

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

**ATIVIDADE BACTERICIDA DA  $\beta$ -LAPACHONA, ISONIAZIDA, DE UM  
DERIVADO 1,2,4-OXADIAZOL-HIDRAZIDA E DE SUAS ASSOCIAÇÕES  
FRENTE AO *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis***

**JOÁS LUCAS DA SILVA**

Recife-2005

**ATIVIDADE BACTERICIDA DA  $\beta$ -LAPACHONA, DA ISONIAZIDA,  
DE UM DERIVADO 1,2,4-OXADIAZOL-HIDRAZIDA E DE 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 EM BIOTECNOLOGIA.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eulália de Azevedo Ximenes.

Recife-2005

Silva, João Lucas da

Atividade bactericida da  $\beta$ -lapachona, da isoniazida, de um derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida e de suas associações frente ao *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis* / João Lucas da Silva . – Recife : O Autor, 2005.

96 folhas. : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2005.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Antimicobacterianos – Micobactérias. 2. Micobactérias atípicas – *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis* – Concentração inibitória mínima e cinética bactericida. 3. Uso de um derivado do 1,2,4-oxadiazol contra micobactérias atípicas – Atividade de quinonas e isoniazida. I. Título.

615.015.2  
615.7

CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)

UFPE  
BC2005-162

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *JOÁS LUCAS DA SILVA* AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

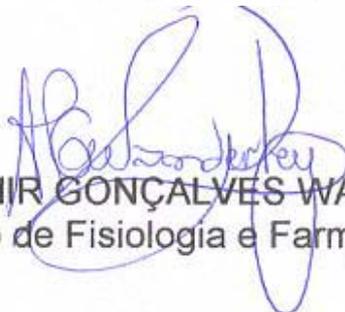
DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 25 DE FEVEREIRO DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. GLÍCIA MARIA TORRES CALAZANS  
Departamento de Antibióticos – UFPE



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



Dr. ALMIR GONÇALVES WANDERLEY  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

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

**REITOR**

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS ACADÊMICOS**

Prof<sup>a</sup>. Lícia de Souza Leão Maia

**DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Prof<sup>a</sup> Miriam Camargo Guarnier

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

Prof<sup>a</sup>. Silene Carneiro do Nascimento

**COOEDENADORA DO CURSO DE MESTRADO**

Prof<sup>a</sup>. Ana Maria Souto-Maior

**VICE-COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO**

Prof. Alexandre José da Silva Goés

***Aos meus pais, Manoel Lucas da  
Silva e Maria José da Silva;***

***Aos meus irmãos, Maria do  
Carmo, Carmen Lúcia, Rinaldo  
Lucas e João Roberto da Silva.***

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, a luz do meu caminho.

À orientadora, Professora Eulália Pessoa de Azevedo Ximenes, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e a amizade.

À professora Glícia Maria Torres Calazans pelo despertar do interesse pela pesquisa científica.

A José Maurício dos Santos Filho e aos Professores Ivan da Rocha Pitta e Lúcia Fernanda C. da Costa Leite em disponibilizar o derivado 1,2,4-oxadiazol.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Amanda Mesquita, Anabelle Bezerra, Antônio Amato, Érika Avelar, Januana Teixeira e Denise Tenório, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, em especial, Marcela Araújo, Fernanda Borba e Chíntia Gisele.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos pelos novos conhecimentos.

Aos meus amigos da turma de mestrado pelos bons momentos.

À secretária do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Maria Suely R. Cavalcanti pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos de Universidade Federal de Pernambuco, Joserina Gusmão de Oliveira, Marineide Pereira da Silva e Janes Ribeiro da Cunha, pela ajuda no desenvolvimento de nosso trabalho.

