

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

**EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO DE UM NOVO DERIVADO 1,2,4-
OXADIAZOL-HIDRAZIDA E SUAS ASSOCIAÇÕES FRENTE AO
*Mycobacterium fortuitum e Mycobacterium smegmatis***

Renato Antonio dos Santos Oliveira

Recife-2004

Renato Antonio dos Santos Oliveira

**EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO DE UM NOVO DERIVADO 1,2,4-
OXADIAZOL-HIDRAZIDA E SUAS ASSOCIAÇÕES 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: Prof^a Dr^a Eulália C.P. de Azevedo
Ximenes

Recife-2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *RENATO ANTONIO DOS SANTOS OLIVEIRA* AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 18 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. LÚCIA FERNANDA CAVALCANTI DA COSTA LEITE
Departamento de Química - UNICAP



Dra. SILENE CARNEIRO DO NASCIMENTO
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. MARIA TERESA JANSEM DE ALMEIDA CATANHO
Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

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

Reitor:

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-reitor:

Prof. Dr. Geraldo José Marques Pereira

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação:

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Diretor do Centro de Ciências Biológicas:

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Santos Cabral

Chefe do Departamento de Antibióticos:

Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos:

Prof^a. Dr^a. Alda de Andrade Chiappeta

Vice-Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos

Prof^a. Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcante de Albuquerque

EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO DE UM NOVO DERIVADO 1,2,4-OXADIAZOL-
HIDRAZIDA E SUAS ASSOCIAÇÕES FRENTE AO *Mycobacterium fortuitum* e
Mycobacterium smegmatis

Renato Antônio dos Santos Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eulália C.P. de Azevedo Ximenes

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dr^a. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho
Departamento de Biofísica e Radiobiologia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dr^a. Lúcia Fernanda C. da Costa Leite
Departamento de Química
Universidade Católica de Pernambuco

Dedico esse trabalho com todo amor e carinho:

A minha amada esposa Janaína Correia;
Aos meus pais, Antonio José C. S. Oliveira
e Maria Costa S.Oliveira;
Aos meus irmãos Rodrigo e Rodolfo;
Aos meus avós, tios, tias e primos;
Obrigado pela confiança e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela luz nos momentos de dificuldade e por colocar as pessoas certas na minha vida.

A ORIENTADORA, Prof^a. Dr^a. Eulália Camelo Pessoa Azevedo Ximenes, minha gratidão pela orientação, amizade, pela confiança em mim depositada e por compartilhar conosco seus conhecimentos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, pela amizade e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, do setor de meio 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 durante todo este trabalho.

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

Aos meus companheiros do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Karen Pena de Souza Cavalcanti, Cristiane dos Santos Rocha, Joás Lucas da Silva e Denise Patrícia Lins de Azevedo, pela amizade e compreensão.

Aos meus companheiros de Mestrado, Andréa Apolinário, Andréa Lopes, Edelvio Gomes, Elizama Rosa, Érika Vieira, Flávia de Toni, João da Silva, Karen Pena, Luciméri Magalhães,

Patrícia Sobral, Sibeles Ribeiro, Valdemir Cordeiro, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1.0 Introdução	15
2.0 Objetivos	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3.0 Revisão da Literatura	18
3.1 Micobactérias Atípicas	18
3.2 Classificação	19
3.3 Ecologia	21
3.4 Infecção	22
3.5 Tratamento e Resistência	23
3.6 Parede Celular	24
3.6.1 Ácidos Micólicos	27
4.0 Estudos das Drogas	30
4.1 Generalidades	30
4.2 Fluorquinolonas	31
4.2.1 Ofloxacino	32
4.3 <i>m</i> -Fluor-Fenilalanina	33
4.4 Derivados 1,2,4-Oxadiazóis	34
4.4.1. [3-(<i>p</i> -Hidroxi-Fenil)1,2,4-Oxadiazol-5-il] Acil	
Hidrazina (HHBA)	35
5.0 Parte Experimental	37

5.1 Material	37
5.1.1 Microrganismos	37
5.1.2 Meios de Cultura	37
5.1.3 Drogas	37
5.2 Métodos	38
5.2.1 Princípio	38
5.2.2 Protocolo Experimental	38
5.3 Critérios de Interpretação	40
5.4 Resultados	43
5.4.1 Valores de EPA e Influência do Tempo de Contato- <i>Mycobacterium fortuitum</i>	43
5.4.1.1 Efeito Bactericida- <i>Mycobacterium fortuitum</i>	44
5.4.1.2 Efeito Pós-Antibiótico- <i>Mycobacterium fortuitum</i>	45
5.4.2 Valores de EPA e Influência do Tempo de Contato- <i>Mycobacterium smegmatis</i>	46
5.4.2.1 Efeito Bactericida- <i>Mycobacterium smegmatis</i>	47
5.4.2.2 Efeito Pós-Antibiótico- <i>Mycobacterium smegmatis</i>	48
6.0 Discussão	49
7.0 Conclusões	51
8.0 Referências Bibliográficas	52
Anexo 1	60
Anexo 2	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema da parede celular das micobactérias

FIGURA 2 – Diferentes moléculas de ácidos micólicos encontradas entre as micobactérias. (A) ácido micólico α ; (B) metoximicolato; (C) cetomicolato; (D) cera éster; (E) epoximicolato

FIGURA 3 – Estrutura das GLPs tipo-C ou micosídeo C

FIGURA 4 – Molécula da ofloxacino

FIGURA 5 – Molécula da *m*-fluor-fenilalanina

FIGURA 6 – Esquema da biossíntese do micosídeo C e mecanismo de ação do *m*-FFen

FIGURA 7 – 1,2,4-oxadiazoles

FIGURA 8 – Estrutura química do 3-(*p*-Hidroxi-Fenil)1,2,4-Oxadiazol-5-il] Acil Hidrazina

FIGURA 9 - Estrutura química da Isoniazida

FIGURA 10 - Esquema da determinação *in vitro* do efeito pós-antibiótico

FIGURA 11 - EPA da ofloxacino frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 12 - EPA do HHBA frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 13 - EPA do *m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 14 - EPA da associação OFLO-HHBA frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 15 - EPA da associação OFLO-*m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 16 - EPA da associação HHBA-*m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 17 - EPA da associação OFLO-HHBA-*m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 18 - EPA da ofloxacino frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 19 - EPA do HHBA frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 20 - EPA do *m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 21 - EPA da associação OFLO-HHBA frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 22 - EPA da associação OFLO-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 23 - EPA da associação HHBA-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

FIGURA 24 - EPA da associação OFLO-HHBA-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Classificação das espécies de micobactérias segundo a sua velocidade de crescimento e sua pigmentação

TABELA II - Classificação das espécies de micobactérias segundo a sua patogenicidade

TABELA III – Concentração Mínima Inibitória do HHBA, da ofloxacino e do *m*-fluor-fenilalanina, para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*

TABELA IV - Influência dos tempos de contato de 2 e 4 horas sobre o efeito bactericida e os valores de EPA do HHBA, ofloxacino e *m*-fluor-fenilalanina e de suas associações para o *Mycobacterium fortuitum*

TABELA V - Influência dos tempos de contato de 2 e 4 horas sobre o efeito bactericida e os valores de EPA do HHBA, ofloxacino e *m*-fluor-fenilalanina e de suas associações para o *Mycobacterium smegmatis*

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP – Coenzima A
AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATP – Adenosina Trifosfato
BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
C - Controle
°C – Graus Celsius
CMI – Concentração Mínima Inibitória
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
EPA – Efeito Pós-Antibiótico
FAS – Fatty acid synthesise
GL - Glicolipídeos
GPL - Glicolipopeptídios
HHBA – 1,2,4-Oxadiazol-Hidrazida
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
LAM – Lipoarabinomananas
LM - Lipomananas
Log₁₀ – Logaritmo Decimal
m-FFen – meta-Flúor-Fenilalanina
mL – Mililitro
OFLO - Ofloxacino
pH – Potencial Hidrogeniônico
PIM - Fosfatidilinositol manosídeo
T - Teste
UFC - Unidades Formadoras de Colônias
v/v – Volume/Volume
µg – Microgramas
µL - Microlitros
NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

RESUMO

A freqüente resistência das micobactérias atípicas às drogas antituberculose, a ausência de esquemas terapêuticos eficazes e os estudos concernentes à aplicação de novas moléculas sobre micobactérias motivaram a determinação do efeito pós-antibiótico (EPA) *in vitro* de um novo derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida (HHBA) e de suas associações com o quimioterápico ofloxacino (OFLO), uma fluorquinolona, e o *m*-Flúor-Fenilalanina (*m*-FFen), um inibidor da síntese da parede celular. O EPA foi avaliado após o tempo de contato de 2 e 4 horas frente ao *Mycobacterium fortuitum* e ao *Mycobacterium smegmatis*. As drogas foram testadas em concentrações equivalentes a concentração inibitória mínima (CIM). Considerado um parâmetro farmacodinâmico de grande relevância em situações clínicas, o EPA exerce a sua maior importância na escolha do antimicrobiano, nos regimes de dosagem terapêutica e nos seus intervalos de administração. O EPA pode ser induzido pela exposição do microrganismo ao antimicrobiano por um período de tempo determinado, seguindo da rápida retirada deste antimicrobiano, e o acompanhamento do recrescimento deste microrganismo. Matematicamente, o EPA é calculado pela fórmula: $EPA = T - C$, em que T representa o tempo necessário para que a cultura teste cresça o equivalente a $1 \log_{10}$ em relação à numeração efetuada logo após a retirada da droga e C representa o tempo necessário para que a cultura controle cresça igualmente de $1 \log_{10}$. O que concerne ao efeito pós-antibiótico sobre o *M. fortuitum* após 2 horas de contato a OFLO apresentou os maiores valores de EPA, $8,60 \pm 1,50$ horas. Todas as associações mostraram-se antagônicas com exceção da HHBA+*m*-FFen que induziu a um EPA indiferente de $1,20 \pm 1,20$ horas. Após 4 horas de contato, a OFLO continuou apresentando a melhor atividade cujo EPA foi equivalente a $11,50 \pm 2,00$ horas, sua associação com a *m*-FFen apresentou um EPA indiferente de $11,00 \pm 2,70$ horas. As demais associações apresentaram-se antagônicas. O efeito pós-antibiótico do HHBA frente ao *M. smegmatis* após um contato de 2 horas foi de $2,40 \pm 2,80$ horas e a sua associação com a OFLO mostrou ser a mais efetiva cujo valor do EPA foi de $3,30 \pm 2,80$ horas. Após 4 horas de contato o EPA do HHBA não foi alterado, permanecendo em $3,30 \pm 2,60$ horas. O aumento do tempo de contato induziu um aumento dos valores do EPA para as drogas estudadas e suas associações, exceto o *m*-FFen, as associações OFLO-HHBA e OFLO-HHBA-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, e o HHBA e sua associação HHBA-*m*-FFen, frente ao *M. fortuitum*. A ofloxacino foi o antimicrobiano que induziu os melhores valores de EPA para o *M. fortuitum*, bem como o HHBA foi o antimicrobiano que induziu os melhores valores de EPA para o *M. smegmatis*. O aumento do tempo de contato de 2 para 4 horas potencializou os EPAs das drogas estudadas. Todas as associações testadas apresentaram um caráter antagônico, exceto a associação OFLO-*m*-FFen após 4 horas de contato, frente o *M. smegmatis*. E os tempos de contatos escolhidos, bem como a CMI utilizada para os ensaios, foram insuficientes para que as drogas e suas associações pudessem induzir EPAs sinérgicos. Como os mecanismos do EPA ainda não estão totalmente definidos é difícil lançar hipóteses acerca do qual ou quais mecanismos estão implicados na variação dos resultados dos EPAs de drogas testadas em associação.

ABSTRACT

The frequent resistance of atypical micobacteria for antituberculous drugs, the absence of efficient therapeutical scheme and the studies about applications of new molecules against micobactérias induced us to determinate the postantibiotic effect (PAE) *in vitro* of a new derivative 1,2,4-oxadiazole-hidrazide (HHBA) and its associations with ofloxacin (OFLO) and *m*-fluoro-phenylalanine (*m*-FFen), an cell wall biosynthesis inhibitor. The PAE was evaluated after 2 and 4 hours time exposure against *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. This drugs was tested at their minimal inhibitory concentration (MIC). PAE is a pharmacodimamic parameter and perform its major importance at the antimicrobial agent choice, at therapeutical doses regime and theirs administration interval. The PAE can be induced through to microrganism exposure to a drug for a determinate time, followed an rapid removal of this drug, and follow the microrganism regrowth. For quantitation of the PAE the following equation was developed: $PAE = T - C$, where T is the time required for the count of UFC in the test culture to increase 1 \log_{10} , above the count observed immediately after drug removal and C is the time required for the count of UFC in an untreated control to increase by 1 \log_{10} , above the count observed immediately after completion of the same procedure on the test culture for drug removal. About the *M. fortuitum* PAE after 2 hours exposure the OFLO showed the longest PAE, $8,60 \pm 1,50$ hours. All associations were antagonistic, except HHBA-*m*-FFen who induced an indifferent PAE of $1,20 \pm 1,20$ hours. After 4 hours exposure, the OFLO continued showing the highest PAE of $11,50 \pm 2,00$ hours, and its association with *m*-FFen showed an indifferent PAE of $11,00 \pm 2,70$ hours. All others associations were antagonistic. The PAE of HHBA against *M. smegmatis* after 2 hours exposure was $2,40 \pm 2,80$ hours and its association with OFLO was the best association with a PAE of $3,30 \pm 2,80$ hours. After 4 hours of contact the HHBA PAE's did not change, remaining in $3,30 \pm 2,60$ hours. The increase of contact time induced an increase of PAE values at the tested drugs and theirs associations, except the *m*-FFen, and the associations OFLO-HHBA and OFLO-HHBA-*m*-FFen against the *M. smegmatis*, and the HHBA and its association with *m*-FFen, against *M. fortuitum*. The ofloxacin was the drug that induced the best PAEs against the *Mycobacterium fortuitum*, and the HHBA was the drug that induced the best PAEs against the *Mycobacterium smegmatis*. The increase of exposure time, from 2 to 4 hours, provided an increase in the PAEs induced for all studied drugs. All associations tested were antagonistic, except the association OFLO-*m*-FFen, after 4 hours exposure, against *M. smegmatis*. The exposure times and the MIC used in all assay was not sufficient to induce synergic PAEs. As the mechanisms of the PAEs for the different drugs are still unclear, it would be difficult to speculate about the processes underlying the variations in PAEs when drugs are tested in different combinations.

1.0 INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é o agente causal de sérias e disseminadas doenças nos homens e animais. Tem sido reportado que sua eliminação dos corpos dos hospedeiros bem como do ambiente é bastante difícil. As micobactérias são a principal causa de morbidade e mortalidade em todo mundo (GRANGE et al, 1996).

As micobacterioses humanas mais importantes são a tuberculose e a lepra, causadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, respectivamente. Muitas espécies de micobactérias são saprófitas ambientais contudo, algumas dessas podem causar doenças oportunistas em homens e animais. Estas micobactérias oportunistas são chamadas de micobactérias não-tuberculose, micobactérias outras que não a da tuberculose (MOOT), ou ainda micobactérias atípicas (GRANGE et al, 1996; KENNEDY et al, 2003).

As micobactérias atípicas têm sido reconhecidas como agente de doenças em humanos e animais. Estas infecções são comumente adquiridas a partir de fontes ambientais como água e solo, de onde elas têm sido isoladas. (KENNEDY et al, 2003).

O surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), no início da década de 1980, proporcionou uma alteração profunda na epidemiologia das infecções causadas pelas micobactérias atípicas. A forte influência do vírus da imunodeficiência adquirida humana sobre a epidemiologia das infecções por micobactérias se dá pelo sinergismo patogênico existente entre estes dois microrganismos. O HIV cria uma situação favorável para a instalação e disseminação das micobactérias ao provocar uma redução na contagem dos linfócitos T CD₄⁺, que são as principais células envolvidas na formação do granuloma. (RASTOGI et al, 1995; FALKINHAM III, 1996; RODRÍGUEZ et al, 2001; LAWN, et al, 2002; MACCARI et al, 2002)

A quimioterapia das infecções micobacterianas é prejudicada pela resistência natural destes microrganismos às drogas de diferentes classes químicas. A parede celular exerce um papel importante nesta resistência. Por este motivo, esforços são concentrados no sentido de desenvolver terapias alternativas, quer seja pela utilização de drogas de segunda-linha para o tratamento da tuberculose, tais como a ciprofloxacina, etionamida e canamicina, ou pelo desenvolvimento de novas drogas antimicobacterianas, mais eficazes que atinjam alvos específicos da bactéria, sendo a parede celular um destes alvos (FALKINHAM III, 1996; MACCARI et al, 2002).

Outra estratégia é tentar potencializar a ação de moléculas usuais alterando sua estrutura química, pela associação com outros compostos naturais ou sintéticos. Como a

melantonina, uma substância natural, que potencializou a atividade da isoniazida contra cepas resistentes e o 1-isonicotinil-2-palmitoil hidrazina, que é derivado a partir de uma de adição entre a isoniazida e o ácido palmítico (RASTOGI, et al, 1988; WIID, et al, 1999).

A parede celular das micobactérias é composta por uma tripla camada. A mais externa é formada essencialmente por um complexo de moléculas anfipáticas, os ácidos micólicos, que impedem a difusão de alguns quimioterápicos através da parede celular, induzindo uma resistência natural por exclusão (RASTOGI et al, 1988).

Como o principal alvo de resistência das micobactérias é a parede celular, a inibição de sua síntese por um inibidor específico associado a outras drogas poderia potencializar a ação destas últimas. O derivado do aminoácido fenilalanina, o *m*-flúor-fenilalanina, foi utilizado como inibidor da síntese da parede celular, mais precisamente inibindo a síntese do micosídeo C, aumentando assim, a permeabilidade da parede celular potencializando a ação de várias drogas e associações (RASTOGI et al, 1990a).

A escolha de um agente antimicrobiano depende de aspectos microbiológicos, químicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos. O conhecimento sobre a farmacodinâmica dos antimicrobianos permite a determinação de regimes padronizados de dosagens que incluem a duração e o intervalo entre elas (LEVISON et al, 1995).

O efeito pós-antibiótico (EPA) é um parâmetro farmacodinâmico que permite um refinamento na escolha do antibiótico e a otimização da posologia. Consiste na persistência da inibição do crescimento bacteriano, mesmo após a retirada do antibiótico (CRAIG & GUDMUNDSSON 1996; ZHANEL et al 1998).

O derivado hidrazínico [3-(*p*-hidroxi-fenil)1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazina (HHBA) foi sintetizada no Laboratório de Planejamento e Síntese Fármacos do Departamento de Antibióticos. Esta molécula caracteriza-se por apresentar dois grupos farmacofóricos o anel 1,2,4-oxadiazol e o radical hidrazínico, conferindo a esta molécula propriedades antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica (ELOY, 1965).

