. 2002.

GOOD, R.C. Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. **Ann. Ver. Microbiol**. v.39, p.347-369. 1985.

GOSLEE, S.; WOLINSKY, E. Wather as a source of potentially pathogenic mycobacteria**. Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 113, p. 287-292. 1976.

GRANGE, J.M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 81, p. 1-9. 1996.

GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à genética**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856 p.

GROSSET J. et al. Qu'est-ce que les mycobactéries atypiques?. **Med. Mal. Infect**., v.21, p.7-15. 1991.

HALLETT, P.; MAXWELL, A. Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 335-340. 1991.

HEIFETS, L. MIC as a quantitative measurement of the susceptibility of *Mycobacterium avium* strains to seven antituberculosis drugs. **Antimicrob. Agents Chemother**., v.32, p.1131-136. 1988.

HORSBURGH, C.R. Jr.; SELIK, R.M. The epidemiology of disseminated non-tuberculosis mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 139, p. 4-7. 1989.

HORSBURGH, C.R. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p.1332-1338. 1991.

HOSTY, T.S. Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters. **Health Lab. Sci**., v.12, p.16-19. 1975.

HOWARD, S.T.; BYRD, F.T. The rapidly growing myc obacteria: saprophytes and parasites. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1845-1853. 2000.

JANKNEGT, R. Fluorinated quinolones. A review of their mode of action, antimicrobial activity, pharmacokinetics and clinical efficacy. **Pharmaceutics Weekblad Scientific Edition**, v. 8, p. 1-21. 1986.

KOCHI, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organisation. **Tubercle**, v. 72, p. 1-6. 1991.

KONEMAN, E.W. et al**. Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. 5 ed. São Paulo: MEDSI, 2001. 1465 p.

KREMER, L.; BESRA, G. Re-emergence of tuberculosis: strategies and treatment. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 11, p. 153-157. 2002.

KROGSTAD, D.J.; MOELLERING, R.C. Antimicrobial combinations. In: Lorrian V. **Antibioti in Laboratory Medicine**. 2thed. Baltimore: Willians & Wilkins, p.537-595. 1986.

KULLAVANIJAYA, P. Atypical mycobacterial cutaneous infection. **Clinics in Dermatology**, v.17, p.153-158. 1999.

LAGRANGE, P.H.; WARGNIER, A.; HERRMANN, J.L. Mycobacteriosis in the compromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 163-170. 2000.

LANÉELE, G.; DAFFÉ, M. Mycobacterial cell wall and pathogenicity: a lipodologist's view. Res. Microbiol., v. 142, p. 433-437. 191.

LEITE, L.F.C.C. et al. Synthesis and analgesic profile of novel N-containing heterocycle derivatives: arylidene 3-phenyl-1,2,4-oxadiazole-5-carbohydrazide. **IL Farmaco**, v. 54, p. 747-757. 1999)

LEITE, A.C.L. et al. Syntesis, anti-inflammatory and antimicrobial activities of new 1,2,4-oxadiazoles peptidomimetics. **IL Farmaco**, v.55, p. 719-724. 2000.

LI, R.C. et al. Achieving na optimal outcome in the tratment of infections. **Clin. Pharmacokinet**, v.37, n.1, p.1-16. 1999.

LI, R.C. New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. International **Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.229-235. 2000.

LUSTGARTEN, S. The cacillus of syphilis. Lancet, v. p. 609-610, 1885. In: BROWN, B.A. et al. *Mycobacterium wolinsky* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. Intern. **J. Syst. Bact**. V. 49, p. 1493-1511. 1999.

MACNEIL, M.R.; BRENNAN, P.J. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising fron recent structural information. **Research in Microbiology**, v.142, p.451-463. 1990.

MAIOLI, L., RUZZIER, L. Sintesi e proprieta antibatteriche di amidossime aromatiche. Boll. Sci. Chim. Ind. Bologna, v. 15, p. 57. 1957. In: ELOY, F. A review of the chemistry of 1,2,4-oxadiazoles. **Fortschr. Chem. Forsch.**, v. 4, p. 807-876. 1965.

MINNIKIN, D.E. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. **Res. Microbiol**., v. 142, p. 423-429. 1991.

MITCHISON, D.A. Modern methods for assessing the drugs used in the chemotherapy of micobacterial disease. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 72-80. 1996.

MONIOT-VILLE, N. et al. Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* highly resistant to fluoquinolones but susceptible to nalidixic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 519-523. 1991.

MORRIS, S.L.; ROUSE, D.A. The genetics od multiple drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* an the *Mycobacterium avium* complex. **Research in Microbiology**, v. 147, p. 68-73. 1996.

O'BRIEN, R.J. et al. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States: results from a national survey. **American Review of Respiratory Disease** , v. 135, p. 1007-1014. 1987.