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

**Minhas idéias abstratas,  
De tanto as tocar, tornaram-se concretas.**  
*Vinicius de Moraes*

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	X
<b>LISTA DE TABELAS</b>	XII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	XIII
<b>RESUMO</b>	XIV
<b>ABSTRACT</b>	XV
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	19
<b>2.1. MICOBACTÉRIAS</b>	19
2.1.2. Classificação	20
2.1.3. Micobactérias atípicas	20
2.1.3.1. <i>Mycobacterium fortuitum</i>	22
2.1.3.2. <i>Mycobacterium smegmatis</i>	23
<b>2.2. O ENVELOPE MICOBACTERIANO</b>	23
2.2.1. A membrana plasmática e o arcabouço da parede celular	23
2.2.2. Os elementos livres da parede celular	27
2.2.3. As porinas da parede micobacteriana	30
2.2.4. A cápsula micobacteriana	31
<b>2.3. ESTUDO DAS DROGAS</b>	34
<b>2.3.1. Quinonas</b>	34
2.3.1.1. Estrutura química	34

2.3.1.2. Ocorrência e distribuição	34
2.3.1.3. Atividades farmacológicas e biológicas	35
2.3.1.4. Lapachol	36
2.3.1.5. $\beta$ - Lapachona	37
2.3.1.5.1 Mecanismo de ação	38
<b>2.3.2. ISONIAZIDA</b>	46
2.3.2.1. Atividade antimicobacteriana	46
2.3.2.2. Mecanismo de ação	47
2.3.2.3. Alvos moleculares da isoniazida	48
2.3.2.4. Resistência micobacteriana a isoniazida	50
<b>2.3.3. OXADIAZÓIS</b>	54
<b>2.4 ASSOCIAÇÃO DE DROGAS</b>	55
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	57
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	63
<b>5. CONCLUSÕES</b>	76
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	77
<b>ANEXOS</b>	97

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-</b> Principais ácidos micólicos de micobacterias	25
<b>Figura 2-</b> Parede celular das micobactérias. Visão parcial com ênfase à ligação da micosilarabinogalactana (mAG) ao peptídioglicano(PG)	26
<b>Figura 3-</b> O lipoarabinomanano	29
<b>Figura 4-</b> A cápsula micobacteriana	32
<b>Figura 5-</b> Caracterização da parede celular micobacteriana	33
<b>Figura 6-</b> Diferentes tipos de quinonas	35
<b>Figura 7-</b> Estrutura química do lapachol	37
<b>Figura 8-</b> Estrutura química da $\beta$ -lapachona	38
<b>Figura 9-</b> Reação de Fenton e reação de Haber-Weiss	40
<b>Figura 10-</b> Ação da $\beta$ -lapachona sobre a topoisomerase I	43
<b>Figura 11-</b> ciclo catalítico da topoisomerase II apresentando o estágio em que a $\beta$ -lapachona induz religação de DNA	44
<b>Figura 12-</b> A $\beta$ -lapachona, diretamente, induz E2F1 convertendo um regulador da proliferação em regulador de apoptose por ponto de checagem	45
<b>Figura 13-</b> Estrutura química dos análogos da nicotinamida que apresentam atividade antimicobacteriana	46
<b>Figura 14-</b> Mecanismo de ação da isoniazida e resistência micobacteriana	53
<b>Figura 15-</b> Estruturas químicas dos isômeros oxadiazóis	54
<b>Figura 16-</b> Esquema da metodologia utilizada para determinação da CIM e da CBM da $\beta$ - lapachona, isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol frente ao <i>M. fortuitum</i> e <i>M. smegmatis</i>	60

<b>Figura 17-</b> Cinética bactericida da $\beta$ -lapachona, isoniazida, do derivado 1,2,4-oxadiazol e suas associações frente ao <i>M. fortuitum</i> e <i>M. smegmatis</i>	62
<b>Figura 18-</b> Concentração Inibitória Mínima da $\beta$ -lapachona para o <i>Mycobacterium fortuitum</i>	65
<b>Figura 19-</b> Concentração Inibitória Mínima da $\beta$ -lapachona para o <i>Mycobacterium smegmatis</i>	65
<b>Figura 20-</b> Atividade bactericida da isoniazida, $\beta$ -lapachona e do derivado 1,2,4-oxadiazol hidrazida frente ao <i>M. fortuitum</i>	68
<b>Figura 21-</b> Atividade bactericida da isoniazida, $\beta$ -lapachona e do derivado 1,2,4-oxidiazol hidrazida frente ao <i>M. smegmatis</i>	69
<b>Figura 22-</b> Atividade bactericida da associação $\beta$ -lapachona (B) e isoniazida (I) frente ao <i>M. fortuitum</i>	70
<b>Figura 23-</b> Cinética bactericida da associação $\beta$ -lapachona e isoniazida frente ao <i>M. smegmatis</i>	70
<b>Figura 24-</b> Atividade bactericida da associação $\beta$ -lapachona, e do derivado 1,2,4-oxadiazol hidrazida frente ao <i>M. smegmatis</i>	72
<b>Figura 25-</b> Atividade bactericida da associação $\beta$ -lapachona e do derivado 1,2,4-oxadiazol frente ao <i>M. fortuitum</i>	73
<b>Figura 26-</b> Atividade bactericida da associação isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol hidrazida frente ao <i>M. smegmatis</i>	73
<b>Figura 27-</b> Atividade bactericida da associação isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol frente ao <i>M. fortuitum</i>	74
<b>Figura 28-</b> Atividade bactericida da associação $\beta$ -lapachona, isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol hidrazida frente ao <i>M. smegmatis</i>	75
<b>Figura 29-</b> Atividade bactericida da associação $\beta$ -lapachona, isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol (H) frente ao <i>M. fortuitum</i>	75