Afim de desenvolver um novo esquema terapêutico que possa vir a ser utilizado no tratamento da micobacterioses foi objetivado a determinação do EPA do HHBA, da ofloxacino e do *m*-flúorfenilalanina e de suas associações sobre o *Mycobacterium fortuitum* e o *Mycobacterium smegmatis*.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

Diante da ausência de uma terapia eficaz para o tratamento das infecções provocadas pelo *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis* e levando em consideração a sua resistência natural às drogas antituberculose, este trabalho objetivou:

- Determinar o efeito pós-antibiótico (EPA) da [3-(*p*-hidroxi-fenil)1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazina (HHBA), da ofloxacino e do *m*-fluor-fenilalanina e de suas associações frente ao *Mycobacterium fortuitum* e o *Mycobacterium smegmatis*.

2.2 Específicos

- Estudar a influência do tempo de contato de 2 e 4 horas sobre o EPA do HHBA, da Ofloxacino (OFLO), e *m*-flúor-fenilalanina (*m*-FFen), e de suas associações;
- Caracterizar os tipos de interações entre o HHBA, OFLO e *m*-FFen.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micobactérias Atípicas

As micobactérias são bactérias pertencentes à Classe Schizomycetes, da Ordem Actinomycetales, da Família Mycobacteriaceae e do Gênero *Mycobacterium*. As micobactérias são bacilos levemente encurvados, medindo cerca de 2 a 4µm de comprimento e 0,2 a 0,5µm de diâmetro são aeróbios obrigatórios, não-esporulados e imóveis. A principal característica do gênero *Mycobacterium* é a sua incapacidade de corar-se bem, pelos corantes de Gram, devido à alta concentração de lipídios em sua parede celular. Para obter uma coloração adequada são utilizados métodos que favorecem a penetração dos corantes. O método de Ziehl-Neelsen é o mais indicado, ele trata a micobactéria com uma solução de fucsina-fenicada. O fenol aumenta a penetração da fucsina nos lipídios da parede. Uma vez corada a bactéria resiste ao descoloramento com uma solução de álcool-ácido. Devido a esta resistência, as micobactérias são classificadas como bactérias álcool-ácido resistentes – BAAR, resistência esta que lhe é conferida pela sua parede celular (TORTORA, 2000).

Em microscopia eletrônica a parede celular aparece bem mais espessa que as das outras bactérias e composta por uma tripla camada. Possuem uma quantidade elevada de lipídios, cerca de 60% de seu peso seco, sendo que dentre os principais são os ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são lipídios complexos e exclusivos das micobactérias. Estes compostos estão envolvidos no mecanismo de antigenicidade (DAVID et al 1987; TORTORA, 2000).

As micobactérias podem ser classificadas em três diferentes categorias, segundo sua patogenicidade. A primeira compreende as micobactérias causadoras da tuberculose humana (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). A segunda categoria é composta pelas micobactérias atípicas cultiváveis *in vitro*. A terceira e última categoria é composta pelas micobactérias responsáveis pela lepra no homem (*M.leprae*) e rato, (*M. lepraemurium*) (MINOR & VÉRON, 1982 apud SOUZA, 2001).

As micobactérias atípicas podem também ser denominadas como micobactérias não-tuberculosas, micobactérias outras que não a da tuberculose (MOTT), micobactérias ambientais e micobactérias oportunistas, sendo esta última denominação a mais amplamente usada (O'BRIEN et al, 1989).

Apesar da utilização do termo “atípica”, estes microorganismos fazem parte de espécies bacterianas com características biológicas bastante definidas. São microorganismos

comensais ao homem e apenas em condições especiais podem ser patogênicas, apresentando manifestações clínicas semelhantes as das infecções causadas pelas espécies do complexo tuberculose. São consideradas atípicas, pois o agente etiológico não é membro do complexo *M. tuberculosis*. (CREMIEUX, 1963; JENKINS, 1990; BERCHE et al., 1998; apud SOUZA, 2001)

As micobactérias atípicas têm sido reconhecidas, desde o início da década de 50 como agente de doenças em humanos. Estas infecções são comumente adquiridas a partir de fontes ambientais como água e solo, de onde elas têm sido comumente isoladas. (KENNEDY et al., 2003)

As micobactérias atípicas potencialmente patogênicas para humanos são: o complexo *Mycobacterium avium*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. malmoensae*, *M. abscessus*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. simiae* e *M. scrofulaceum*. (KENNEDY et al, 2003).

3.2 Classificação

As micobactérias foram inicialmente classificadas em grupos, segundo Runyon, levando em consideração as características da cultura, em meio Lowenstein-Jensen, como o tempo de crescimento e a pigmentação da colônia na presença ou ausência de luz (tabela I). Os pigmentos formados pelas micobactérias podem ser de quatro natureza química distintas: carotenóides, flavinas, naftoquinonas e porfirinas. (DESBORDES, 1951; GRANGE et al, 1996)

As micobactérias atípicas são divididas em microrganismos de crescimento rápido (3-5 dias) e de crescimento lento (2-3 semanas). Os microrganismos ainda são classificados de acordo com a sua pigmentação, ou seja, a sua habilidade de produzir um pigmento carotenóide. A foto-indução para a formação de carotenóide envolve luz de baixo comprimento de onda e ocorre apenas na presença de O₂, pois sua função é de proteger a micobactéria contra os danos oxidativos. Baseado na pigmentação as micobactérias podem ser classificadas em três grupos: **não cromógenas**, **fotocromógenas** e **escotocromógenas**, contudo nem todas as micobactérias podem ser classificadas por esta metodologia, visto que, ainda encontram-se micobactérias que não podem ser cultivadas *in vitro*, a exemplo do *M. leprae*, *M. genavense*, *M. confluentis*, *M. intermedium*, *M. interjectum* (GRANGE et al, 1996).

Tabela I: Classificação das espécies de micobactérias segundo a sua velocidade de crescimento e sua pigmentação (GRANGE et al, 1996).

Crescimento Lento	<i>M. bovis</i> (N)	<i>M. africanum</i> (N)	
	<i>M. tuberculosis</i> (N)	<i>M. kansasii</i> (P)	<i>M. marinum</i> (P)
	<i>M. microti</i> (N)	<i>M. asiaticum</i> (P)	<i>M. gordonae</i> (S)
	<i>M. simiae</i> (P)	<i>M. szulgai</i> (S)	<i>M. avium</i> (N)
	<i>M. scrofulaceum</i> (S)	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. paratuberculosis</i> (N)
	<i>M. intracellulare</i> (N)	(N)	<i>M. farcinogenes</i> (N)
	<i>M. malmoense</i> (N)	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
	<i>M. triviale</i> (N)	(N)	(N)
	<i>M. ulcerans</i> (N)	<i>M. terrae</i> (N)	<i>M. xenopi</i> (N)
		<i>M. gastri</i> (N)	
Crescimento Rápido	<i>M. chelonae</i> (N)		
	<i>M. smegmatis</i> (S/P)	<i>M. fortuitum</i> (N)	<i>M. phlei</i> (S/P)
	<i>M. neoaurum</i> (S)	<i>M. aurum</i> (S)	<i>M. gadium</i> (S)
	<i>M. duvalii</i> (S)	<i>M. vaccae</i> (S)	<i>M. chitae</i> (S)
	<i>M. komossense</i> (S)	<i>M. flavescens</i> (S)	<i>M. gilvum</i> (S)
	<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. senegalense</i> (N)	<i>M. parafortuitum</i> (S)
Não cultiváveis	<i>M. leprae</i>		

Onde: N= não cromógeno; P= fotocromógeno; S= escotocromógeno.

O surgimento de técnicas de biologia molecular e de técnicas bioquímicas tornou a classificação de Runyon obsoleta para os laboratórios de micobacteriologia modernos, embora o esquema ainda seja eficiente na identificação presuntiva de espécies causadoras de doença em humanos (O'BRIEN et al, 1989).

Uma outra forma de classificação para as micobactérias oportunistas está baseada no tipo de doença clínica que produzem (Tabela 2) (WALLACE et al, 1990).

Tabela II: Classificação das espécies de micobactérias segundo a sua patogenicidade (WALLACE et al, 1990).

Doença clínica	Espécie etiológica comum	Crescimento	Propriedades morfológicas
Pulmonar	<i>M. avium</i>	Lento	Não pigmentada
	<i>M. kansasii</i>	Lento	Fotocromogênica
	<i>M. chelonae</i>	Rápido	Não pigmentada
	<i>M. xenopi</i>	Lento	Pigmentada
Linfadenite	<i>M. avium</i>	Lento	Não pigmentada
	<i>M. scrofulaceum</i>	Lento	Escotocromogênica
Cutânea	<i>M. mannum</i>	Rápido	Fotocromogênica
	<i>M. fortuitum</i>	Rápido	Não pigmentada
	<i>M. chelonae</i>	Rápido	Não pigmentada
	<i>M. ulcerans</i>	Lento	Escotocromogênica
Disseminada	<i>M. avium</i>	Lento	Pigmentada, quando isolada de pacientes HIV-positivo.
	<i>M. kansasii</i>	Lento	Fotocromogênica
	<i>M. chelonae</i>	Rápido	Não-pigmentada
	<i>M. haemophilum</i>	Lento	Não-pigmentada

3.3 Ecologia

As micobactérias atípicas são saprófitas de vida livre. Elas têm sido isoladas a partir de uma ampla variedade de ambientes, como solo, poeira, nas águas doces ou salobras. No solo podem ser encontradas em lamas, especialmente quando ricas em material orgânico. Nos ambientes aquáticos está presente na superfície dos lagos, estuários e córregos mais raramente em águas profundas. Também têm sido isoladas de águas cujas temperaturas são elevadas. (O'BRIEN, 1989; BRITTON, 1991; FALKINHAM III, 1996; GRANGE et al, 1996; KENNEDY et al, 2003).

Por terem características hidrofóbicas, as micobactérias se multiplicam formando um biofilme sobre a superfície dos ambientes líquidos. Isto favorece a imediata penetração destas bactérias nos aerossóis que são formados, quando estes líquidos sofrem qualquer tipo de agitação, constituindo-se como um importante mecanismo de transmissão para os humanos através da sua inalação. (FLAKINHAM III, 1996; GRANGE et al, 1996).

Estas bactérias permanecem nos sistemas de água potável, bem como nos sistemas de suprimento de água para os hospitais, permitindo desta forma infecções nosocomiais (FALKINHAM III, 1996).

3.4 Infecção

As doenças causadas pelas micobactérias atípicas não são comuns em pacientes imunocompetentes. Os imunocompetentes podem resistir à infecções por estes microrganismos, desde que não ocorra invasão de tecido. Mas têm assumido uma grande importância após o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). (O'BRIEN, 1989; BRUTUS et al, 2001; KENNEDY et al, 2003).

Com a ausência de evidência de transmissão de pessoa à pessoa, foi proposto que a infecção micobacteriana nos seres humanos era à partir de fontes ambientais. As principais vias de infecção destes microrganismos são a respiratória através da inalação de gotículas contaminadas. Oral através da ingestão de água e alimentos contaminados, geralmente leite, e inoculação direta através das mucosas ou pele (FALKINHAM III, 1996).

Antes da epidemia da AIDS, as doenças causadas pelas micobactérias atípicas eram pulmonares, confinada a linfonodos cervicais, limitadas à pele, ou, mais raramente disseminada. As lesões de pele normalmente estão associadas a traumas invasivos, porém a AIDS tem um papel importante na mudança na frequência e no tipo das doenças causadas pelas micobactérias atípicas, normalmente as infecções pelas micobactérias atípicas em pacientes soro-positivo mostram-se disseminadas. As infecções pulmonares não são cavitárias, geralmente complicam para uma fibrose pulmonar ou doença crônica obstrutiva. As infecções extrapulmonares são benignas, como a adenopatia cervical em crianças e lesões de pele (FALKINHAM III, 1996; KENNEDY et al, 2003).

A infecção pelas micobactérias atípicas em pacientes infectado pelo vírus da imunodeficiência adquirida tende a ocorrer nos estágios mais avançados da doença com uma relação mais estreita com a contagem de células CD4⁺, sem relação com idade, gênero ou raça (BRITTON, 1991; FALKINHAM III, 1996).

3.5 Tratamento e Resistência

As infecções provocadas pelas micobactérias atípicas são de difícil tratamento. Elas se apresentam resistentes aos agentes antituberculose de primeira-linha (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol, estreptomina) e a várias drogas de segunda-linha. Em contrapartida mostram-se sensíveis a vários grupos de antimicrobianos de amplo espectro (amicacina, ciprofloxacina, sulfonamidas e cefotaxima) (DALOVISIO et al, 1978; WALLACE, 1989; WALLACE et al, 1990; SEPKOWITZ et al, 1995).

A dificuldade no tratamento das infecções por micobactérias atípicas é atribuída à resistência intrínseca destas bactérias aos mais diversos agentes utilizados no tratamento das infecções micobacterianas. Além disso, são parasitas intracelular, os macrófagos servem como barreira para a ação da droga no ambiente intracelular. Esta resistência intrínseca das micobactérias atípicas aos antimicrobianos é atribuída à baixa permeabilidade da parede celular destas bactérias, o que leva ao surgimento de cepas multi-droga resistente, definida como a resistência a pelo menos a isoniazida e a rifampicina (FALKINHAN III, 1996; GUILLEMIN et al., 1998; RASTOGI et al, 1990 a e b; SILVA et al, 2001).

O desenvolvimento da resistência por parte das micobactérias ocorre, normalmente, durante o tratamento dos pacientes infectados. Estes pacientes podem eliminar o bacilo resistente tornando-se fonte de infecção (RASTOGI, 1993).

Os mecanismos pelos quais as micobactérias tornam-se resistentes são através de fatores genéticos como plasmídios ou mutações pontuais no sítio da ação do antibiótico, alterando o sítio de ação do antibiótico e inativando o mesmo, a exemplo do que acontece com as quinolonas, isoniazida, estreptomina, claritromicina. Ou ainda pela adaptação às drogas adquirida por uma exposição contínua. Estas bactérias apresentam uma velocidade de crescimento lento, são capazes de sintetizar compostos que antagonizam o antibiótico (RASTOGI et al., 1990a; FALKINHAM III, 1996).

A resistência das micobactérias atípicas a desinfecção contribui para que elas colonizem sistemas de distribuição de água. Além disso, também são relativamente resistentes a metais pesados e oxianions, bem como ao mercúrio, a prata e ao telúrio. (FALKINHAM III, 1996).

Outra forma importante de resistência é através da exclusão ativa do antibiótico através das bombas de exclusão. A energia necessária para este transporte é gerada pela força motriz dos prótons ou pela hidrólise do ATP. (POOLE, 2000; SANDER et al, 2000; SILVA et al, 2001).

Estas bombas diminuem a concentração da droga dentro do citoplasma celular, prejudicando a atividade das mesmas (BANERJEE et al., 1996).

As bombas de efluxo são genericamente classificadas em cinco superfamílias, baseado na homologia da seqüência de aminoácidos. São elas:

1. A principal superfamília facilitadora (MFS);
2. A família cassete ligada a ATP;
3. A família resistência-nodulação-divisão (RND);
4. A família de pequenas proteínas multi-droga resistência;
5. A família de exclusão de multi-droga e compostos tóxicos (MATE).

A primeira bomba de exclusão descrita em micobactérias foi a LfrA, presente no *M. smegmatis*. A LfrA pertence à família das MFS, que gera energia através da força motriz dos prótons e apresenta um importante papel na resistência das micobactérias ao brometo de etídio e as fluorquinolonas hidrofílicas (POOLE, 2000; SANDER et al, 2000).

Outro tipo de bomba encontrada na membrana das micobactérias é a P55, pertencente a mesma família da LfrA (MFS) e exerce um papel importante na resistência por exclusão as tetraciclina e aminoglicosídeos (SILVA et al, 2001).

3.6 Parede Celular

O envelope celular das micobactérias mostra-se singular quando comparada as demais bactérias, devido a sua alta hidrofobicidade por conter altas concentrações de lipídios. Esta alta concentração de lipídios a transforma em uma barreira natural contra danos químicos, desidratação, e a passagem de agentes antimicrobianos (DAVID et al, 1987; RASTOGI et al, 1994b; BARRY III, 2001).

Apesar da sua característica hidrofóbica o fluxo de substratos hidrofílicos do meio intra e extracelular ocorre através de poros encontrados principalmente nas paredes celulares das micobactérias de crescimento rápido (*M. chelonae* e *M. smegmatis*) (KARTMANN et al, 1999).

O peptidoglicano encontra-se ligado covalentemente ao arabinogalactano (um heteropolissacarídeo) esterificado a ácidos graxos de alto peso molecular, os ácidos micólicos (Figura 1). Estes ácidos são responsáveis pela hidrofobicidade da parede celular e têm um papel importante na baixa permeabilidade das micobactérias a moléculas hidrofílicas (WHEELER et al, 1993; MIKUSOVA et al, 1995; BRENNAN, 2003).

O esqueleto da parede celular das micobactérias é formado pelo: peptidoglicano-arabinogalactano-ácidos micólicos e associados a este esqueleto há uma enorme variedade de lipídios e glicolipídios. A rigidez desta estrutura é atribuída à ligação covalente entre o peptidoglicano e o arabinogalactano. (DAVID et al, 1987; BRENNAN, 2003).

A membrana celular é semelhante às outras, mas contém compostos peculiares como lipoarabinomananas e lipomananas e o fosfatidilinositol manosídeo (BRENNAN et al, 2003).

O peptidoglicano consiste em unidades alternadas de N-acetilglicosamina e ácido murâmico. Este é o tipo de peptidoglicano mais comumente encontrado nas bactérias. Porém o peptidoglicano das micobactérias diferem das outras bactérias por conter o ácido murâmico acetilado pelo ácido glicólico (BRENNAN, 2003).

O arabinogalactano se encontra ligado ao peptidoglicano e aos ácidos micólicos e é um polímero composto por resíduos de D-arabinose e D-galactose (Mc NEIL et al, 1990).

Os principais lipídios livres encontrados na parede celular são: dimicocerosato, dimicolato de trealose ou fator corda e os sulfolipídios, que desempenham um papel importante na patogênese e na resposta imune contra as micobacterioses (BRENNAN, 2003).