O'BRIEN, R.J. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial disease. **Clinics in Chest Medicine** , v. 10, 407-418. 1989.

PAGE, C.P.; et al. **Farmacologia Integrada**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1999. 606 p.

PORTAELS, F. Epidemiology of mycobacterial diseases. **Clinics in Dermatology**, v.13, p.207-222. 1995.

RAI, M.; KAUR, B. Synthesis of 1,2,4-oxadiazolines having antifungical activity. **J. Ind. Chem. Soc**., v. 114, p. 1179. 1982.

RASTOGI N. et al. Multiple drug resistance in Mycobacterium avium: is the wall arquitecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? **Antimicrob. Agents Chemother**., v.20, p.666-667. 1981.

RASTOGI, N.; FREHEL, C.; DAVID, H.L. Triple-layered structure of mycobacterial cell wall: evidence for the existence of a polysaccharide-rich outer layer in 18 mycobacterial species. **Current Microbiology**, v.13, p. 237-242. 1886.

RASTOGI, N. et al. Antibacterial action of amphipathic derivatives of isoniazid against the *Mycobacterium avium* complex. **Zbl. Bakt. Hyg** ., A 268, p.456-462. 1988.

RASTOGI, N.; DAVID, H.L.Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. **Biochimie** , v. 70, p. 1101-1120. 1988.

RASTOGI, N. Killing intracellular mycobacteria in *in vitro* macrophage systems: what may be the o known host microbicidal mechanisms?. **Research in Microbiology**, v.242, p. 217-230. 1989.

RASTOGI N.; GOH K.S. Action of 1-isonicotinyl-2-palmitoyl hydrazine against the *Mycobacterium avium* complex and enhancement of its activity by *m*-fluorophenylalanine. Antimicrobial **Agents and Chemotherapy**, v.34,n.11, p. 2061-2064. 1990.

RASTOGI N.; GOH K.S.; DAVID H.L. Enhancement of drug susceptibility of *Mycobacterium avium* by inhibitors of cell envelope synthesis. Antimicrob. **Agents Chemother**., v.34, p. 759-764. 1990.

RASTOGI, N.; HELLIO, R. Evidence that the capsule around mycobacteria grown in axenic media contains mycobacterial antigens: implications at the level of cell envelope architecture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 70, p. 161-166. 1990.

RASTOGI, N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. **Res. Microbiol.**, v. 142, p.464-476. 1991.

RASTOGI, N. Structure and functions of the cell envelope in relation to mycobacterial virulence, pathogenicity and multiple drug resistance. **Res**. **Microbiol**, v. 142, p. 419. 1991.

RASTOGI, N.; LABROUSSE, V.; SOUSA, J.P.C. Mycobacterial growth and ultrastructure in mouse L-929 fibroblast and bone marrow-derived macrophages: evidence that infected fibroblast secrete mediators capable of modulating bacterial growth in macrophages. **Current Microbiology**, v. 25, p. 203-213. 1992.

RASTOGI, N.; GOH, K.S.; LABROUSSE, V. Activity of subnhibitory concentrations of dapsone alone and in combination with cell-wall inhibitors against *Mycobacterium avium* complex organisms. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**., v. 12, p. 954-958. 1993.

RASTOGI, N. et al. Potencial drug targets for *Mycobacterium avium* defined by using radiometic drug-inhibitor combination techniques. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.38, p. 2287-2295. 1994.

RASTOGI, N., BARROW, W.W. Cell envelope constituents and the multifaceted nature of *Mycobacterium avium* pathogenicity and drug resistance. **Researche in Microbiology**, v. 145, p. 243-252. 1994.

RASTOGI, N. et al. Identification of new drug targets in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*.13th. Forum in Microbiology. **Res. Microbiol**., v.147, p. 97-105. 1996.

RASTOGI, N.; FALKINHAM, J.O. Solving the dilemma of antimycobacterial chemotherapy. **Res. Microbiol**., v.147, p. 7-121. 1996.

RASTOGI, N., LABROUSSE, V., GOH, K.S. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain im human macrophages. **Current Microbiology**, v.33, p. 167-175. 1996.

RASTOGI, N. et al, 1998. Synergistic activities of antituberculous drugs with cerulenin and *trans*-cinnamic acid against *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 149-157. 1998.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 1-14. 1998.

REICHMAN, L.B. Multidrug resistance in the world: the presente situation. **Chemotherapy**, v. 42, p. 2-9. 1996.

RENAUD, F. et al. Les mycobactéries non tuberculeuses ou mycobactéries “atypiques”. **Bacteriologie Medicale Pratique**, v. 40, p. 187-194. 1989.

RICE, L.B.; BONOMO, R.A. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4thed. New York: Wlliams e Wilkins, 1996. p. 453-495.