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1-</b> Classificação de Runyon para o gênero <i>Mycobacterium</i>	21
<b>Tabela 2-</b> Resultados da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima da $\beta$ -lapachona, isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG: Arabinogalactana

ahpC: alquil-hidroperóxido redutase

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Humana

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CIM: Concentração inibitória mínima

DNA: Ácido desoxirribonucléico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Adquirida

InhA: enoil-ACP redutase

KasA:  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase

KatG: enzima catalase peroxidase

LAM: lipoarabinomananos

LM: lipomananos

$\log_{10}$ : Logaritmo decimal

mAGP: micosilarabinogalactana-peptidioglicano

mAG: micosilarabinogalactana

PG: Peptidioglicano

PI: fosfatidilinositol

PIM: manosídios de fosfatidilinositol

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídio

NAT: N-acetiltransferase

NQO1: Quinona oxidoreductase

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RNA: Ácido ribonucleico

Topo: Topoisomerase

-SH: Tíol

UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro

$\mu\text{g/mL}$ : microgramas por mililitro

v/v: volume/volume

$\mu\text{L}$ : microlitros

## RESUMO

Micobactérias atípicas são organismos saprófitos implicados em um grande número de doenças em pacientes imunocomprometidos. A emergência de cepas multirresistentes e a resistência natural das micobactérias atípicas as drogas antituberculosas clássicas têm encorajado o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade bactericida da  $\beta$ -lapachona, do derivado 1,2,4-oxadiazol, [3-(p-hidroxi-fenil) 1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazida, da isoniazida e suas associações frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis* utilizando como métodos a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Cinética Bactericida. A CIM permitiu determinar a menor concentração das drogas capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo. Através da curva de morte *versus* tempo (Time Killing Curves), foi possível determinar o decréscimo da população microbiana pela enumeração de células viáveis a cada 24 horas por um período de 144 horas utilizando as drogas em suas concentrações inibitórias mínimas. Este estudo forneceu informações que o efeito da associação  $\beta$ -lapachona-isoniazida foi melhor quando comparado com as drogas isoladamente. O derivado 1,2,4-oxadiazol apresentou atividade contra ambos os microrganismos, mas sua atividade não foi acentuada quando combinado com isoniazida e  $\beta$ -lapachona.

## ABSTRACT

Nontuberculous mycobacteria are ubiquitous and saprophytic organisms that have been implicated in a large spectrum of diseases due to immunocompromised patients. Indeed, the emergence of multidrug-resistant strains and the natural resistance of atypical mycobacteria to the classical antituberculous drugs have encouraged researches in order to obtain new chemotherapeutic agents against mycobacteria. The aim of this study was to determine *in vitro* antimycobacterial activities at inhibitory concentrations of  $\beta$ -lapachone, isoniazid, a new hidrazide, 3-(4-hydroxy-phenyl)-[1,2,4]oxadiazole-5 carboxylic acid hidrazide, and their combinations against *Mycobacterium fortuitum* and *M. smegmatis* by the Time-Kill Curve method. This study provided information that the combined effect of  $\beta$ -lapachone-isoniazid was significantly greater than when they were tested separately. The hidrazide had effectiveness against both microorganisms however this activity was not increased in combination with  $\beta$ -lapachone and isoniazid.