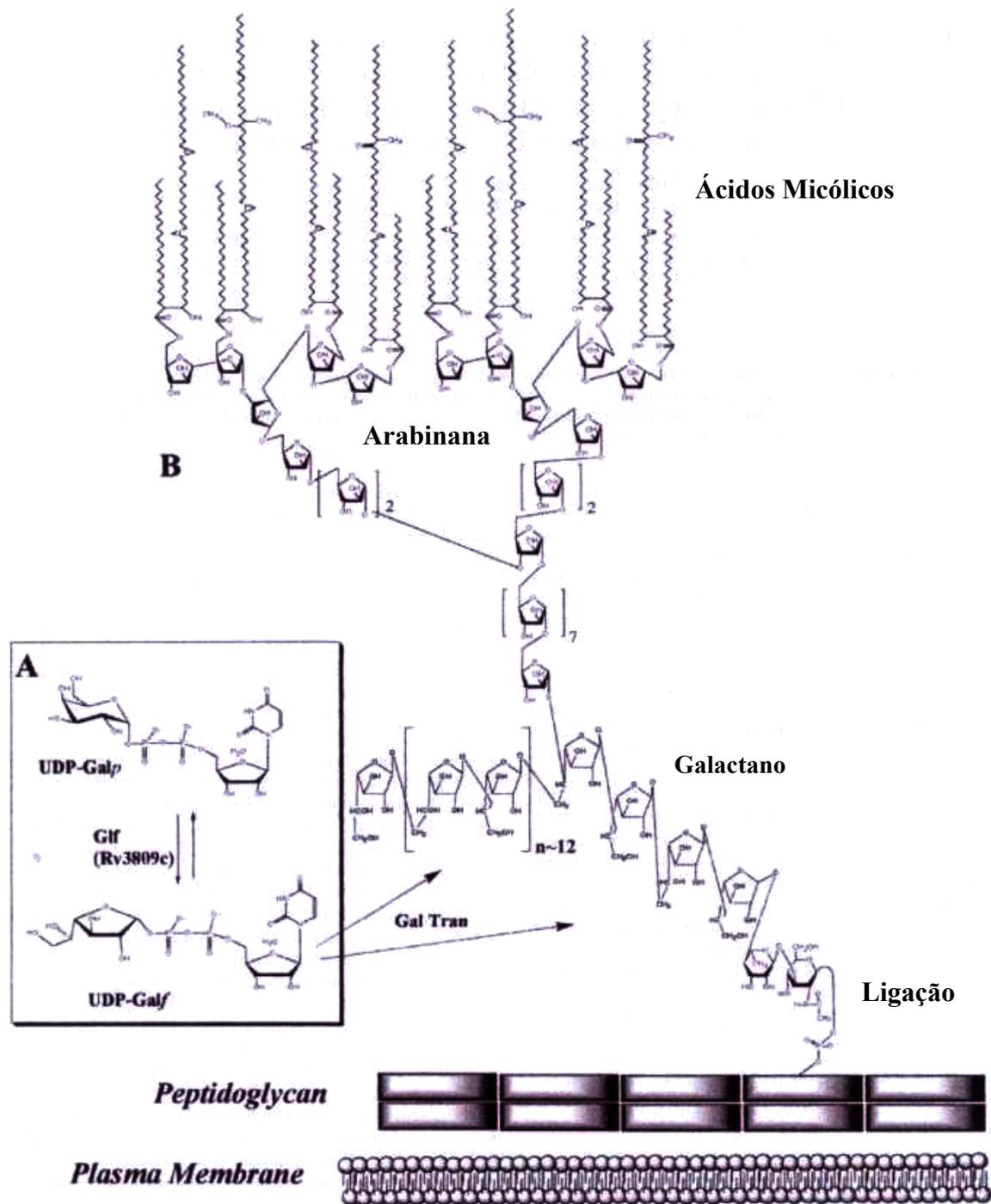


Figura. 1: Esquema da parede celular das micobactérias. (A) Conversão do UDP-galactopiranosose a UDP-galactofuranose catalizada pela UDP-galactopiranosose mutase. (B) Estrutura do arabinogalactano do *M. tuberculosis* demonstrando a estrutura chave dos resíduos de galactofurano. (SCHERMAN et al., 2003)

O fator corda apresenta características imunogênicas, granulomogênico e é um adjuvante ativo. No hospedeiro estimula a atividade da NADase, levando a níveis baixos de NAD e reduz a atividade de enzimas microssomais NAD-dependente. Atua diretamente na membrana mitocondrial perturbando o fluxo de elétrons, ao longo da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa. Os sulfolípidios estão associados à virulência das cepas, além de desempenhar um papel importante na sobrevivência da bactéria no fagossomo inibindo a fusão do fagossomo com os lisossomos. Os Dimicocerosatos são ceras altamente apolares, com 35 átomos de carbono e com grupos metil ou metileno. Apresentam 2 grupos reativos hidroxil que se encontram esterificados a dois ácidos graxos.

Outro grupo de lipídios livres estruturalmente relacionados são os Fosfatidilinositol manosídeo (PIM); Lipoarabinomananas (LAM) e Lipomananas (LM). Os LAM são lipopolissacarídeos encontrados em todas as micobactérias, que se encontram ancoradas à membrana celular, exercendo um papel importante modulando a resposta imune do hospedeiro (McNeil et al., 1990; BESRA et al, 1994; BRENNAN, 2003).

3.6.1 Ácidos Micólicos

Os ácidos micólicos são, quantitativamente, o principal componente da parede celular das micobactérias. Sua importância na fisiologia micobacteriana é explicada pelo fato de que várias drogas efetivas antituberculose interferem tanto na sua biossíntese (isoniazida e etionamida), quanto no seu sítio de ligação à parede celular (etambutol). Podem existir na parede celular de duas formas: ligado covalentemente ao peptidoglicano através do arabinogalactano ou fracamente associado a uma matriz insolúvel esterificado a uma variedade de moléculas que contêm carboidratos (glicolípídios) (Mc NEIL et al, 1990; BARRY et al., 1998; SALMAN et al, 1999).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos de alto peso molecular com uma β -hidroxila e um α -radical, cuja cadeia principal contém aproximadamente 50 a 60 carbonos, unidos ou não a duplas ligações, grupos cetona, grupos metil e/ou anéis ciclopropanil. O α -radical é uma cadeia de hidrocarboneto saturada com 24 átomos de carbono (Mc NEIL et al, 1990; SALMAN et al, 1999; SCHROEDER et al, 2001).

Os ácidos micólicos apresentam diferentes grupos funcionais, polar ou apolar, que substituem em dois pontos na cadeia meromicolato.

De acordo com estes substituintes os α -ácidos, que apresentam na sua cadeia meromicolato, apenas uma insaturação e/ou uma ciclopropanação, podem ser classificadas

em: α -micolatos; metoximicolato; cetomicolato, epoximicolato e em ceras. Os α -micolatos não apresentam oxigênio extra além do existente na β -hidroxila. Os metoximicolatos apresentam em sua cadeia meromicolato próximo ao radical metil um radical metoxi associado a uma insaturação ou uma ciclopropanação. Os Cetomicolatos são ácidos micólicos oxigenados que apresentam um grupamento cetona próximo ao radical metil, associado a uma insaturação ou uma ciclopropanação. Os epoximicolatos são outra forma de ácido micólico oxigenado, que apresentam um epóxi próximo ao radical metil, associado a uma insaturação ou uma ciclopropanação, enquanto as ceras são ácidos micólicos que contêm uma insaturação ou uma ciclopropanação e um grupo éster (figura 2) (BARRY III et al, 1998).

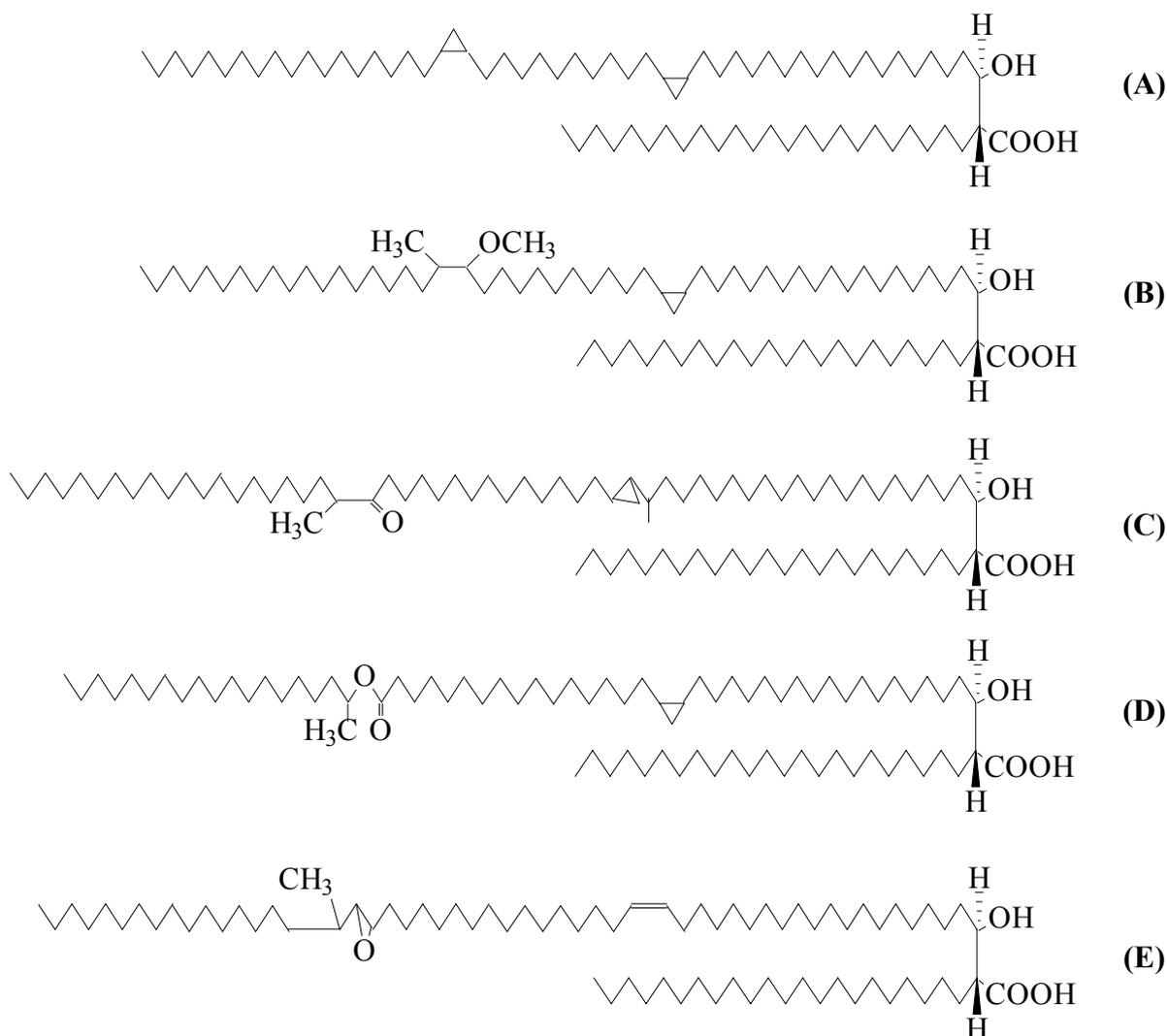


Figura. 2: Diferentes moléculas de ácidos micólicos encontradas entre as micobactérias. (A) ácido micólico α ; (B) metoximicolato; (C) cetomicolato; (D) cera éster; (E) epoximicolato.

(BARRY et al., 1998; BASSO et al, 2002)

A síntese dos ácidos graxos ocorre através de ciclos repetitivos de condensação, β -ceto redução, desidratação e enoil redução, os quais são catalisados, respectivamente, pela β -cetoacil sintetase (KAS), β -cetoacil redutase (KAR), β -hidroxiacil desidrogenase (DE) e enoil-redutase (ENR). Esta síntese envolve dois tipos de complexo enzimático, FAS I e FAS II (BARRY III et al., 1998; SALMAN et al, 1999; BASSO et al, 2002).

O FAS I é um homólogo muito semelhante ao complexo sintetase dos ácidos graxos em mamíferos, não é encontrado em nenhuma outra bactéria. Catalisa a síntese da cadeia do ácido graxo é capaz de alongá-la até formar um ácido graxo de cadeia longa de 26 átomos de carbono. Além disto este complexo mostrou-se capaz de sintetizar *de novo* os ácidos graxos a partir de acetato (BARRY III et al, 1998; SALMAN et al, 1999; BASSO et al, 2002).

O FAS II é um sistema multicomponente dependente do acil carreador de proteína ou coenzima A (ACP) responsável pelo alongamento do ACP-palmitoil em um ácido graxo de cadeia longa, variando de 24 a 56 átomos de carbono (BARRY III et al, 1998; SALMAN et al, 1999; BASSO et al, 2002).

Alguns ácidos micólicos livres encontram-se associados as glicoproteínas formando os glicolipídios (GL) ou micosídio. Acumulam-se ao redor das micobactérias durante o crescimento dentro dos macrófagos, apresentam propriedades imunomodulatórias, desempenhando um papel importante na patogenicidade, além de contribuir para a resistência à drogas. Dentre os lipídios das micobactérias os GL são espécies-específicas e tipificam várias micobactérias atípicas. Os GLs são divididos em três grupos: os fenolglicolipídios; micosídio C glicolipopeptídios (GLP); e acil-oligossacarídeos contendo trealose. As glicolipoproteínas (GLP) podem ser divididas em dois subgrupos: as GLPs tipo-C e as GLPs que contem serina. As GLPs tipo-C têm sido encontradas em micobactérias saprófitas (*M. smegmatis*) e nas micobactérias oportunistas (*M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*), enquanto as GLP que contem serina são encontradas em grande quantidade apenas no *M. xenopi* (CHAMPHAUSEN et al., 1987; ETIENNE et al 2002).

As GLPs apresentam um centro lipoprotéico comum, constituído de um ácido graxo com 26-34 átomos de carbonos, ligado peptidicamente ao tripeptídeo D-fenilalanina-D-allo-treonina-D-alanina e terminado pelo alaninol. As alterações ocorrem apenas no número e natureza dos radicais sacarídicos que se ligam à hidroxila do *allo*-treonina e/ou alaninol (Figura 3) (ETIENNE et al., 2002).

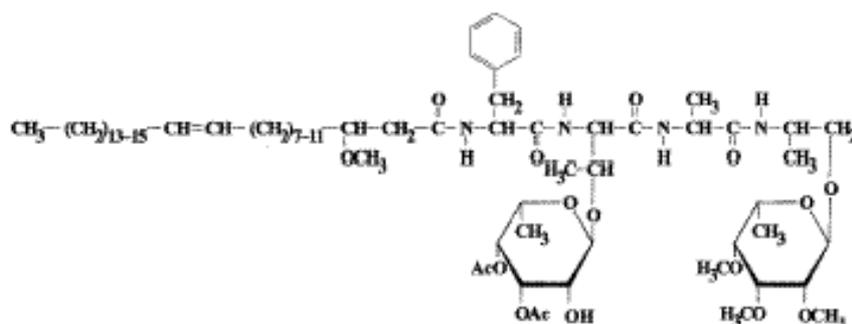


Figura 3: Estrutura das GLPs tipo-C ou micosídio C. (ETIENNE et al, 2002).

4.0 Estudo das Drogas

4.1 Generalidades

Desde o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida na década de 1980, a epidemiologia das infecções causadas por micobactérias atípicas mudou drasticamente. (RODRÍGUEZ et al, 2001; LAWN et al, 2002)

O aparecimento das micobactérias atípicas, bem como o ressurgimento da tuberculose acompanhada de cepas multi-droga resistente, tornam ineficaz o tratamento destas infecções pelas drogas antimicobacterianas de primeira-linha, tais como isoniazida, etambutol, rifampicina, estreptomina e pirazinamida. (MACCARI et al, 2002)

O tratamento das infecções causadas por micobactérias em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana tem chamado a atenção, pois, a terapia antimicobacteriose e antiviral apresenta uma importante interação farmacológica no sistema microsomal hepático e na parede intestinal, podendo provocar redução significativa dos níveis séricos desses anti-retrovirais e, conseqüentemente, aumentar o risco de desenvolvimento de resistência do HIV ao esquema anti-retroviral em uso. Além disso, o tratamento antimicobacteriano pode ser eficiente principalmente pela coinfeção de micobactérias de espécies diferentes ou de mais de uma cepa da mesma espécie. (FALKINHAN III et al, 1996).

As micobactérias atípicas são resistentes aos quimioterápicos de primeira linha para o tratamento da tuberculose, mostrando-se sensíveis a amicacina e canamicina, além de outras drogas de segunda linha, tais como as fluorquinolonas, claritromicina, azitromicina, cicloserina, capreomicina, etionamida, ácido paraminiosalicílico, tiacetazole, rifabutina e clofazime. Os quimioterápicos de segunda-linha são utilizados apenas em áreas de alta

incidência de resistência (JOHNSON & ROBERTS, 1987; WALLACE, 1989; WALLACE et al., 1990; SEPKOWITZ et al, 1995; KOLETAR, 1997).

Para reverter a resistência destes microrganismos, foi criada uma estratégia para aumentar a sensibilidade às drogas usuais através da síntese de novos fármacos ou modificações através das existentes. Uma ação efetiva para potencializar a ação das drogas seria a inibição da síntese de constituintes de sua parede celular. O derivado *m*-fluorfenilalanina foi utilizado por Rastogi como inibidor da síntese dos micosídeos e observado uma potencialização na atividade de quimioterápicos de classes variadas como rifampicina e amicacina contra as micobactérias atípicas (RASTOGI et al, 1988; 1990a; 1994a; 1998).

4.2 Fluorquinolonas

As fluorquinolonas são drogas de amplo espectro, desenvolvidas na década de oitenta. São moléculas ativas contra Gram-positivas, Gram-negativas e várias micobactérias. Elas atuam inibindo a enzima DNA-girase, responsável pelo superenrolamento negativo do DNA no interior da célula. O DNA passa a ocupar um espaço maior no interior da célula e as extremidades livres deste DNA induz a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, a produção de exonucleases e a degradação cromossomal. Explicando assim o seu poder bactericida. (WOLFSON & HOOPER, 1985; MICHEL-BRIAND, 1986; WILLIAMS et al, 1998)

Além de atuar na replicação do DNA a DNA-girase também atuam em certos aspectos da replicação, reparo do DNA, recombinação e transposição (WOLFSON & HOOPER, 1985).

A resistência as fluorquinolonas é adquirida através de dois mecanismos: pela mutação no gen *gyrA* que codifica a subunidade A da DNA-girase, ou pela exclusão citoplasmática de droga através de bombas de exclusão (WILLIAMS et al, 1998).

As flúorquinolonas são indicadas como droga de primeira linha para o tratamento de infecções causadas por micobactérias atípicas como o *M. fortuitum*, porém para o *M. tuberculosis* são utilizadas em associação (GUILLEMIN et al, 1998).

Quimicamente as fluorquinolonas caracterizam-se pela presença de um átomo de flúor ligado à posição 6, o que confere uma ampliação na atividade antimicrobiana, e por um anel piperazínico contendo átomo de nitrogênio na posição 7 da molécula. A primeira molécula a ser sintetizada foi a flumequina, foi a primeira representante de uma nova geração

de quinolonas com amplo espectro de ação, conhecidas como as novas quinolonas ou as quinolonas de segunda geração (WOLFSON & HOOPER, 1985).

As quinolonas de segunda geração, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, enofloxacin e perfloxacin apresentam uma meia-vida longa, permitindo dosagens duas vezes diárias. Quando administradas por via oral são bem absorvidas pelo trato gastrointestinal (TGI), são excretadas principalmente pela urina e uma pequena porção pelas fezes. Têm uma boa distribuição pelos tecidos e penetração nas células humanas conferindo uma atividade contra patógenos intracelulares. Apresentam um espectro de ação mais amplo que os de primeira geração (MANDEL & PETRI, 1996; ALANGARDEN, et al, 1997).

4.2.1 Ofloxacino

A ofloxacino (figura 4) faz parte do grupo das 4-quinolonas fluoradas. Este grupo apresenta poucos efeitos colaterais e não induzem rapidamente o aparecimento de resistência microbiana a sua ação (MANDEL & PETRI, 1996).