ROBBERS, E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372 p.

ROBERTS, I.S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol**., v. 50, p. 285-315. 1996.

ROUSE, D.A.; MORRIS, S.L. Molecular mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother**., v.39, p. 2472-2477. 1995.

RUNYON E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am., v. 45, p. 273-290. 1959. In: KULLAVANIJAYA, P. Atypical mycobacterial cutaneos infections. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 153-158. 1999.

SALFINGER, M.; PFFYFFER, G.E. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 13, p. 961-979. 1994. In: GRANGE, J.M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 81, p. 1-9. 1996.

SANTOS FILHO, J.M.S. **Planejamento bioisostérico, síntese e avaliação farmacológica de novos análogos 1,2,4-oxadiazólicos**. 2002. 189 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SEPKOWITS, K. A. et al. Tuberculosis in the AIDS era. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 180-199. 1995.

SILVA, M.C.F. **Efeito de concentrações subinibidoras de diversas drogas e de suas associações frente ao *M. fortuitum e M. smegmatis*.** 2201. 105 f. Dissertação (Mestrrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SKERMAN, V.D.B. et al. Approved lists of bacterial names. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 30, p. 225-420. 1980. In: GRANGE, J.M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 81, p. 1-9. 1996.

SMITH, D.T.; WILLETT, H.P. *Mycobacterium tuberculosis*. In: JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P., AMOS, D.B. **Zinsser Microbiologia**. 17. ed. Buenos Airres: Editorial Medica Panamericana, 1983. p. 611-633.

SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. **Molecular Genetics of Bactetia**. Washington: ASM Press, 1997. 504 p.

SOLA, C. et al. Combined numerical analysis base don the molecular description of Mycobacterium tuberculosis by four rpetitive sequence-based DNA typing systems. **Res. Microbiol**., v.149, 349-360. 1998.

SOUSA, A.A.A. **Detrminação do efeito pós-antibiótico e avaliação das alterações ultra-estruturais induzidas pela ciprofloxacina, rifampicina, isoniazida, fleroxacina e suas associações frente ao *M. fortuitum***. 2001. 142 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

STRATTON, C.W. Mechanisms of action for antimicrobial agents: general principles and mechanisms for selected classes of antibiotics. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4thed. New York: Wlliams e Wilkins, 1996. p. 579-602.

SUTTER, V.L., KWOK, Y.Y., BULKACS, J. Comparative activity of ciprofloxacin against anaerobic bacteria. **Antomicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p 427-428. 1985.

SUZUKI, A.E.; INAMINE, J.M. Genetic aspects of drug resistance in Mycobacterium avium. **Res. Mcrobiol.**, v. 145, p. 210-213. 1994.

TAKAYAMA, K.; DATTA, A.K. Structure-function relationship of mycobacterial cell envelope components. **Res. Microbiol**., v. 142, p. 443-447. 1991.

TARANTINO, F.B. **Doenças Pulmonares**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1099 p.

TEXIER-MAUGEIN, J. et al. In vitro activity of four fluoroquinolones against eighty-six isolates of mycobacteria. **Eur. J. Clin. Microbiol**., v. 6, p. 584-586. 1987.

TIMPE, A.; RUNYON, E.H. The relationship of "atypical" acid fast bacteria to human disease: a preliminary report. J. Lab. Clin. Med., v. 44, p. 202-209. 1954. . In: KULLAVANIJAYA, P. Atypical mycobacterial cutaneos infections. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 153-158. 1999.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 827 p.

TRIPATHI et al. Synthesis of glycosylated ß-amino acids as new class of antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 773-781. 2002.

VALENÇA, E.R.C. **Efeito bactericida de diversos antibióticos sobre *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis***. 1999. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

WALLACE, R.J. Jr. et al. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 142, p. 940-953. 1990.

WAYNE, L.G. The “atypical” mycobacteria: recognition and disease association. **CRC Critical Reiews in Microbiology**, v. 12, p. 185-222. 1985.

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P. Family *Mycobacteriaceae* chester 1897. In: **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**. v. 2. Baltimore: Williams e Wilkins, 1989. p. 1436-1457.

WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **American Review of Respiratory Disease** , v. 119, p. 107-159. 1979.

WOLINSKY, E. Mycobacterial diseases ather than tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.15, p. 1- 12. 1992.

WOLFSON, J.; HOOPER, D.C. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resitance, and spectra of activity *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, p. 581-586. 1985.

YOUMANS, G.P. The pathogenic “atypical” mycobacteria. **Am. Rev. Microbiol.**, v.17, p. 473-494. 1963.

ZHANG, Y. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 358, p. 591-593. 1992.

Tabela 5: Atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, da ofloxacina, do *p*-flúor-fenilalanina e de suas associações frente o *M. fortuitum*. X = média das UFC/mL e d = ± o desvio padrão.

UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS – UFC/mL (log_{10})												
TEMPO / DROGAS	T_0		T_1(24hs)		T_2(48hs)		T_3(72hs)		T_4(96hs)		T_5(120hs)	
	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d
CONTROLE	6,75	±0,04	6,85	±0,09	7,39	±0,07	7,49	±0,09	7,69	±0,09	7,84	±0,19
F-PHE	6,75	±0,04	6,78	±0,10	7,33	±0,10	7,41	±0,12	7,64	±0,06	7,79	±0,17
HHBA	6,75	±0,04	6,12	±0,31	5,75	±0,26	5,63	±0,20	5,42	±0,36	5,30	±0,39
OFLO	6,75	±0,04	6,48	±0,33	4,17	±0,22	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
F-PHE+HHBA	6,75	±0,04	6,25	±0,40	5,99	±0,34	5,93	±0,31	5,72	±0,59	5,67	±0,59
F-PHE+OFLO	6,75	±0,04	5,98	±0,14	4,06	±0,49	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
OFLO+HHBA	6,75	±0,04	5,52	±0,67	3,50	±0,51	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00
OFLO+HHBA +F-PHE	6,75	±0,04	5,30	±0,42	3,58	±0,15	0,00	±0,00	0,00	±0,00	0,00	±0,00

Tabela 6: Diminuição das UFC/mL (log_{10}) do inóculo inicial exposto ao derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, a *p*-flúor-fenilalanina, a ofloxacina e às suas associação frente o *M. fortuitum*.

DIMINUIÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO (log_{10})					
TEMPO / DROGAS	T_1(24hs)	T_2(48hs)	T_3(72hs)	T_4(96hs)	T_5(120hs)
F-PHE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HHBA	0,63	1,00	1,12	1,33	1,45
OFLO	0,27	2,58	6,75	6,75	6,75
F-PHE+HHBA	0,50	0,76	0,82	1,05	1,08
F-PHE+OFLO	0,77	2,69	6,75	6,75	6,75
OFLO+HHBA	1,23	3,25	6,75	6,75	6,75
OFLO+HHBA +F-PHE	1,45	3,17	6,75	6,75	6,75

Tabela 7: Atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, da ofloxacina, do *p*-flúor-fenilalanina e de suas associações frente o *M. smegmatis*. X = média das UFC/mL e d = ± o desvio padrão.

UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS – UFC/mL (log_{10})												
TEMPO / DROGAS	T_0		T_1(24hs)		T_2(48hs)		T_3(72hs)		T_4(96hs)		T_5(120hs)	
	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d	$\overline{X}$	d
CONTROLE	6,58	±0,29	7,01	±0,10	7,20	±0,07	7,30	±0,16	7,55	±0,23	7,70	±0,29
F-PHE	6,58	±0,29	6,89	±0,08	7,11	±0,08	7,20	±0,12	7,43	±0,29	7,59	±0,31
HHBA	6,58	±0,29	6,36	±0,11	5,28	±0,16	4,96	±0,18	4,44	±0,09	4,17	±0,17
OFLO	6,58	±0,29	6,29	±0,66	6,07	±0,59	5,16	±0,87	4,52	±0,60	3,90	±0,54
F-PHE+HHBA	6,58	±0,29	6,28	±0,15	5,29	±0,27	5,05	±0,26	4,90	±0,40	4,50	±0,25
F-PHE+OFLO	6,58	±0,29	6,36	±0,49	5,97	±0,87	5,63	±0,58	4,51	±0,82	3,49	±0,31
OFLO+HHBA	6,58	±0,29	6,05	±0,61	4,98	±0,53	4,61	±0,37	4,29	±0,16	3,84	±0,50
OFLO+HHBA +F-PHE	6,58	±0,29	5,72	±0,42	4,97	±0,34	4,40	±0,31	4,05	±0,38	3,59	±016

Tabela 8: Diminuição das UFC/mL (log_{10}) do inóculo inicial exposto ao derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, a *p*-flúor-fenilalanina, a ofloxacina e às suas associação frente o *M. smegmatis.*

DIMINUIÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO (log_{10})					
TEMPO / DROGAS	T_1(24hs)	T_2(48hs)	T_3(72hs)	T_4(96hs)	T_5(120hs)
PHE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HHBA	0,22	1,30	1,62	2,14	2,41
OFLO	0,29	0,51	1,42	2,06	2,68
F-PHE+HHBA	0,30	1,29	1,53	1,68	2,08
F-PHE+OFLO	0,22	0,61	0,95	2,07	3,09
OFLO+HHBA	0,53	1,60	1,97	2,29	2,74
OFLO+HHBA +F-PHE	0,86	1,61	2,18	2,53	2,99