## 1. INTRODUÇÃO

---

Doenças causadas por microrganismos do gênero *Mycobacterium* continuam a ser um sério problema. A tuberculose tem ressurgido como um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, uma situação que tem sido maximizada pelo aumento da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos agentes terapêuticos de primeira linha (SEPKOWITZ et al., 1995; CHATTERJEE, 1997; ZUMLA & GRANGE, 2001; GILLESPIE, 2002; GOMES & MCKINNEY, 2004).

Estes fatores induziram um aumento do interesse na avaliação da atividade de uma variedade de drogas com potencial ação antituberculose, novos análogos de drogas existentes, novas combinações de drogas e formulações farmacêuticas (DUNCAN, 2003).

Além do *M. tuberculosis*, as micobactérias atípicas ganharam interesse com o advento da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) a partir de 1980, ocupando um importante lugar entre as infecções oportunistas que acometem os portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) em fase terminal. Essas micobactérias também denominadas não tuberculosas estão presentes em todo ambiente e são implicadas em doenças pulmonares em imunodeprimidos (RODRIGUES et al., 2001; GUÉRARDEL et al., 2003).

Um dos fatores que contribui para a resistência das micobactérias aos quimioterápicos é a estrutura e a baixa permeabilidade da sua parede celular. Essa estrutura é trilaminar e apresenta na parte mais externa um conjunto de moléculas anfipáticas que dificulta a entrada de certos agentes antimicobacterianos na célula (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; BRENNAN, 2003).

É necessário, portanto, a criação de mecanismos pelos quais os fármacos ultrapassem a parede celular e consigam exercer suas ações intracelularmente ou, a pesquisa de quimioterápicos que tenham ação diretamente na parede, uma vez que, ela é fundamental para o crescimento e sobrevivência do microrganismo no hospedeiro

além de apresentar sítios em potencial para ação de drogas (HOFFNER & SVENSON, 1991; CHATTERJEE, 1997).

A deficiência de algum dos componentes da parede celular, especialmente o ácido micólico, arabinogalactana ou peptidoglicano, implica na integridade da parede (MIKUSOVÁ et al., 1995).

Algumas das drogas antituberculosas mais efetivas como isoniazida e etambutol, afetam a biossíntese de ácidos micólicos e arabinano, respectivamente (MIKUSOVÁ et al., 1995).

Pesquisas têm sido realizadas no sentido de identificar novos alvos para drogas na parede celular micobacteriana, uma vez que ela é fundamental para o crescimento celular (CHATERJEE, 1997; JACKSON et al., 2000).

Investigações recentes procuram descrever o mecanismo de regulação gênica e a rota biossintética que envolve a formação dos principais componentes da parede celular micobacteriana. A elucidação desses fatores permitirá a construção racional de fármacos que bloqueiem enzimas responsáveis por passos fundamentais na biossíntese do envelope micobacteriano (SALMAN et al., 1999; NIGOU et al., 2003).

Novos antibióticos e novas formulações vêm sendo estudados a fim de diminuir os efeitos colaterais de agentes antimicobacterianos (BARROW, 1998; QUENELLE et al., 1999; OHKAWA et al., 2002) e aumentar as opções de agentes antimicrobianos contra microrganismos multirresistentes e micobactérias atípicas que se tornaram importantes com o advento da AIDS (RODRIGUES, 2001).

Alguns estudos têm demonstrado um aumento da atividade da isoniazida quando em combinação com alguns agentes oxidantes. De acordo com WANG et al., 1998 e SINGH et al., 2004 esses agentes desempenham importante função no mecanismo de ação da isoniazida.

Em estudo recente, TRAN et al. (2004) demonstraram que as quinonas são drogas ativas contra cepas de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* e *M. avium*. O mecanismo de toxicidade destes compostos está sendo estudado e trabalhos têm sugerido que as quinonas estimulam o estresse oxidativo em sistemas biológicos (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 1995; PORTELA et al., 1996).

Quinonas estimulam a atividade da isoniazida, provavelmente por aumentar a produção intracelular de superóxidos. Recentes trabalhos têm sugerido que a forma inativa da catalase-peroxidase, a enzima que ativa a isoniazida, é convertida a forma ativa na presença de superóxido. Consequentemente, uma maior quantidade de isoniazida ativa pode ser produzida quando esta droga é combinada com compostos que estimulam o estresse oxidativo (BULATOVIC et al., 2002).