Esta droga apresenta uma boa atividade contra a *M. tuberculosis* e contra micobactérias atípicas (WOLFSON & HOOPER, 1985).

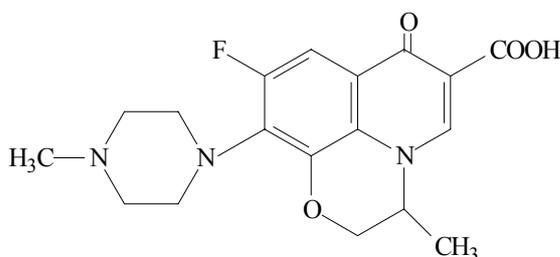


Figura 4.: Molécula da ofloxacino

A ofloxacino possui um oxigênio substituído em C-8 formando um anel entre esta posição e a posição N-1, conferindo excelente atividade antimicrobiana. Também possui um anel oxazínico que confere excelente absorção oral, com 95% de biodisponibilidade, evitando sua metabolização e garantindo uma meia-vida mais longa (CARVALHO, 1998).

4.3 *m*-Flúor-Fenilalanina

O derivado do aminoácido fenilalanina, o *m*-flúor-fenilalanina (figura 5) tem a capacidade de inibir a biossíntese do micosídio C, desorganizando a parede celular da micobactéria, atuando nos micosídios C que são anfipáticas responsáveis pela integridade estrutural da membrana externa. O efeito inibitório do *m*-flúor-fenilalanina sobre o micosídio C não é letal para a célula microbiana (RASTOGI et al, 1990a; 1995).

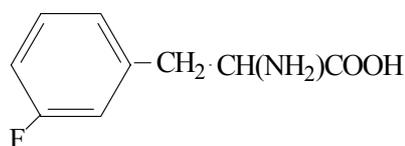


Figura 5.: Molécula da *m*-flúor-fenilalanina

O micosídio C é um glicolipopeptídeo cujo centro peptídico contém aminoácidos incomuns como a D-fenilalanina, a D-*allo*-treonina e D-alanina. A inibição de sua síntese através de inibidores específicos resulta no aumento da permeabilidade de várias drogas e conseqüentemente nas suas atividades (DAVID et al, 1988; RASTOGI, et al, 1990b; 1994a).

O *m*-flúor-fenilalanina inibe mais que 80% da incorporação do L- e D-alanina, L-fenilalanina e L-treonina no micosídio C da micobactéria. Ele foi testado como um inibidor hipotético da transformação da D-fenilalanina a partir da L-fenilalanina. O *m*-flúor-fenilalanina não só impede a incorporação da L-fenilalanina, mas também a incorporação da L-treonina, e L e D-alanina. Esta inibição múltipla sugere que por impedir a incorporação da L-fenilalanina, o inibidor interrompe a adição dos outros aminoácidos como efeito secundário (figura 6) (DAVID et al, 1988).

DAVID et al (1988) concluiu que o efeito do *m*-flúor-fenilalanina sobre a biossíntese dos glicolipopeptídios (GLP) não é letal para a bactéria, mas é suficiente para desorganizar a parede celular potencializando a ação dos agentes antimicobacterianos.

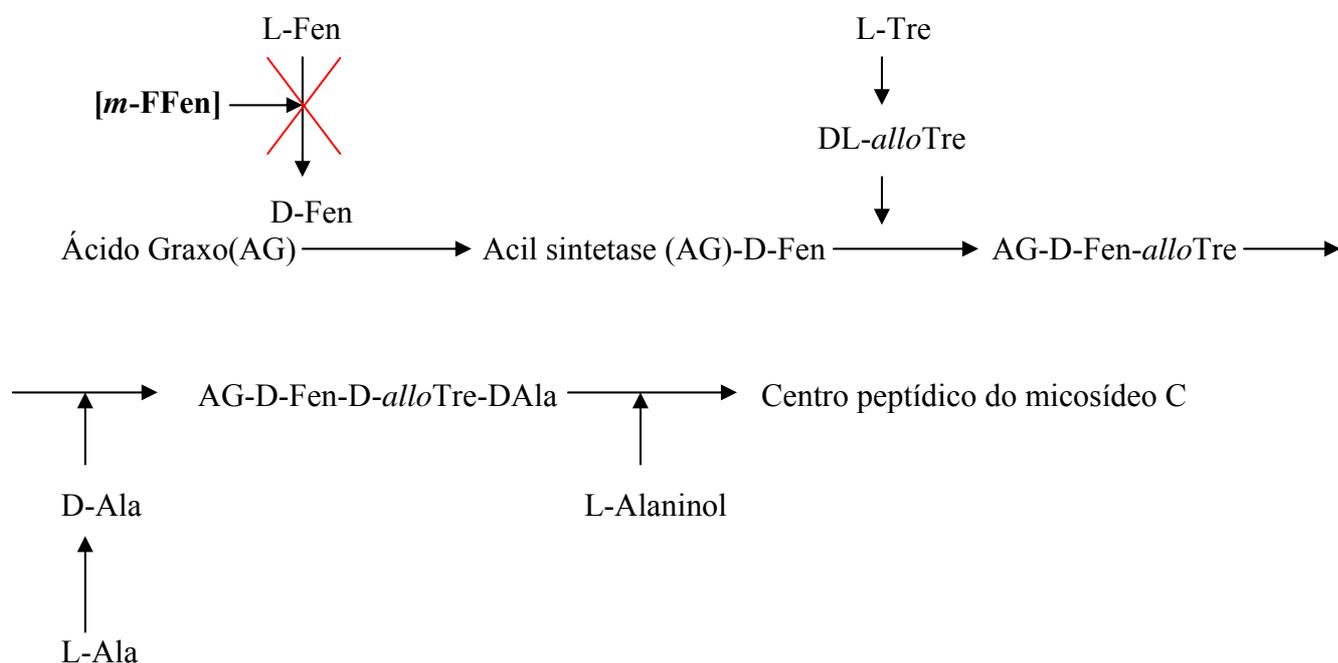


Figura 6.: Esquema da biossíntese do micosídeo C e mecanismo de ação do *m*-FFen (DAVID et al, 1988).

4.4 1,2,4-Oxadiazóis

Os oxadiazóis são compostos heterocíclicos formados por cinco átomos contendo um oxigênio e dois átomos de nitrogênio (figura 7).

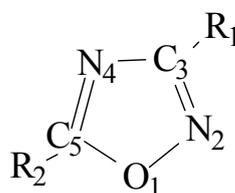


Figura 7: 1, 2 ,4-oxadiazóis

Os oxadiazóis são considerados como um núcleo furano no qual dois CH foram trocados por átomos de nitrogênio e, portanto são sempre considerados como furadiazóis ou furodiazóis (ELOY, 1965).

São comumente sintetizados a partir de amidoximas e de ácidos carboxílicos clorados ou anidrados (LEITE et al., 2000).

Os oxadiazóis de baixo peso molecular são líquidos voláteis. A propriedade mais notável dos oxadiazóis reportada pelos autores que descobriram esta classe de composto é o fato de permanecerem inertes contra o calor e agentes químicos (ELOY, 1965).

Desde 1960 os oxadiazóis têm demonstrado sua eficácia na terapêutica como agentes anti tussígenos, vasodilatador coronariano e anestésico local. Com a síntese de novas moléculas descobriu-se a versatilidade farmacológica dos derivados oxadiazólicos como antiespasmótico, antiinflamatório, anticonvulsivantes, anestésico e antimicrobiano, mostrando-se ativa contra micobactérias. Sua atividade esta diretamente relacionada aos 3,5 substituintes (ELOY, 1965; CLAPP et al., 1976; LEITE et al., 2000).

Quando os substituintes 3 e 5 são um radical aromático e um grupo alquil, esta molécula se torna lipossolúvel. Esta lipossolubilidade é importante tanto na ação analgésica, pois permite que a droga atravesse a barreira hematoencefálica, quanto na sua atividade antimicobacteriana, por que facilita a penetração da droga através da parede celular rica em lipídios (SRIVASTAVA et al., 2003).

4.4.1 [3-(p-Hidroxi-Fenil)1,2,4-Oxadiazol-5-il] Acil Hidrazina (HHBA)

O HHBA é uma hidrazida (figura 8) obtida como um intermediário de síntese na dissertação de mestrado do aluno José Maurício dos Santos Filho, no Laboratório de Planejamento e Síntese Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, mostrando-se ativa contra as micobactérias, com CMI de 25 e 50µg/mL para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, respectivamente (SANTOS FILHO, 2002; VICENTE, 2003).

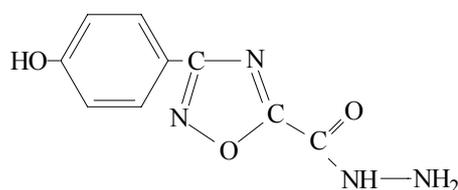


Figura 8: Estrutura química do 3-(p-Hidroxi-Fenil)1,2,4-Oxadiazol-5-il] Acil Hidrazina

A molécula do HHBA apresenta dois grupos farmacofóricos, o anel 1,2,4-oxadiazol e o radical hidrazínico. O radical hidrazínico a torna uma molécula análoga a isoniazida (figura 9), e como tal age inibindo a síntese dos ácidos graxos, promovendo uma ligação covalente

entre ACP (acil carreador de proteína ou coenzima A) e a enzima β -cetoacil ACP sintetase (*kasA*) integrantes do sistema FAS II de biossíntese dos ácidos graxos (SANDY et al., 2002).

A resistência a esta classe de quimioterápicos é devido a inibição da penetração da isoniazida através da parede celular, raramente pela degradação da isoniazida a ácido isonicotínico por uma hidrazidase. Também associado à resistência estão as bombas de efluxo de duas classes distintas, a bomba ATP dependente e a bomba dependente do fluxo de prótons (MICHEL-BRIAND, 1986; CHOUDHURI et al., 1999).

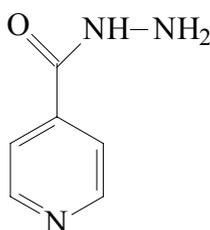


Figura 9.: Estrutura química da Isoniazida

Os derivados hidrazínicos lipofílicos, como o HHBA, apresentam-se mais ativos que a molécula hidrofílica da isoniazida frente as micobactérias atípicas. Tendo em vista que estes análogos têm uma maior facilidade de interagir com os lipídios presentes na parede celular das micobactérias (RASTOGI et al., 1988).

Tendo em vista a atual dificuldade para a determinação de um esquema terapêutico eficaz para o tratamento das infecções provocadas pelas micobactérias atípicas, foi avaliado o efeito pós-antibiótico do HHBA, bem como de suas associações com a ofloxacino e o análogo do aminoácido fenilalanina, o *m*-flúor-fenilalanina, frente ao *Mycobacterium fortuitum* e ao *Mycobacterium smegmatis* no sentido de no futuro, idealizar um esquema terapêutico alternativo eficiente para o tratamento das infecções provocadas por estes microrganismos.

5.0 PARTE EXPERIMENTAL

Determinação *in vitro* do Efeito Pós-Antibiótico

5.1 Material

5.1.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizados os microrganismos *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, pertencentes ao laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, isolados a partir de sangue de pacientes internos no Hospital das Clínicas da UFPE soro positivos para o vírus da imunodeficiência adquirida.

5.1.2 Meios de Cultura

O meio de Lowenstein-Jensen (BioMerieux) foi utilizado para a manutenção dos microrganismos. Os meios de Mueller-Hinton (líquido e sólido) foram utilizados durante o experimento na preparação dos inóculos e durante a enumeração das Unidades Formadoras de Colônias. Ao meio líquido de Mueller-Hinton foi adicionado Tween 80, de modo a obter uma concentração final de 0,1% (v/v), cujo objetivo foi promover o crescimento homogêneo da cultura bacteriana.

5.1.3 Drogas

- [3-(*p*-hidroxi-fenil)1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazina título 100% -Laboratório de Planejamento e Síntese Fármacos do Departamento de Antibióticos, U.F.PE. - Brasil;
- *m*-DL-flúor-fenilalanina título 97%, Laboratório Sigma - Suíça.;
- Ofloxacino título 98,8%, Laboratório Bayer - França.

As drogas foram pesadas em balança analítica. Ofloxacino foi dissolvido em etilenoglicol, o *m*-flúor-fenilalanina em água, enquanto que [3-(*p*-hidroxi-fenil) 1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazina foi dissolvido em um sistema formado por água, DMSO, Tween 80 na proporção de 8:1:1, respectivamente

A ofloxacina, o *m*-DL-flúor-fenilalanina e a [3-(*p*-hidroxi-fenil)1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazina foram testadas em concentrações correspondentes as suas Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI), previamente determinadas (VICENTE, 2003) e descritas na tabela III. As soluções de droga correspondentes as duplas e triplas associações foram preparadas de modo a obter concentrações equivalentes as suas CMIs.

Tabela III: Concentração Mínima Inibitória do HHBA, da ofloxacina e do *m*-fluor-fenilalanina, para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis* (VICENTE, 2003)

Microrganismos	HHBA	Ofloxacina
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>M. fortuitum</i>	25	1
<i>M. smegmatis</i>	50	1

5.2 Métodos

5.2.1 Princípio

Os microrganismos foram colocados em contato com as drogas durante os tempos de 2 e 4 horas. Em seguida, as drogas foram eliminadas e o recrescimento bacteriano foi observado através do plaqueamento da população sobrevivente, sempre comparando à população controle a qual não foi submetida à ação das drogas (CRAIG & GUDMUNDSSON, 1996; CHIN et al., 1987; MINGUEZ et al., 1991).

Dentre os métodos existentes para o estudo *in vitro* do EPA todos eles são compostos das seguintes etapas: preparação do inóculo bacteriano, contato do microorganismo com a droga, eliminação da atividade antimicrobiana e avaliação do recrescimento bacteriano (CRAIG & GUDMUNDSSON, 1996) (figura 10).

5.2.2 Protocolo Experimental (Fig. 10)

Preparação dos Inóculos

A partir de uma cultura da micobactéria em meio de Lowenstein-Jensen, foi efetuada uma pré-cultura em meio líquido de Mueller-Hinton acrescido de 0,1% (v/v) de Tween 80. Essa cultura foi incubada à temperatura de 37°C, durante 72 horas.

Após esse período, a cultura foi diluída em meio líquido de Mueller-Hinton, na proporção de 10% (v/v) obtendo-se assim, uma turbidez comparável ao tubo nº 0,5 da escala de MacFarland, equivalente a uma concentração de 10^7 Unidades Formadoras de Colônia por mililitros (UFC/mL).

Enumeração Inicial das Bactérias

A enumeração das UFC/mL foi efetuada no início do experimento (T_0) a partir da cultura controle. Uma alíquota de 0,5 mL foi coletada e diluída de 10^{-1} a 10^{-6} em tubos contendo 4,5 mL de água destilada esterilizada.

Na superfície do ágar de Mueller-Hinton, foram depositadas cinco alíquotas de 10 μ L a partir de cada uma das diluições. As placas foram incubadas a 37°C, durante 72 horas.

Contato Microrganismo-Droga

O inóculo padronizado em aproximadamente 10^7 UFC/mL foi repartido numa série de tubos contendo as drogas (0,5 mL das soluções da drogas e 4,5 mL da suspensão bacteriana padronizada).

Este contato foi realizado pela incubação em estufa bacteriológica a 37°C durante 2 e 4 horas. Uma enumeração das UFC/mL foi realizada logo após o tempo de contato.

Eliminação da Droga

A droga foi eliminada por uma diluição ao centésimo (1:100) em novo meio líquido de Mueller-Hinton. Essa diluição foi escolhida pelo fato de poder conservar um número de microrganismos suficientes para permitir um crescimento secundário, além de levar a concentração das drogas a níveis subinibitórios que não interferirão no crescimento bacteriano. Após a eliminação, foi realizada uma enumeração das UFC/mL.

Cultura Controle

Essa cultura também foi diluída sob as mesmas condições. Foi indispensável à inclusão de tubos controle suplementares contendo a cultura e a droga estudada nas proporções equivalentes a 1/100 da sua concentração inicial. Esses tubos foram incluídos para

assegurar que a concentração residual da droga, após a diluição, não interferiu na velocidade de recrescimento dos microrganismos sobreviventes. Devido ao fato de não ser solúvel em água, e para assegurar que não houve uma atividade intrínseca deste sistema sobre os microrganismos foi preparado um tubo controle contendo este sistema na mesma concentração.

Avaliação do Recrescimento Bacteriano

O recrescimento bacteriano foi avaliado através da enumeração das UFC/mL efetuada em intervalos regulares de 24, 48, 72, 96 e 120h, após a diluição.

5.3 Critérios de Interpretação

Os valores obtidos permitiram traçar em função do tempo as curvas que representam de um lado, o efeito bactericida observado durante o tempo de contato do microrganismo com o antibiótico e do outro lado, as curvas que representam a retomada do crescimento deste microrganismo, após a diluição das culturas teste e das culturas controle.

Para cada droga e associações foram traçadas curvas representativas do número de bactérias viáveis, representadas pelo logaritmo decimal das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (\log_{10} UFC/mL), em função do tempo, representado em horas.

O EPA é expresso pela seguinte fórmula matemática (CRAIG & GUDMUNDSSON, 1996):

$$\text{EPA} = T - C$$

T representa o tempo necessário para que a cultura teste cresça de 1 \log_{10} , em relação à enumeração efetuada logo após a diluição;

C representa o tempo necessário para que a cultura controle cresça de 1 \log_{10} , em relação à enumeração efetuada logo após a diluição.

De acordo com CRAIG & GUDMUNDSSON (1996) um EPA é considerado sinérgico quando o resultado obtido excede, no mínimo uma hora, à soma dos valores dos EPAs individuais e, antagônico, quando esse valor é menor do que essa soma. O EPA aditivo representa a soma dos valores dos EPA individuais. O EPA indiferente é representado quando apenas uma das drogas é capaz de induzir esse efeito.

Os experimentos foram realizado em duplicata, em dias consecutivos. Desse modo, os resultados apresentaram a média aritmética das manipulações.

Cálculos estatísticos foram realizados para descrição do comportamento individual das variáveis em estudo (médias e desvios padrões) e para a comparação entre as médias de amostras independentes, utilizando-se o teste t de Student, cujo nível de significância foi de $p \leq 0,05$.