A identificação de uma droga com ação antimicrobiana pode ser realizada pelo estudo da Concentração Bactericida Mínima (CBM), da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Cinética Bactericida. Esse conjunto de técnicas é necessário a fim de obter um refinamento na escolha de um bom agente antimicrobiano (LEVISON, 1995).

A CIM caracteriza a menor concentração de droga capaz de inibir o crescimento microbiano visível enquanto que a CBM representa a concentração de droga que elimina 99,99% de microrganismos. Esses parâmetros não descrevem a atividade microbicida do agente ao longo do tempo (CRAIG & EBERT, 1991).

A Cinética bactericida fornece dados dinâmicos da ação do antimicrobiano ao longo do tempo e permite compor gráficos e avaliar se combinações de drogas são eficazes contra o microrganismo em estudo (KROGSTAD & MOELLERING, 1986).

Este trabalho compara a atividade antimicobacteriana *in vitro* da  $\beta$ -lapachona, da isoniazida e do [3-(p-hidroxi-fenil)1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazida, um antimicobacteriano sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, assim como suas associações.

Na parte experimental foi determinado a CIM e a CBM da  $\beta$ -lapachona e isoniazida contra *Mycobacterium fortuitum* e *M. smegmatis*, microrganismos freqüentemente citados como resistentes à terapia antimicobacteriana convencional (SKIEST & LEVI, 1998). Após determinação da CIM e CBM foi realizado o estudo cinético destas drogas isoladas e em associações.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1. MICOBACTÉRIAS

As micobactérias são bactérias Gram positivas aeróbias, pertencentes à família Mycobacteriaceae e ordem Actinomycetales. São bastonetes aeróbios, não móveis, não formam esporos, são retos em culturas novas ou levemente encurvadas em culturas velhas (PITULLE et al., 1992).

Espécies do gênero *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes, pois não são descoloradas por uma mistura de álcool etílico e ácido clorídrico após coloração pela fucsina. Essa propriedade é decorrente da firme fixação da fucsina aos lipídeos da parede micobacteriana (SHINNICK & GOOD, 1994).

Este gênero contém mais de 60 espécies com ampla variedade de tipos nutricionais, com espécies saprófitas, presentes no solo, bem como microrganismos parasitos não cultivados *in vitro*. Os membros patogênicos da família causam duas das infecções mais importantes para os seres humanos, a tuberculose e a hanseníase (FALKNHAM, 1996).

As micobactérias são amplamente distribuídas na natureza e atividades humanas como a agricultura aumenta a presença desses microrganismos no solo. Além disso, sistemas de abastecimento de água fornecem novas superfícies de aderência e crescimento (COVERT et al., 1999).

Ambientes contaminados com resíduos industriais como o tolueno e o benzeno influenciam positivamente na distribuição ambiental desses microrganismos, pois algumas micobactérias são capazes de utilizar esses compostos como fonte de carbono (JESENKÁ et al., 2000).

### **2.1.2. Classificação**

Do ponto de vista médico, as micobactérias são classificadas em três categorias (MINOR & VERON, 1982):

1. Agentes etiológicos da tuberculose humana: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*.
2. Micobactérias não tuberculosas cultiváveis *in vitro* tais como as micobactérias atípicas.
3. Micobactérias não cultiváveis (*M. leprae* e *M. lepraemurium*).

As micobactérias também foram divididas por Runyon em microrganismos de crescimento rápido (3 a 5 dias) e lento (2 a 3 semanas).

Observando-se a pigmentação e o tempo de crescimento, as micobactérias podem ser classificadas em três grupos: as fotocromogênicas que produzem pigmentação apenas na presença de luz, as escotocromogênicas que formam pigmentos na ausência de luz, e as não cromogênicas conforme pode ser observado na tabela 1 (GRANGE, 1996).

### **2.1.3. Micobactérias atípicas**

Micobactérias atípicas ou não tuberculosas ou, ainda, outras micobactérias que não tuberculosas representam um grupo de bactérias que não faz parte do complexo *M. tuberculosis* (FALKNHAM, 1996). São microrganismos comensais ao homem, mas que em condições especiais, podem se tornar patogênicos com manifestações clínicas semelhantes à tuberculose (PORTAELES, 1995).

A apresentação das doenças relacionadas a estas micobactérias é polimórfica e inclui infecções em feridas traumáticas, cirúrgicas, pele, tecidos moles e associados a

cateteres, além de infecções nos pulmões, endocardites e disseminadas (WAYNE & SRAMEK, 1992; HONG et al., 2003).

As infecções ocorrem por inalação dos microrganismos aerossolizados, ingestão de água ou alimentos contaminados, penetração através de mucosas, ferimentos e cirurgia (KULLAVANIJAYA, 1999; ARA et al., 2003).

**Tabela 1.** Classificação de Runyon para o gênero *Mycobacterium* (GRANGE, 1996).

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

Onde: N= não cromogênica, P= fotocromogênica, S= escotocromogênicas

De acordo com CAMPOS (2000), a água é a principal fonte de infecções causadas por *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* e micobactérias aerossolizadas desempenham importante papel no comprometimento pulmonar.

DAILLOUX et al. (1999), apontam a colonização gastrintestinal como fundamental para a infecção dos pacientes com AIDS.

Antes do advento da epidemia da AIDS, doenças causadas por micobactérias atípicas eram pulmonares localizadas, limitadas à pele ou raramente disseminadas. Infecções pulmonares eram encontradas geralmente em homens a partir dos sessenta anos ou trabalhadores expostos à poeira (WOLINSKI, 1979).

Com o advento da AIDS, as doenças micobacterianas não tuberculosas emergiram em toda parte do mundo. O aumento da incidência dessas doenças vem aumentando bastante desde os primeiros casos de micobacterioses em pacientes com AIDS, em 1982 (DAUTZENBERG & MIHALTAN, 1991; SELIK, et al., 1987; CAMPOS, 2000).

### **2.1.3.1. *Mycobacterium fortuitum***

*M. fortuitum*, caracterizado por Gordon e Smith em 1955, apresenta uma alta velocidade de crescimento (3-5 dias) quando comparado com o *M. tuberculosis* (FALKNHAM, 1996). É considerado como microrganismo saprófito e encontrado no meio ambiente e animais de sangue frio. No homem, comporta-se como um comensal, mas pode tornar-se patógeno.

De acordo com GROSSET (1982), o microrganismo apresenta-se como um bacilo de 3  $\mu$ m de comprimento quando cultivado em meio de Lowenstein-Jensen e observado em microscopia ótica. Esses bacilos não formam ramificações e, quando corados pelo método de Gram, são fracamente Gram positivos, exibindo bacilos curtos, finos e filamentosos.

Pacientes infectados com o *M. fortuitum* apresentam sintomas clínicos semelhantes aos da tuberculose (ROITMAN et al., 1993; ESCALONILLA et al., 1998).

Infecções pulmonares, pós-cirúrgicas, urinárias e de córneas são algumas das infecções comumente relacionadas ao *M. fortuitum* (HORSBURGH, 1996; ABSHIRE et al., 2004).

### **2.1.3.2. *Mycobacterium smegmatis***

*M. smegmatis* é um microrganismo de crescimento rápido facilmente isolado do solo e da água com um papel importante na degradação de lipídeos do solo (JESENKÁ, et al., 2000).

Esse microrganismo foi descrito em 1885 por Lustgarten. Quando observados ao microscópio óptico os bacilos apresentam-se com 3 a 5  $\mu\text{m}$  de comprimento e são, ocasionalmente, encurvados. As colônias apresentam-se altas, rugosas e não pigmentadas. Colônias lisas com aspecto cremoso também podem ser visualizadas (SMEUDERS et al., 1999).

Durante a fase de crescimento e estacionária as células de *M. smegmatis* formam aglomerados que aumentam à medida que a escassez de nutrientes dificulta sua sobrevivência (SMEUDERS et al., 1999).

Esse microrganismo tem sido identificado como causador de infecções na pele, tecidos e após introdução de cateter venoso (SKIEST & LEVI, 1998).

## **2.2. O ENVELOPE MICOBACTERIANO**

Nos últimos anos, importantes avanços na elucidação do envelope micobacteriano têm demonstrado que essa estrutura apresenta uma membrana plasmática, a parede celular e uma cápsula. Esse conjunto fornece proteção para a célula e exerce um controle sobre a entrada e saída de substâncias (DAFFÉ & ETIENNE, 1999).