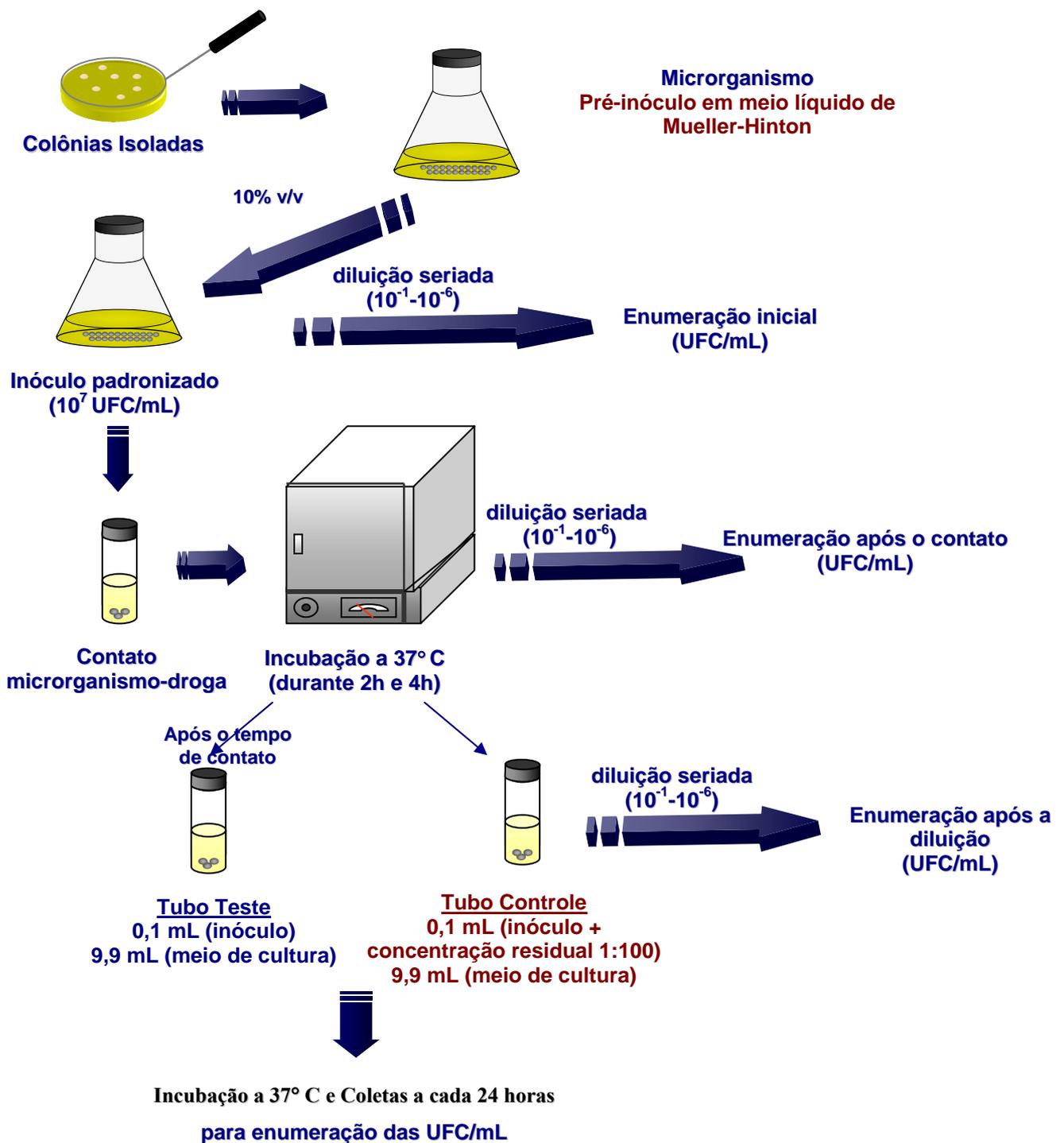


Figura 10: Esquema da determinação *in vitro* do efeito pós-antibiótico (SOUSA, 2001).

5.4 RESULTADOS

Mycobacterium fortuitum

5.4.1 Valores de EPA e Influência do Tempo de Contato

Os valores dos efeitos bactericidas e dos EPAs sobre o *Mycobacterium fortuitum* após 2 e 4 horas de contato estão apresentados na tabela IV e nas figuras de 11 a 17 (anexo 1).

Tabela IV: Influência dos tempos de contato de 2 e 4 horas sobre o efeito bactericida e os valores de EPA do HHBA, ofloxacino e *m*-fluor-fenilalanina e de suas associações sobre o *Mycobacterium fortuitum*

	EFEITO BACTERICIDA ^a		EPA ^b	
	2h	4h	2h	4h
Contato	x± dp	x± dp	x± dp	x± dp
OFLO	1,18±0,16	1,24±0,11	7,8±1,1	12,3±1,2
HHBA	0,85±0,10	0,95±0,13	1,4±0,8	4,2±1,5
OFLO+HHBA	1,00±0,14	1,22±0,11	3,2±0,9	4,8±2,3
OFLO+ <i>m</i> -FFen	1,20±0,13	1,35±0,13	4,5±1,1	10,8±1,5
HHBA+ <i>m</i> -FFen	0,81±0,07	0,92±0,05	1,6±0,6	1,7±0,9
OFLO+HHBA+ <i>m</i> -FFen	1,06±0,09	1,00±0,09	2,8±1,2	3,9±1,1

a=log₁₀ UFC; b= Horas; X± dp= média ± desvio padrão

Efeito Bactericida

No que concerne às drogas testadas, a ofloxacino (OFLO) e o HHBA apresentaram as maiores reduções do número de microrganismos, quando comparadas a *m*-flúor-fenilalanina (*m*-FFen). A OFLO ocasionou uma diminuição de $1,18 \pm 0,16 \log_{10}$ UFC/mL e $1,24 \pm 0,11 \log_{10}$, UFC/mL enquanto que o HHBA foi de $0,85 \pm 0,10 \log_{10}$ UFC/mL e $0,95 \pm 0,13 \log_{10}$, UFC/mL após um contato de 2h e 4h, respectivamente. Por outro lado, após 2h e 4h de contato, a *m*-FFen apresentou uma mesma redução de $0,71 \pm 0,03 \log_{10}$ UFC/mL e $0,83 \pm 0,09 \log_{10}$, UFC/mL respectivamente (Tabela IV, Figuras 11, 12, 13-anexo 1).

Com relação às associações duplas, as maiores reduções dos inóculos foram obtidas para as associações na seguinte ordem OFLO-*m*-FFen, OFLO-HHBA e HHBA-*m*-FFen, as quais induziram diminuições do inóculo equivalentes a $1,20 \pm 0,13 \log_{10}$ UFC/mL e $1,35 \pm 0,13 \log_{10}$, UFC/mL, $1,00 \pm 0,14 \log_{10}$ UFC/mL e $1,22 \pm 0,11 \log_{10}$, UFC/mL, $0,81 \pm 0,07 \log_{10}$ UFC/mL e $0,92 \pm 0,05 \log_{10}$ UFC/mL, após o tempo de 2h e 4h de contato, respectivamente (Tabela IV, Figuras 14, 15, 16-anexo 1).

No que tange a associação tríplice OFLO-HHBA-*m*-FFen, provocou uma redução de $1,06 \pm 0,09 \log_{10}$ UFC/mL e $1,00 \pm 0,09 \log_{10}$ UFC/mL do inóculo, após 2h e 4h de contato, respectivamente. (Tabela IV, Figura 17-anexo 1).

Efeito Pós-antibiótico

Analisando as curvas de crescimento após a eliminação da droga, que traduzem a persistência da ação das drogas ou de suas associações, foi constatado que os valores de EPA variaram em função do tempo de contato.

Os valores de EPA aumentaram com o aumento de tempo de contato, exceto para a associação HHBA-*m*-FFen cujos valores de EPA foram de $1,60 \pm 0,6$ e $1,70 \pm 0,90$ horas para 2h e 4h de contato, respectivamente.

A OFLO apresentou após 2h e 4h de contato os valores mais altos de EPA, $7,80 \pm 1,10$ e $12,3 \pm 1,20$ horas, respectivamente. O HHBA apresentou após 2h e 4h de contato valores de EPA equivalentes a $1,40 \pm 0,80$ e $4,20 \pm 1,50$ horas, respectivamente. Enquanto que o *m*-FFen induziu valores de EPA de $0,24 \pm 0,50$ horas e $0,68 \pm 1,30$ horas, após 4 horas de contato (tabela IV, Figuras 11, 12, 13-anexo 1).

Todas as associações duplas testadas apresentaram EPAs antagônicas. A associação OFLO-*m*-FFen apresentou EPA equivalente a $4,50 \pm 1,10$ horas para 2 horas de contato e $10,8 \pm 1,50$ horas após 4 horas de contato. As demais associações OFLO-HHBA e HHBA-*m*-FFen mostraram valores de EPA equivalentes a $3,20 \pm 0,90$ e $1,60 \pm 0,60$ horas, respectivamente após 2h de contato e com o aumento do tempo de contato estes valores de EPA continuaram antagônicos e da ordem de $4,80 \pm 2,30$ horas e $1,70 \pm 0,90$ horas (Tabela IV, Figuras 14, 15, 16-anexo 1).

A adição do derivado *m*-FFen à associação OFLO-HHBA mostrou ter um EPA de caráter antagônico quando observamos seus valores obtidos após 2 e 4 horas de contato (Tabela IV, Figura 17-anexo 1).

5.4.2 Valores de EPA e Influência do Tempo de Contato

Mycobacterium smegmatis

Os valores dos efeitos bactericidas e dos EPAs sobre o *Mycobacterium smegmatis* após 2 e 4 horas de contato estão apresentados na tabela V e nas figuras de 18 a 24 (anexo 2)

Tabela V: Influência dos tempos de contato de 2 e 4 horas sobre o efeito bactericida e os valores de EPA do HHBA, ofloxacino e *m*-fluor-fenilalanina e de suas associações sobre o *Mycobacterium smegmatis*

	Contato	EFEITO BACTERICIDA ^a		EPA ^b	
		2h x± dp	4h x± dp	2h x± dp	4h x± dp
Drogas					
OFLO		0,45±0,08	0,47±0,05	1,80±0,60	1,60±0,60
HHBA		0,37±0,05	0,41±0,02	2,10±0,70	3,20±1,40
OFLO+HHBA		0,31±0,12	0,34±0,04	2,60±1,10	3,10±0,90
OFLO+ <i>m</i> -FFen		0,37±0,10	0,48±0,06	3,20±1,50	3,60±0,80
HHBA+ <i>m</i> -FFen		0,51±0,05	0,45±0,03	1,50±0,50	3,00±0,80
OFLO+HHBA+ <i>m</i> -FFen		0,48±0,10	0,54±0,07	1,70±0,70	1,90±0,70

a=log₁₀ UFC; b= Horas; X± dp= média ± desvio padrão

Efeito Bactericida

No que concerne às drogas testadas isoladamente a ofloxacino (OFLO) apresentou as maiores reduções do inóculo inicial, quando estes são comparados ao HHBA. Uma diminuição de $0,45 \pm 0,80 \log_{10}$ UFC/mL e $0,47 \pm 0,05 \log_{10}$ UFC/mL foi observada com a OFLO após 2 e 4 horas, respectivamente. Após 2 horas de contato, o HHBA induziu a redução da população de *M. smegmatis* insignificantes ($p \leq 0,05$) e equivalentes a $0,37 \pm 0,05 \log_{10}$ UFC/mL, e sofreu influência com o aumento do tempo de contato elevando a redução do inóculo para $0,41 \pm 0,02$. (Tabela V, Figuras 18, 19, 20-anexo 2).

Das associações duplas, a maior redução do inóculo foi obtida para a associação HHBA-*m*-FFen, que induziu uma diminuição do inóculo equivalentes a $0,51 \pm 0,05 \log_{10}$ UFC/mL e $0,45 \pm 0,03 \log_{10}$ UFC/mL, após incubação de 2 e 4 horas, respectivamente. As outras associações testadas OFLO- *m*-FFen e OFLO-HHBA promoveram uma redução no inóculo próxima à obtida para a associação HHBA-*m*-FFen. (Tabela V, Figuras 21, 22, 23-anexo 2).

A associação tríplice, OFLO-HHBA-*m*-FFen, provocou uma redução próxima às obtidas com as associações duplas e equivalentes a $0,48 \pm 0,10 \log_{10}$ UFC/mL e $0,54 \pm 0,07 \log_{10}$ UFC/mL após 2 e 4 horas de contato, respectivamente (Tabela V, Figura 24-anexo 2).

Efeito Pós-antibiótico

Os valores de EPA obtidos com a ofloxacino, HHBA, *m*-FFen e suas associações frente ao *M. smegmatis* variaram em função do tempo de contato.

Estes valores de EPA aumentaram com o aumento de tempo de contato, exceto para o *m*-FFen, cujos valores de EPA não modificaram significativamente ($p \leq 0,05$) e foram equivalentes a $0,93 \pm 0,80$ horas para 2h e $0,80 \pm 0,50$ horas para 4h de contato. O HHBA apresentou os melhores valores de EPA iguais a $2,10 \pm 0,70$ horas e $3,20 \pm 1,40$ horas após 2 e 4 horas de contato. A OFLO reduziu em $1,80 \pm 0,60$ horas e $1,60 \pm 0,60$ horas. (Tabela V, Figuras 18, 19, 20-anexo 2).

Um EPA aditivo foi observado para a associação OFLO-*m*-FFen após 2 horas de contato, cujo valor de EPA foi igual a $3,20 \pm 1,50$ horas e sinérgico após 4 horas de contato, com um EPA igual a $3,60 \pm 0,80$ horas. As demais associações, OFLO-HHBA e HHBA-*m*-FFen, apresentaram valores de EPAs antagônicos após 2 e 4 horas de contato. (Tabela V, Figuras 21, 22, 23-anexo 2).

A adição do derivado *m*-FFen à associação OFLO-HHBA mostrou ter um caráter antagônico com EPA de $1,70 \pm 0,70$ horas e $1,90 \pm 0,70$ horas, após 2 e 4 horas de contato, respectivamente. (Tabela V, Figura 24-anexo 2).

6.0 DISCUSSÃO

A persistência da supressão do crescimento bacteriano após uma exposição curta aos antimicrobianos (efeito pós-antibiótico) tem sido demonstrada por uma grande variedade de bactérias e leveduras e exerce a sua principal função na otimização dos regimes terapêuticos. (HORGEN et al., 1999)

Contudo, diante da dificuldade de tratar as infecções causadas pelas micobactérias atípicas devido à resistência destas micobactérias aos antimicobacterianos de primeira linha e a vários antimicobacterianos de segunda linha, faz-se necessário a idealização de esquemas terapêuticos alternativos. (DALOVISIO & PANKEY, 1978)

Avaliando a atividade bactericida e o efeito pós-antibiótico podemos constatar que há uma relação direta entre estes dois parâmetros. Pois segundo Li et al., 1997, isto é um fenômeno que ocorre independente da classe do antimicrobiano ou da espécie bacteriana. Contudo Tsui, et al., 1993 ao determinar o efeito pós-antibiótico da OFLO contra o *M. fortuitum* observou uma falta de linearidade na relação entre este parâmetro e a atividade bactericida.

Embora tenha sido obtido em nosso estudo, um efeito aditivo do EPA para uma associação, este valor foi sempre menor que a soma de seus EPAs individuais, eg: o EPA da ofloxacino ($1,80 \pm 2,10$) e do *m*-FFen ($1,50 \pm 1,00$) comparado ao EPA de sua associação OFLO-*m*-FFen ($4,00 \pm 1,90$), após 4 horas de contato com o *M. smegmatis*. Estes resultados corroboram aos de HORGEN et al., 1999, que embora tenha avaliado o EPA de outros antimicrobianos como a amicacina, claritromicina, etambutol, rifampicina e de suas associações frente a cinco cepas de *M. avium*, obtiveram esta interpretação para as associações estudadas.

A associação da OFLO com o HHBA mostrou-se antagônica, fato que corrobora com Wolfson & Hooper, 1985 que afirma que a associação de fluorquinolonas com outros agentes antimicrobianos raramente mostra sinergismo ou antagonismo.

Foi observado um efeito antagônico para a associação HHBA-*m*-FFen semelhantemente ao observado por David et al., 1988 e Rastogi & Goh, 1990, onde constataram que o *m*-FFen não potencializava a atividade antimicrobiana da izoniasida, molécula análoga ao HHBA, pois apenas a desorganização da membrana externa da micobactéria por parte do *m*-FFen não é suficiente para que o HHBA alcance a membrana bacteriana, devido a sua baixa solubilidade nos lipídios da parede celular das micobactérias. Contudo a associação da OFLO com o *m*-FFen mostrou-se sinérgica contra o *M. smegmatis*,

semelhante aos resultados encontrados por Barrow et al., 1993, onde o *m*-FFen potencializou a atividade de alguns antimicrobianos contra as colônias do micobacterianas enrugadas devido a presença do micosídeo C.

As glicolipoproteínas (GLPs) também denominados micosídeo C ou compostos relacionados presentes na parede celular das micobactérias podem está em maior quantidade no *M. smegmatis* que no *M. fortuitum*. O micosídeo C presente na parede celular do *M. fortuitum* é uma variante estrutural do encontrado no *M. smegmatis*, diferindo no tipo e na distribuição dos sacarídeos. É sabido que estas glicolipoproteínas são espécie-específicos e que poderão ainda variar dentro de uma mesma espécie dificultando a elucidação de mecanismos envolvidos na resposta imune, na resistência/sensibilidade e na própria taxonomia do microrganismo em questão (FREGMAN et al., 1961; CAMPHAUSEN et al., 1987; MARIN et al., 1991; BESRA et al., 1992; GAUTIER et al., 1992; ARIZA et al., 1994).

Logo o micosídeo C que está presente na parede celular do *M. smegmatis* exerce sua importância na integridade da parede celular deste microrganismo e contém aminoácidos (L-fenilalanina, L-isoleucina) podendo sugerir que esta seja a causa da maior susceptibilidade do *M. smegmatis* a atividade potencializadora do *m*-FFen. O que justifica termos encontrado como única associação sinérgica a OFLO-*m*-FFen contra o *M. smegmatis*.

Como os mecanismos do EPA ainda não estão totalmente definidos é difícil lançar hipóteses acerca do qual ou quais mecanismos estão implicados na variação dos resultados dos EPAs de drogas testadas em associação. Estudos aprofundados das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das drogas são fundamentais para elucidar tais mecanismos.

Os resultados obtidos neste trabalho são estudos preliminares de natureza limitada, mas contribuirão para o conhecimento do EPA, principalmente, quanto aos aspectos práticos da quimioterapia antimicobacteriana.

7.0 CONCLUSÕES

Quando testadas isoladamente, a ofloxacino induziu aos maiores valores de EPA para o *M. fortuitum*, após 2 e 4 horas de contato. Enquanto que o HHBA induziu aos maiores valores de EPA para o *M. smegmatis*, após 2 e 4 horas de contato.

Para os microrganismos *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, o aumento do tempo de contato de 2 para 4 horas induziu um aumento nos EPAs das drogas estudadas, exceto para a associação HHBA-*m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, bem como para o *m*-FFen, e para as associações OFLO-HHBA e OFLO-HHBA-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*.

Todas as associações testadas frente o *M. fortuitum* e *M. smegmatis* apresentaram um caráter antagônico. Exceto a associação OFLO-*m*-FFen testada frente ao *M. smegmatis* que apresentou um EPA aditivo após 4 horas de contato. Esta interação aditiva demonstra a importância do micosídeo C para a manutenção da viabilidade celular deste microrganismo.

O antagonismo observado na associação HHBA-*m*-FFen pode ser explicado pela lipossolubilidade do HHBA ser insuficiente para que esta molécula alcance a membrana bacteriana logo, alterações que confirmam uma maior lipossolubilidade à molécula do HHBA podem ser idealizada de modo que a associação desta nova molécula com o *m*-FFen torne-se viável.

O aumento dos tempos de contato bem como a utilização de concentrações múltiplas da CMI, provavelmente induziria a EPAs sinérgicos para as associações estudadas.

O tempo de contatos escolhidos associados a CMI utilizada para os ensaios não permitiu que as drogas e suas associações pudessem induzir EPAs sinérgicos, embora algumas associações tenham mostrado um EPA aditivo.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANGARDEN, G., J.; LERNER, S.A. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1213-1221. 1997.

ARIZA, M.A., MARTIN-LUENGO, F., VALEO-GUILLÉN, P. A Family of Diacyltrehaloses Isolated From *Mycobacterium fortuitum*. **Microbiology**, v.140, p.1989-1994. 1994.

BANERJEE, S., BHATT, K., RANA, S., MISRA, P., CHARKRABORTI, P.K. Involvement of an Efflux System in Mediating High Level of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 226, n. 1362, p.362-368. 1996.

BARROW, W., W.; WRIGHT, E.L.; GOH, K.S.; RASTOGI, N. Activities of fluoroquinolone, macrolide, and aminoglycoside drugs combined with inhibitors of glycosylation and fatty acid and peptide biosynthesis against *Mycobacterium avium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, n 4, p. 652-661. 1993.

BARRY III, C., E.; LEE, R.E.; MDLULI, K.; SAMPSON, A.E.; SCHROEDER, B.G.; SLAYDEN, A.; YUAN, Y. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. **Prog. Lipid. Res.**, v. 37, p. 143-179. 1998.

BARRY III, C., E. Interpreting cell wall “virulence factors” of *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 237-241. 2001.

BASSO, L.A., SCHROEDER, E.K., de SOUZA, O.N., SANTOS, D.S., BLANCHARD, J.S. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 01-29. 2002.

BESRA, G.S., McNEIL, M.R., BRENNAN, P.J. Characterization of the Specific Antigenicity of *Mycobacterium fortuitum*. **Biochemistry**, v. 31, p. 6504-6509. 1992.

BESRA, G.S., CHATTERJEE, D. Lipids and Carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In: BLOOM, B.R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control**. Washington, DC: ASM Press, p. 285-306. 1994.

BRENNAN, P., J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83, p. 91-97. 2003.

BRITTON, D. “*Mycobacterium avium* complex” **Gay men’s crisis treatment issues**. v. 5, n. 8, p. 34-42. 1991.

BRUTUS, J., P.; BAETEN, Y.; CHAHIDI, N.; RINNEN, L.; LEDOUX, P.; MOERMANS, J.P. Atypical mycobacterial infections of the hand: report of eight cases and literature review. **Chirurgie de la Main**, v. 20, p. 280-286. 2001.

CAMPHAUSEN, R.T., McNEIL, M., JARDINE, I., BRENNAN, P. Location of Acyl Groups of Trehalose-Containing Lipooligosaccharides of Mycobacteria. **J. Bacteriol.**, v.169, n. 8, p. 5473-5483. 1987.

CARVALHO, W. A. Quinolonas In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan, p.1045-1059. 1998.

CHAN, C.Y., AU-YEANG, C., YEW, W.W., HUI, M., CHENG, A. Postantibiotic Effect of Antituberculosis Agents Alone and in Combination. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p.3631-3634. 2001.

CHIN, N., NEU, H.C. Post-Antibiotic Suppressive Effect of Ciprofloxacin Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Am. J. Med.**, v. 82, p.58-62. 1987.

CHOUDHURI, B., S.; SEN, S.; CHARRABARTI, P. Isoniazid accumulation in *Mycobacterium smegmatis* is modulated by proton motive force-driven and ATP-dependent extrusion systems. **Biochem. Biophys. Res. Communic.**, v. 256, p. 682-684. 1999.

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

CRAIG, W. A., GUDMUNDSSON, S. Postantibiotic effect. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 2nd.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.515-536, 1996.

DALOVISIO, J.R.; PANKEY, G.A. Problems in diagnosis and therapy of *Mycobacterium fortuitum* infections. **American Review of Respiratory Disease**, v. 117, p. 625-630. 1978.

DAVID, H.L.; RASTOGI, N.; CLAVEL-SÉRÈS, S.; CLÉMENT, F.; THOREL, M.F. Structure of the cell envelope of *Mycobacterium avium*. **Zbl. Bakt. Hyg.**, v. 264, p. 49-66. 1987.

DAVID, H.L.; RASTOGI, N.; CLAVEL-SÉRÈS, S.; CLÉMENT, F. Alterations in the outer wall architecture caused by the inhibition of mycoside C biosynthesis in *Mycobacterium avium*. **Curr. Microbiol**, v. 17, p. 61-68. 1988.

DESBORDES, J. **Diagnostic Bactériologique des Mycobactéries (Bacilles tuberculeux et Para-Tuberculeux)** Paris: Masson Editora, 128p. 1951.

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

ETIENNE, G.; VILLENEUVE, C.; BILLMAN-JACOBÉ, H.; ASTARIE-DEQUEKER, C.; DUPONT, M.A.; DAFFÉ, M. The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiology**, v.148, p. 3089-3100. 2002.

FALKINHAM III, J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin Microb Rev.**, v. 9, n.2, p.177-215. 1996.

FREGNAN, G.B., SMITH, D.W., RANDALL, H.M. Biological and chemical studies on mycobacteria, **J. Bacteriol.**, v. 82, p.517-527. 1961.

GAUTIER, N., MARÍN, L.M.L., LANÉELLE, M.A., DAFFÉ, M. Structure of Mycoside F, a Family of Trehalose-Containing Glycolipis of *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98, p.81-88. 1992.

GOTTFREDSSON, C. G., ERLENDSDORTTIR, H., KOLKA, R. Ultrastructural alterations of bacteria during the postantibiotic effect. **Chemotherapy**, v. 39, p. 153-162. 1993.

GRANGE, J. M.; COLLINS, C.H.; RUSSEL, A.D.; ANDREW, P.W. Mycobacterial disease-old problems, new solutions. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p.1S-9S. 1996.

GUILLEMIN, I.; JARLIER, V.; CAMBAU, E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in Mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 42, n. 8, p. 2084-2088. 1998.

HORGEN, L., LEGRAN, E., RASTOGI, N. Postantibiotic effect of rifampin, amikacin, claritromycin and etambutol used alone or in various two-, three and four-drug combinations against *Mycobacterium avium*. **FEMS Immunology and Microbiology**, v.23, p. 37-44. 1999.

JOHNSON, S., M.; ROBERTS, G.D. *In vitro* activity of ciprofloxacin and ofloxacin against the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 7, p. 89-91. 1987.

KARTMANN, B., STENGLER, S., NIEDERWEIS, M. Porins in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacter.**, v.181, p.6543-6546. 1999.

KENNEDY, M., P.; O'CONNOR, T.M.; RYAN, C.; SHEEHAN, S.; CRYAN, B.; BREDIN, C. Nontuberculous mycobacteria: incidence in Southwest Ireland from 1987 to 2000. **Respiratory Medicine**, v. 97, p. 257-263. 2003.

KOLETAR, S.L., Treatment of *Mycobacterium avium* in human immunodeficiency virus-infected individuals. **The American Journal of Medicine**, v. 102, n. 26, p. 16-21. 1997.

LAWN, S.D., BUTERA, S.T., SHINNICK, T.M. Tuberculosis unleashed: the impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 635-646. 2002.

LEITE, A., C.; VIEIRA, R.F.; FARIA, A.R.; WANDERLEY, A.G.; AFIATPOUR, P.; AZEVEDO-XIMENES, E.C.P.; SRIVASTAVA, R.M.; OLIVEIRA, C.F.; MEDEIROS, M.V.; ANTUNES, E.; BRONDANI, D.J. Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial activities of new 1,2,4-oxadiazoles peptidomimetics. **II FÁRMACO**, v. 55, p. 719-724. 2000.

LEVISON, M. E. Pharmacodynamics of antimicrobial agents- bactericidal and postantibiotic effects. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.9, n. 3, p. 483-495, sept. 1995.

MACCARI, R.; OTTANA, R.; MONFORTE, F.; VIGORITA, M.G. *In vitro* antimycobacterial activities of 2'-monosubstituted isonicotinohydrazides and their cyanoborane adducts. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n. 2, p. 294-299. 2002.

MACKENZIE, F.M., GOULD, I.M.. The postantibiotic effect. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.32. p. 519-537. 1993.

MANDELL, G. L., PETRI, W. A. JR. Fármacos Antimicrobianos. In: GILMAN, G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. México-DF.9 ed. McGraw Interamericana Editores. p. 777-789.1996.

MARÍN, L.M.P.; LANÉELLE, M.A.; PROMÉ, D.; DAFFÉ, M.; LANÉELLE, G.; PROMÉ, J.C. Glycopeptidolipids from *Mycobacterium fortuitum*: A Variant in the Structure of C-Mycoside. **Biochemistry**, v. 30, p.10536-10542. 1991.

McNEIL, 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 from recent structural information. **Res. in Microb.**, v. 141, p. 451-463. 1990.

MICHEL-BRIAND, Y. **Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques**. Paris: Masson, 370 p. 1986.

MINGUEZ, F., RAMOS, C., BARRIENTOS, S., LOSCOS, A., PRIETO, J. Postantibiotic Effect of Ciprofloxacin Compared With that of Five Other Quinolones. **Chemotherapy**, v. 37, p. 420-425. 1991.

MIKUSOVÁ, K.; SLAYDEN, R.A.; BESRA, G.S.; BRENNAN, P.J. Biogenesis of the Mycobacterial cell wall and the site of action of etambutol. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 39, n. 8. p. 2484-2489. 1995.

O'BRIEN, R. J., The epidemiology of nontuberculous mycobacterial disease. **Clinics in Chest Medicine**, v. 10, n. 3, p. 407-417, 1989.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, n. 10, p.2595-2599. 2000.

RASTOGI, N., GOH, K.S., CLAVEL-SÉRÈS, S. Stazyme, a mycobacteriolytic preparation from a *Staphylococcus* strain, is able to break the permeability barrier in multiple drug resistant *Mycobacterium avium*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.19, p.297-305. 1998.

RASTOGI, N.; GOH, K.S.; GINKEL, S.Z.V.; WRIGHT, E.L.; BARROW, W.W. Identification of new drug targets in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Res. in Microb.**, v. 146, p. 97-105. 1995.

RASTOGI N.; GOH, K.S.; WRIGHT, E.L.; BARROW, W.W. Potencial drug targets for *Mycobacterium avium* defined by using radiometric drug-inhibitor combination techniques. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, n. 10, p. 2287–2295. 1994a

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

RASTOGI, N. Emergence of multiple-drug-resistant tuberculosis: fundamental and applied research aspects, global issues and current strategies. **Res. Microbiol.**, v. 144, p. 103-158. 1993.

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, n. 5, p. 759-764. 1990a

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. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, n. 11, p. 2061–2064. 1990b.

RASTOGI, N.; MOREAN, B.; CAPMAN, M.L.; GOH, K.S.; DAVID, H.L. Antibacterial action of amphipathic derivatives of isoniazid against the *Mycobacterium avium* complex. **Zbl. Bakt. Hyg.**, v. 268, p.45-462. 1988.

RODRÍGUEZ, J. C.; RUIZ, M.; CLIMENT, A.; ROPYO, G. *In vitro* activity of four fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 17. p.229-231. 2001.

SALMAN, M.; BRENNAN, P.J.; LNSDALE, J.T. Synthesis of mycolic acids of mycobacteria: an assessment of the cell-free system in light of the whole genome. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1437, p. 325-332. 1999.

SANDER, P.; ROSSI, E.; BÖDDINGHAUS, B.; CANTON, R.; BRANZON, M.; BÖTTGER, E.C.; TAKIFF, H.; RODRIQUES, R.; LOPEZ, G.; RICCARDI, G. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. **FEMS Microb. Letters**, v. 193, p. 19-23. 2000.

SANDY, J.; MUSHTAQ, A.; KAWAMURA, A.; SINCLAIR, J.; SIM, E.; NOBLE, M. The structure of arylamine *N*-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*-An enzyme which inactivates the anti-tubercular drug, isonizid. **J. Mol. Biol.**, v. 318, p. 1071-1083. 2002.

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

SCHERMAN, M., S.; WINANS, K.A.; STERN, R.J.; JONES, V.; BERTOZZI, C.R.; McNEIL, M.R. Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: development of a microtiter plate-based screen for UDP-Galactopyranose mutase and identification of an

inhibitor from a Uridin-Based library. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, n. 1, p. 378-382. 2003.

SCHROEDER B.; BARRY III, C.E. The specificity of methyl transferases involved in *trans* mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorganic Chemistry*, v. 29, p. 164-177. 2001.

SEPKOWITZ, K., A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L.; KIEHN, T.E.; ARMSTRONG, D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clint. Microb. Rev.*, v. 8, p. 180-199. 1995.

SILVA, P., E., A.; BIGI, F.; SANTANGELO, M.L.P.; ROMANO, M.I.; MARTÍN, C.; CATALDI, A.; AÍNSA, J.A. Characterization of P55m a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovid* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 3, p. 800-804. 2001.

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

SRIVASTAVA, R., M.; LIMA, A.A.; VIANA, O.S.; COSTASILVA, M.J.; CATANHO, M.T.J.A.; MORAIS, J.O.F. Antiinflammatory property of 3-aryl-5-(*n*-propyl)-1,2,4-oxadiazoles and antimicrobial property of 3-aryl-5-(*n*-propyl)4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoles: their syntheses and spectroscopic studies. *Bioorganic & Medical Chemistry*, v. 11, p. 1821-1827. 2003.

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

VICENTE, I.C.S..**Atividade bactericida de um novo derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida frente ao *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 89p. 2003.

WALLACE, R, J, Jr. The Clinical Presentation, Diagnosis, and Therapy of Cutaneous and Pulmonary Infections Due to the Rapidly Growing Mycobacteria, *M. fortuitum* and *M. chelonae*. *Clinics in Chest Medicine*, v. 10, p.419-429. 1989.

WALLACE, R, J, Jr., O'BRIEN, R., GLASSROTH, J., RALEIGH, J., DUTT, A. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease*, v. 120, p. 940-953. 1990.

WHEELER, P., R.; BESRA, G.S.; MINNIKIN, D.E.; RATLEDGE, C. Stimulation of mycolic acid biosynthesis by incorporation of *cis*-treacos-5enoic acid in cell-wall preparation from *Mycobacterium smegmatis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1167, p. 182-188. 1993.

WIID, I.; HELDEN, E.H.; HON, D.; LOMBARD, C.; HELDEN, P.V. Potentiation of Isoniazid Activity against *Mycobacterium tuberculosis* by Melatonin. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 43, n. 4, p. 975-977. 1999.

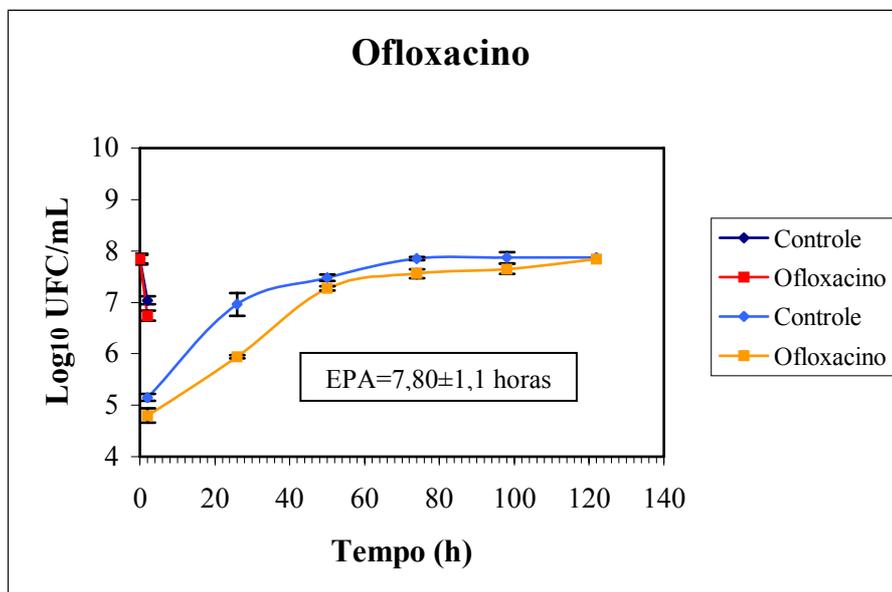
WILLIAMS, K., J.; CHUNG, G.A.C.; PIDDOCK, L.J.V. Accumulation of norfloxacin by *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob. Agents and Chemoter.** v. 42, n. 4, p. 795-800. 1998.

WOLFSON, J.S.; HOOPER, D. C. The fluorquinolones: structures, mechanisms of action and resistance and spectra of activity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 28, n. 4, p. 581-586, 1985.

ZHANEL, G.G., SAUDRES, M.H., WOLFE, J.N., HOBAN, D.J., KARLOWISKY, J.A., KABANI, A.M. Comparison of CO₂ Generation (BACTEC) and Viable-Count Method to Determine the Postantibiotic Effect of Antimicobacterial Agents against *Mycobacterium avium* Complex. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 184-187. 1998.