### **2.2.1. A membrana plasmática e o arcabouço da parede celular**

A membrana plasmática constitui a região mais interna do envelope celular, sendo similar às membranas plasmáticas de outras bactérias. Embora seja vital para as

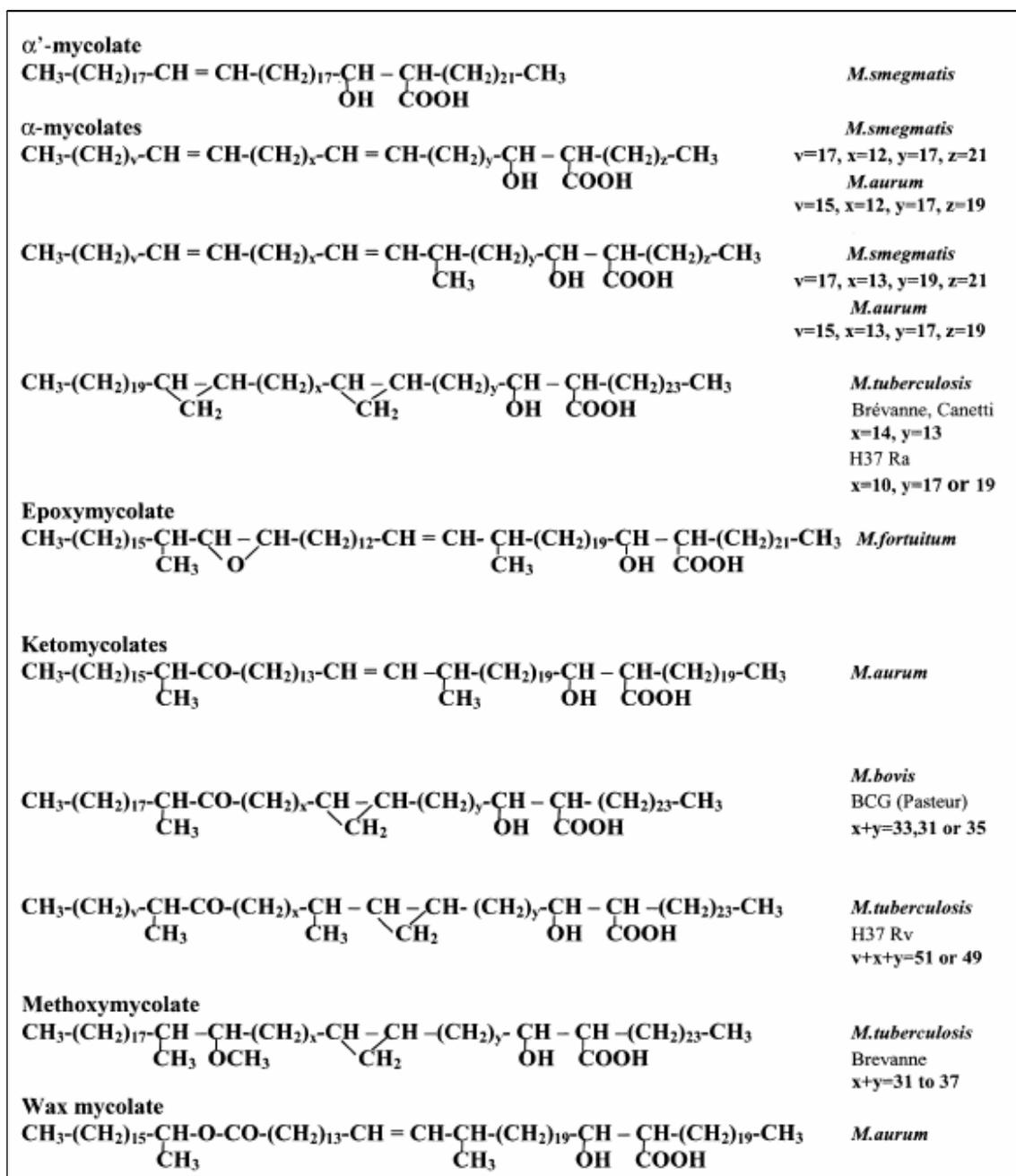
micobactérias, não demonstra função importante nos mecanismos de patogenia da espécie (BRENNAN, 2003).