Anexo 1

a



b

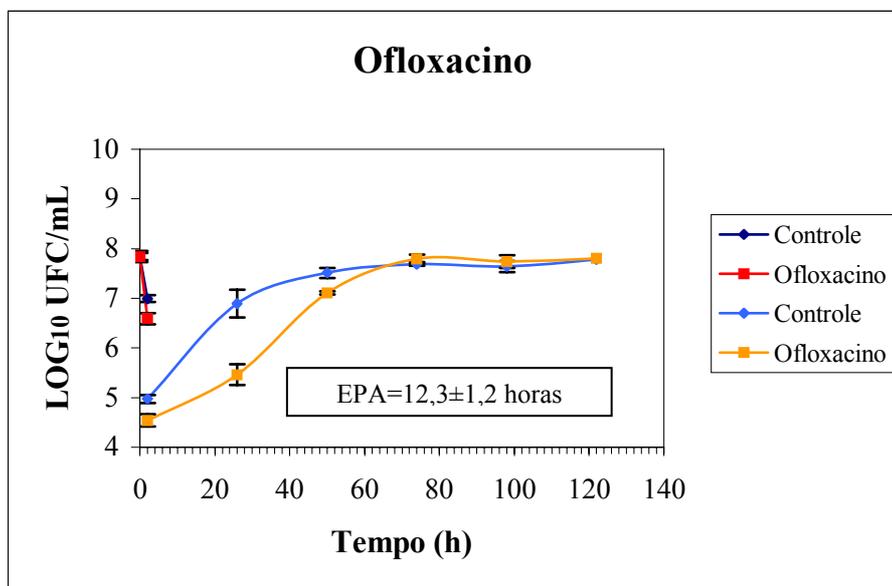
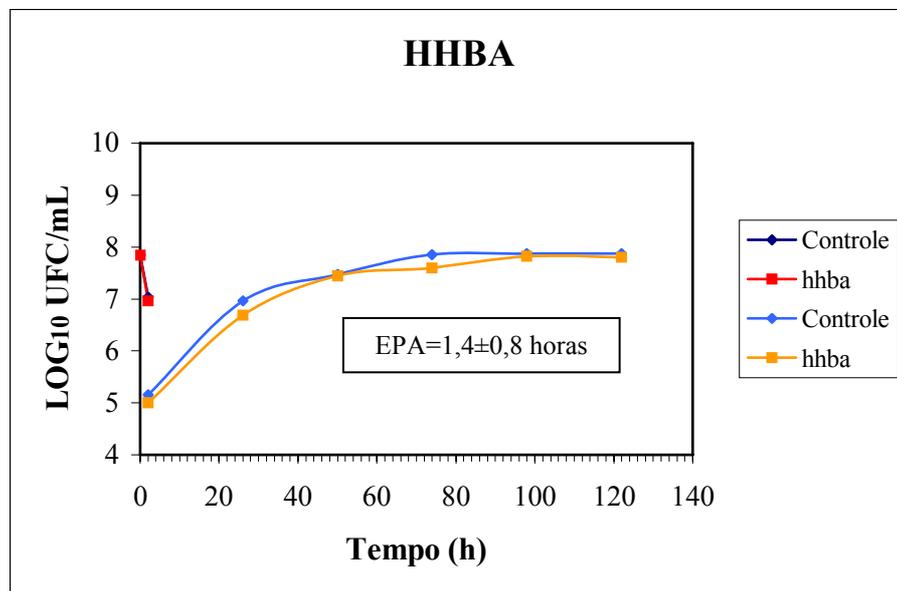


Figura 11: EPA da ofloxacino frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

a



b

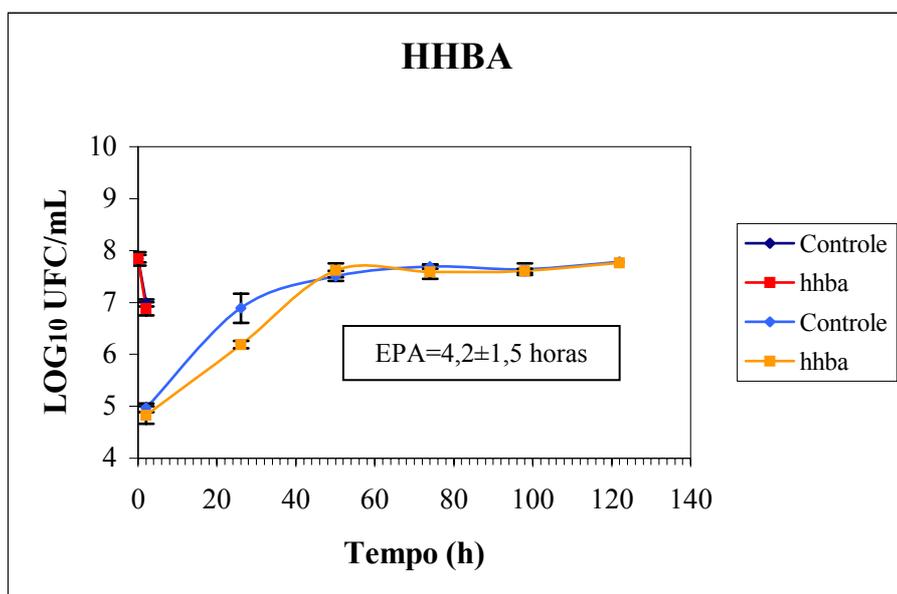


Figura 12: EPA do HHBA frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

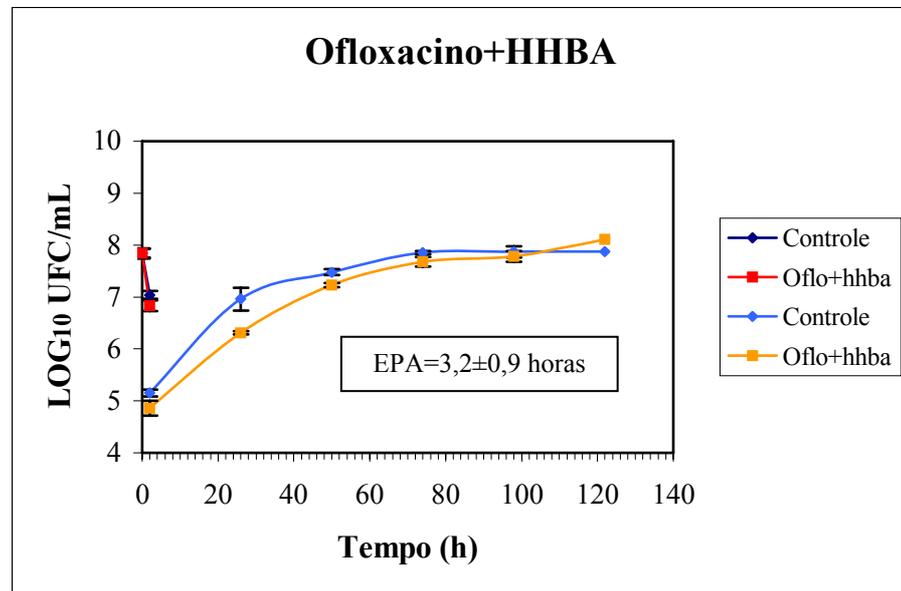
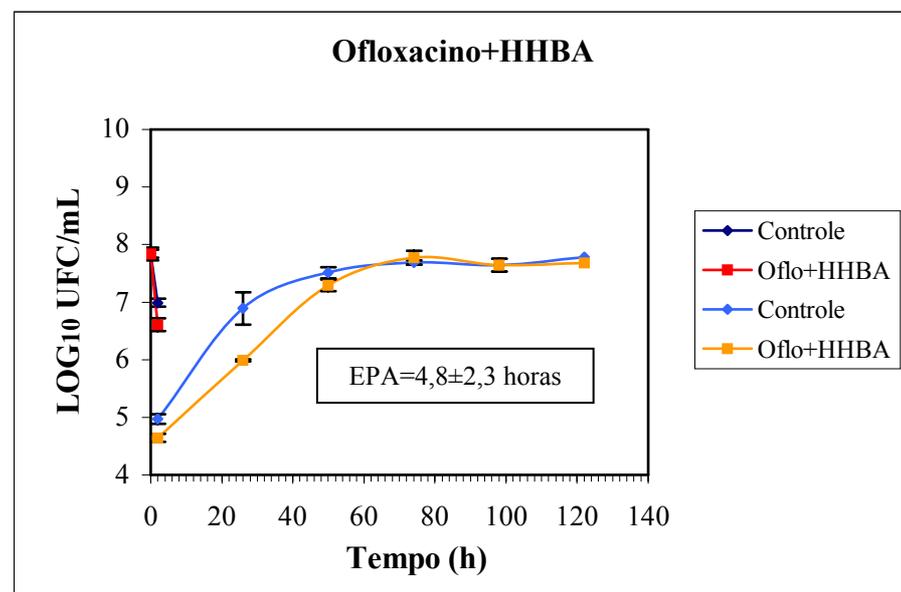
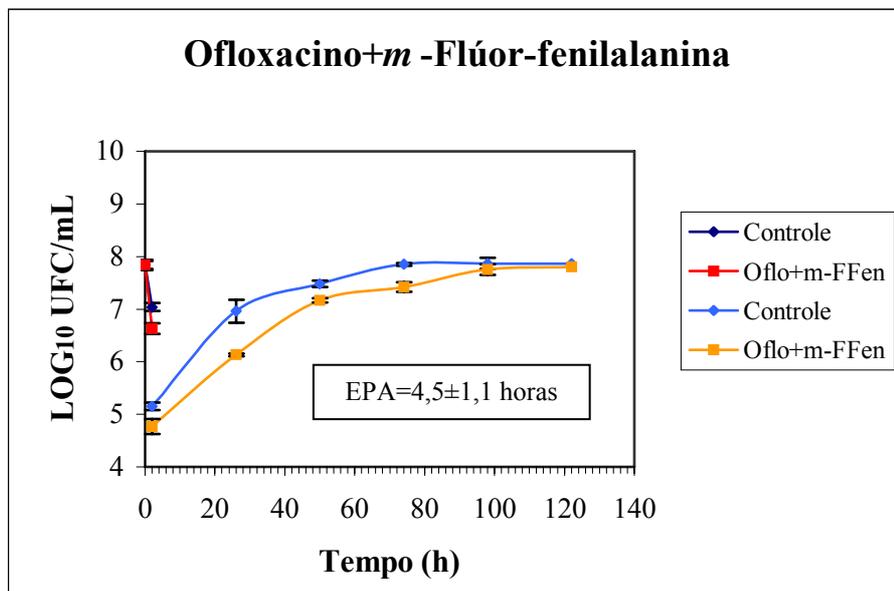
a**b**

Figura 14: EPA da associação OFLO-HHBA frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

a



b

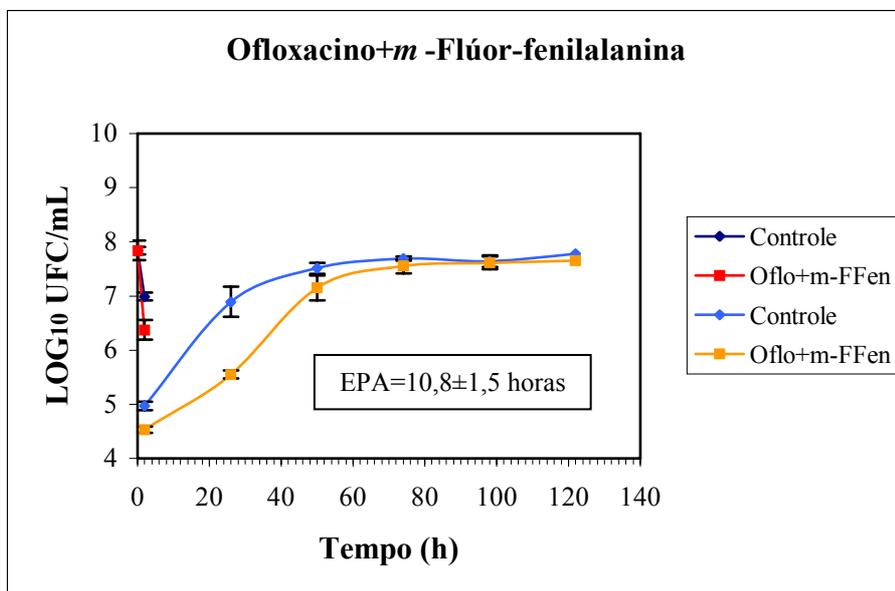
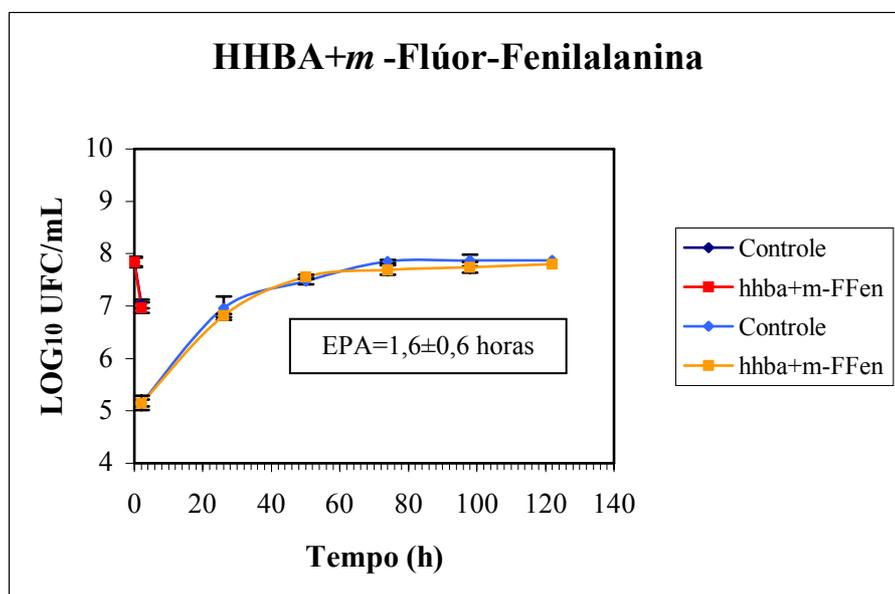


Figura 15: EPA da associação OFLO-*m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

a



b

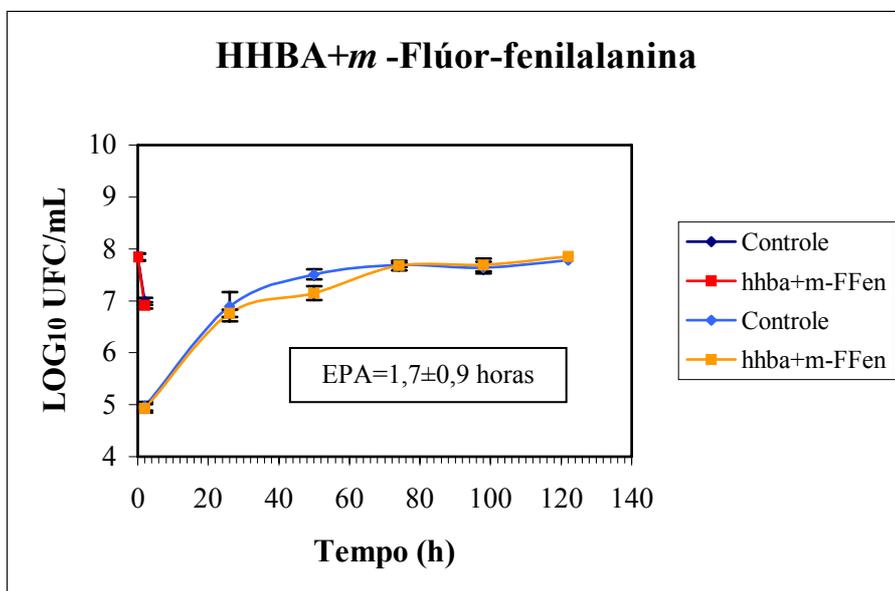
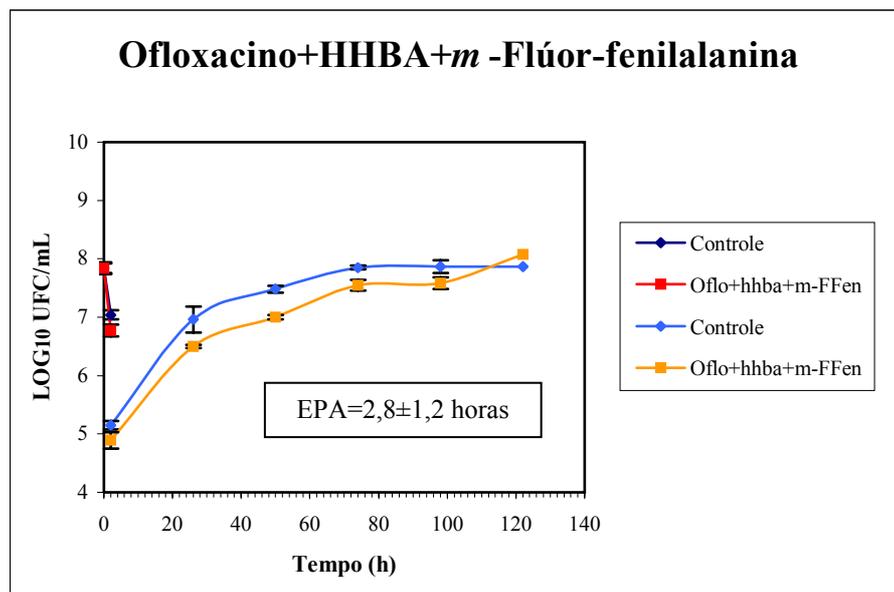


Figura 16: EPA da associação HHBA-*m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

a



b

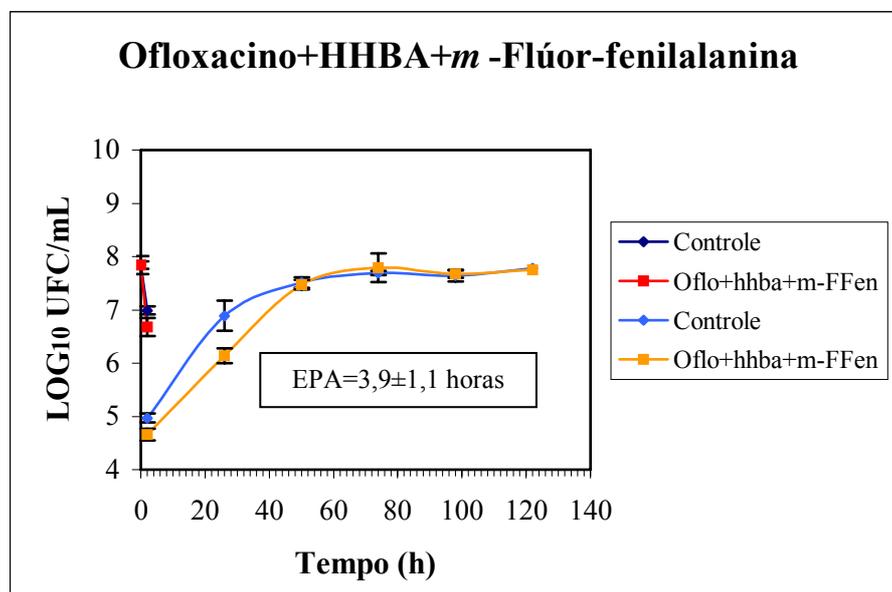
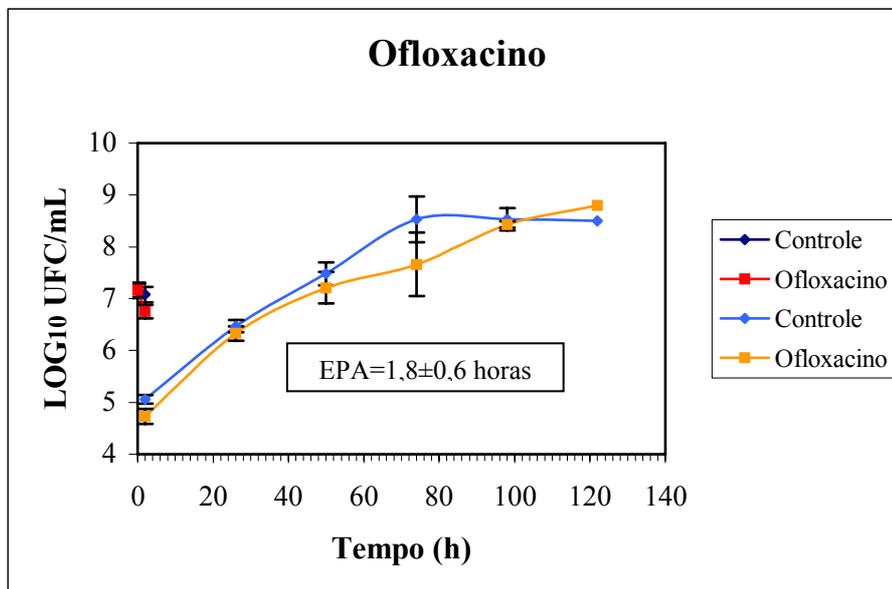


Figura 17: EPA da associação OFLO-HHBA-*m*-FFen frente ao *M. fortuitum*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

Anexo 2

a



b

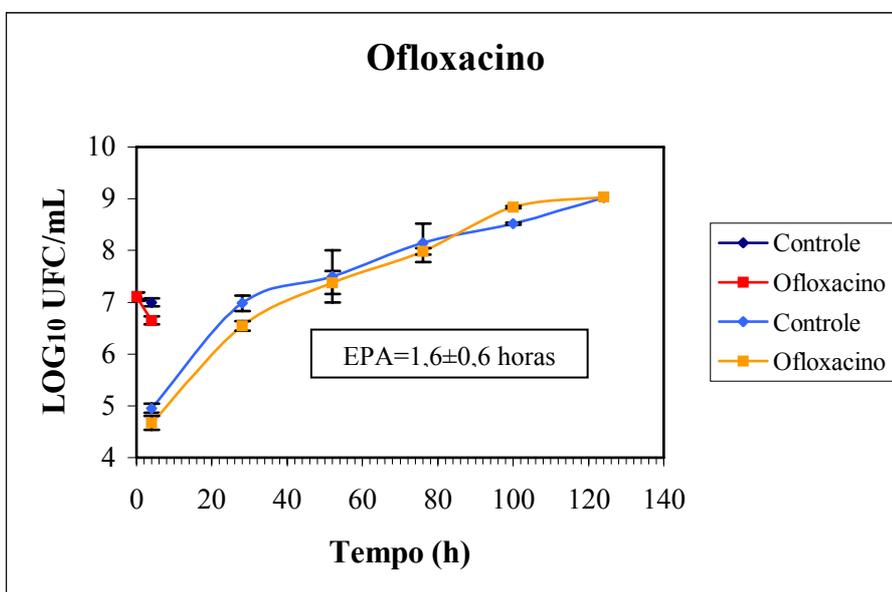


Figura 18: EPA da ofloxacino frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

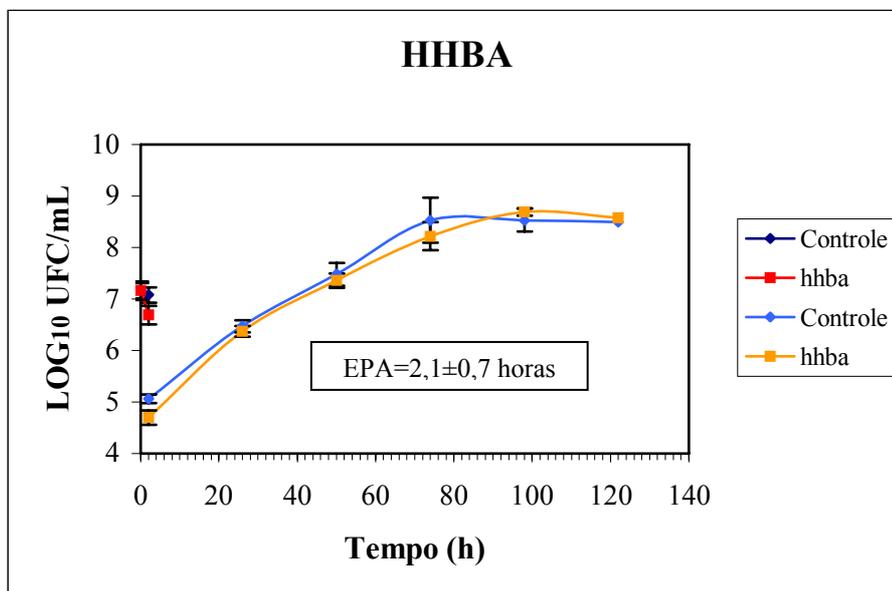
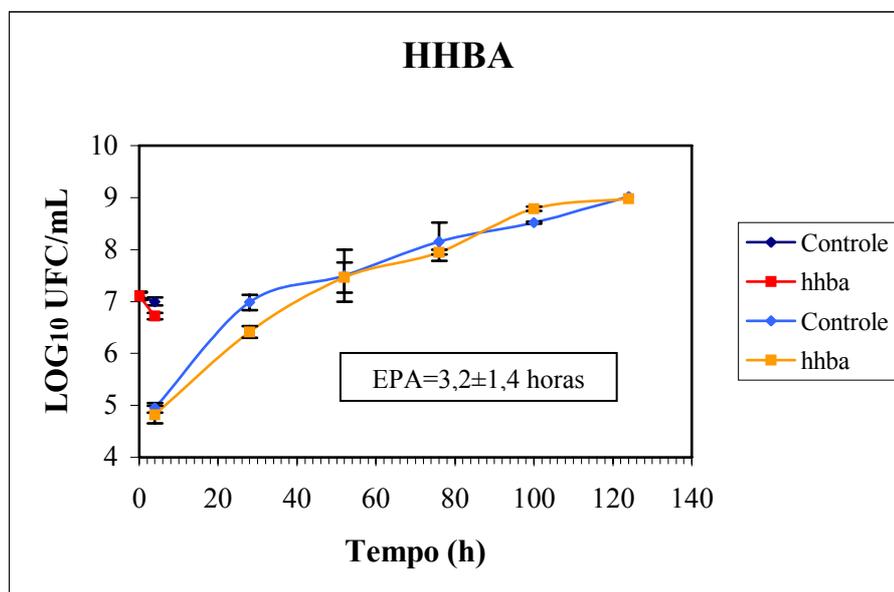
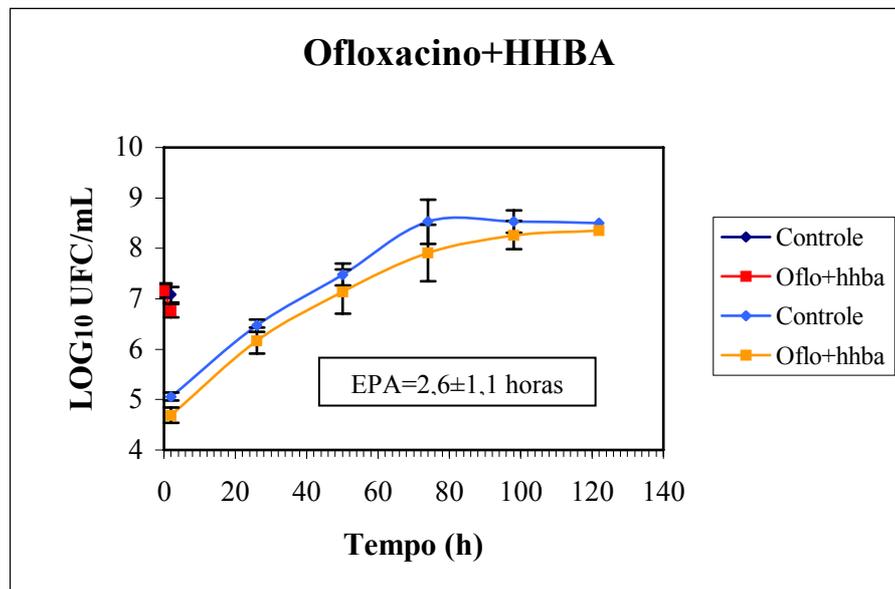
a**b**

Figura 19: EPA do HHBA frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

a



b

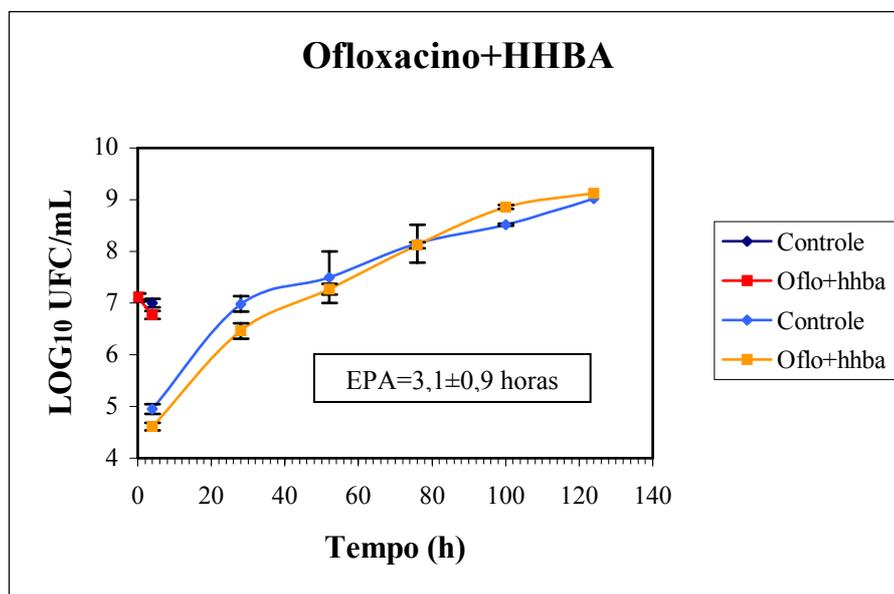
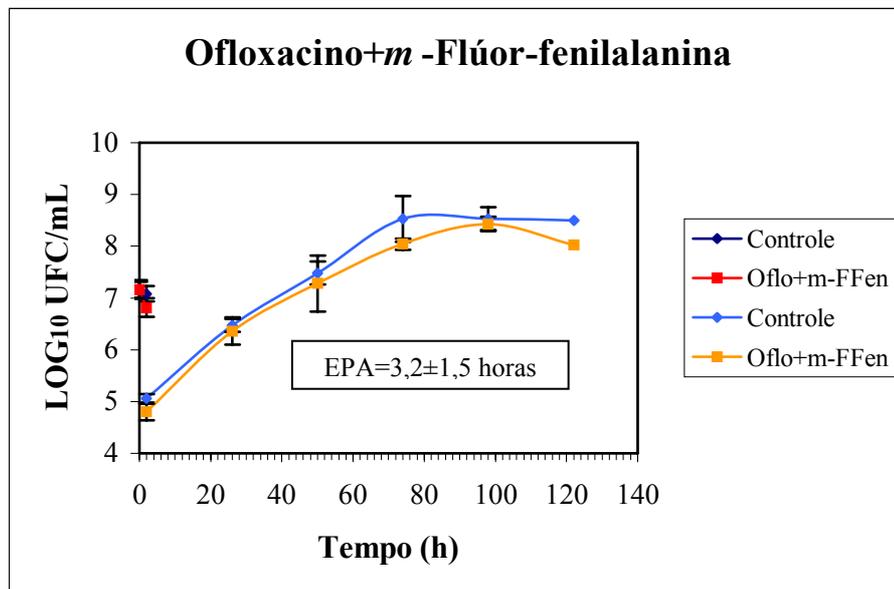


Figura 21: EPA da associação OFLO-HHBA frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

EPA=3,10±0,9 horas

a



b

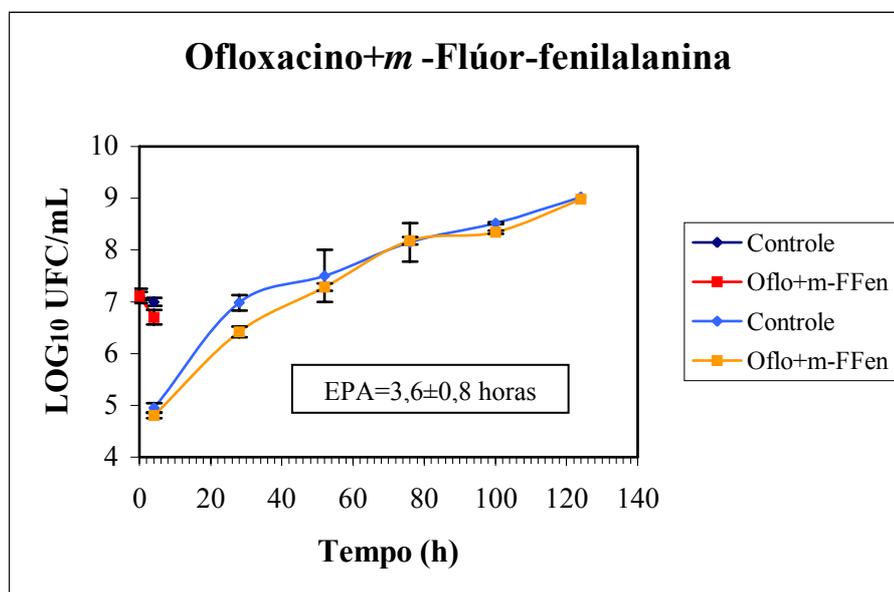
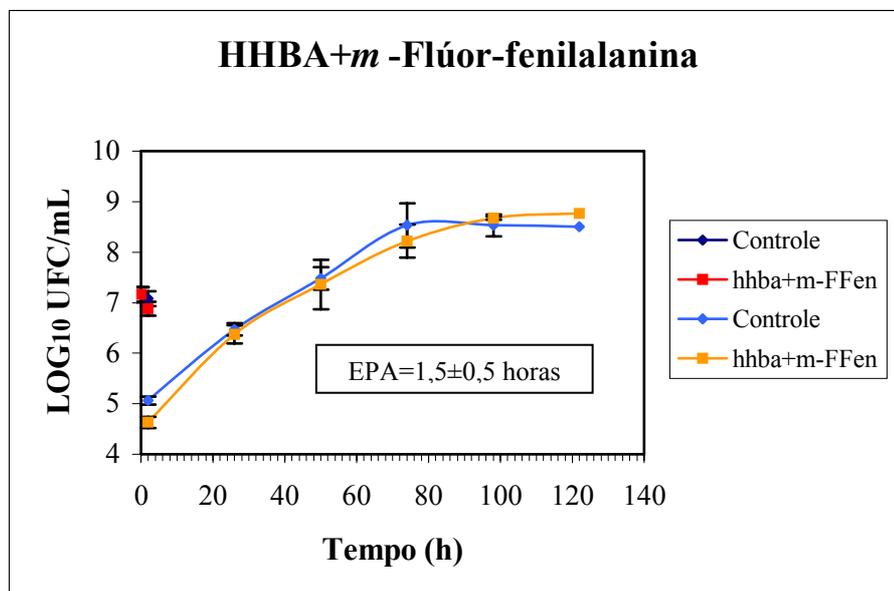


Figura 22: EPA da associação OFLO-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

a



b

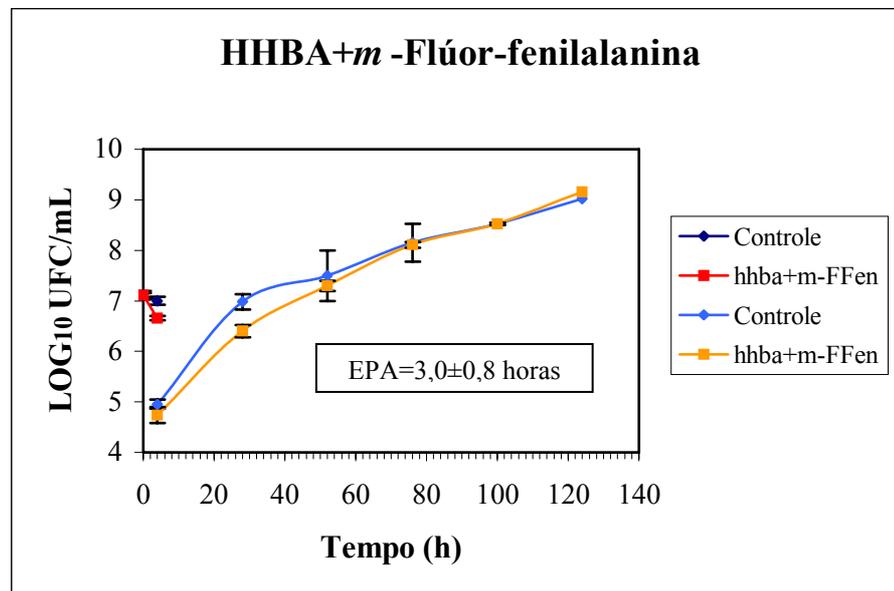
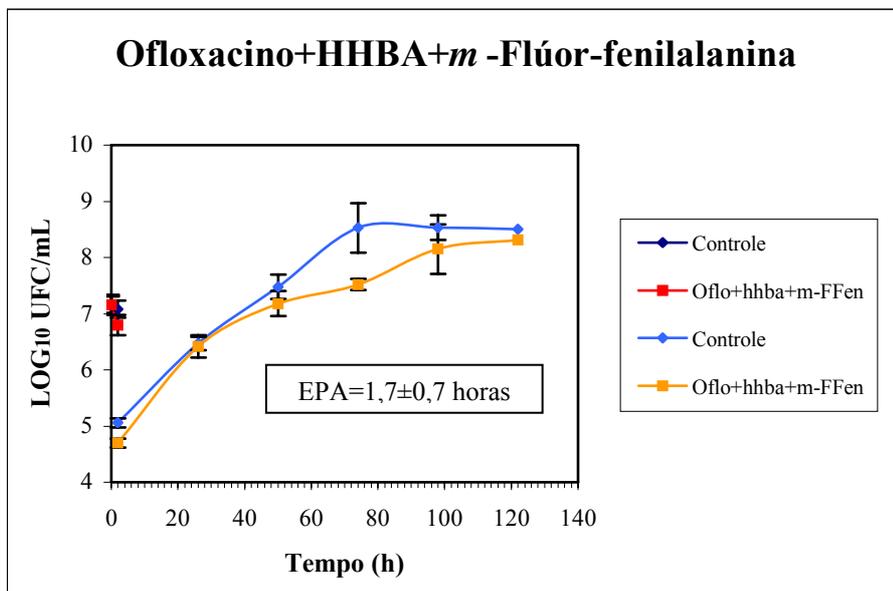


Figura 23: EPA da associação HHBA-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).

a



b

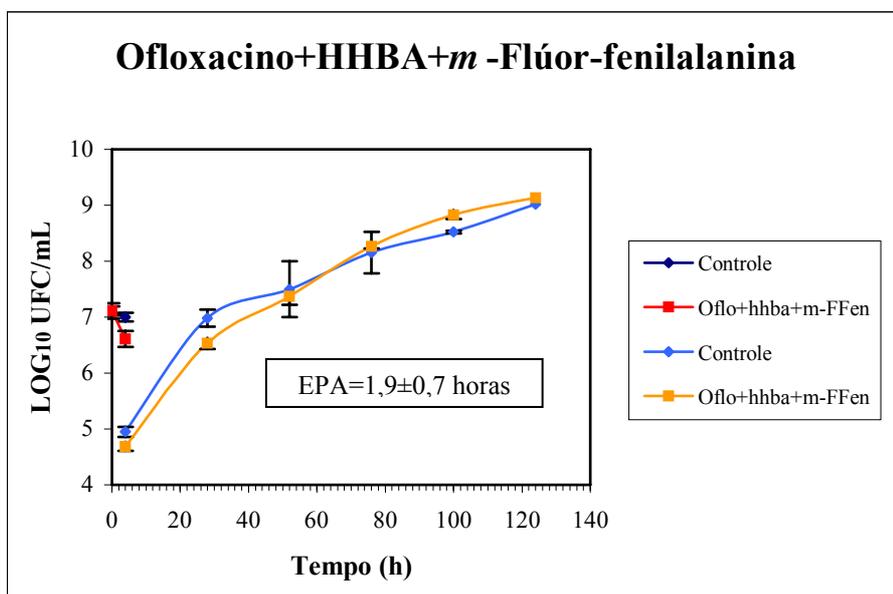


Figura 24: EPA da associação OFLO-HHBA-*m*-FFen frente ao *M. smegmatis*, após o contato de 2 horas (a) e 4 horas (b).