A membrana micobacteriana é sobreposta por uma complexa estrutura que apresenta os ácidos micólicos, arabinogalactana (AG) e o peptidoglicano como unidades estruturais da matriz da parede celular, além de lipoglicanos e polissacarídeos (BRENNAN & NIKAIKO, 1995; BARROW, 1997). O espaço periplásmico encontrado em bactérias Gram negativas, entre a membrana plasmática e a parede, pode existir nas micobactérias, mas não tem sido observado (DAFFÉ & ETIENNE, 1999).

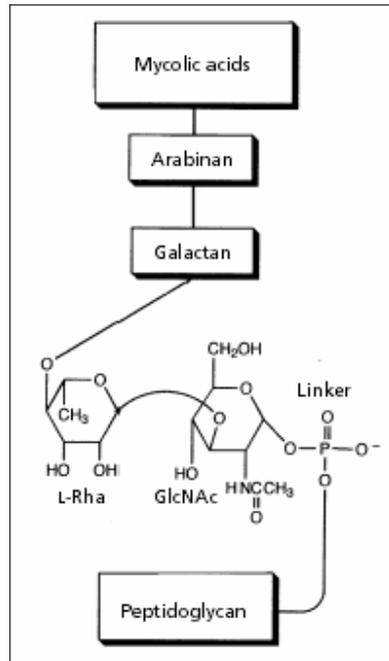
Os ácidos micólicos são moléculas de cadeia longa (70 a 90 carbonos) de ácidos graxos ramificados  $\beta$ -hidroxilados com alto peso molecular. Representam o principal componente da parede (40-60% do peso seco) e são subdivididos em micolatos oxigenados e  $\alpha$ -micolatos. Esses últimos, diferem dos micolatos oxigenados por não apresentarem grupos funcionais oxigenados adicionais ao grupo  $\beta$ -hidroxi. Na figura 1 podem ser vistos os principais ácidos micólicos encontrados em micobactérias (ASSELINEAU et al., 2002; BRENNAN, 2003).

Na parede celular, a maioria dos ácidos micólicos estão ligados covalentemente a arabinogalactana (AG), um polímero raro formado por unidades exclusivas de D-galactofuranose e D-arabinanofuranose. A estrutura formada pelos ácidos micólicos e pela AG é denominada micosilarabinogalactana (mAG), a qual liga-se covalentemente ao peptidoglicano (PG) numa ligação dissacarídeo-fosfato, conforme pode-se observar na figura 2 (MA et al., 1997). Por sua vez, o PG constitui-se de unidades alternadas de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilglicomurâmico (SALMAN et al., 1999).

O PG e o mAG formam o complexo micosilarabinogalactana-peptidoglicano (mAGP), o arcabouço da parede celular micobacteriana. Nessa matriz, os ácidos micólicos encontram-se arrumados de maneira perpendicular ao arabinogalactana-peptidoglicano dando um aspecto de uma bicamada lipídica (MCNEIL & BRENNAN, 1990; CHATERJEE, 1997; BRENNAN, 2003).



**Fig. 1** Principais ácidos micólicos de micobacterias (ASSELINEAU et al., 2002)



**Fig 2.** Parede celular das micobactérias. Visão parcial com ênfase à ligação da micosilarabinogalactana (mAG) ao peptídiglicano(PG) (MA et al., 1997).

### **2.2.2. Os elementos livres da parede celular**

No ambiente lipídico formado pelos ácidos micólicos do complexo mAGP encontram-se o fosfatidilinositol (PI), manosídios de fosfatidilinositol (PIM), lipoarabinomananos (LAM) e lipomananos (LM) além de uma grande quantidade de glicolipídios polares e apolares associados não covalentemente ao arcabouço da parede celular. Ácidos micólicos livres também são encontrados nessa região como fator corda (CHATERJEE, 1997).

O LAM é uma molécula anfipática restrita ao gênero *Mycobacterium*. Está presente no envelope de micobactérias de crescimento rápido (*M. smegmatis*) e espécies patogênicas de crescimento lento (*M. tuberculosis*). A molécula, que se encontra parcialmente embebida nos ácidos micólicos, é o maior lipoglicano da parede celular e apresenta uma heterogeneidade entre as espécies (CHATERJEE, 1997; BRENNAN, 2003).

De acordo com CHATERJEE (1997), o LAM está firmemente, mas não covalentemente ligado na parede celular e sua principal parte encontra-se exposta no exterior.

Segundo NIGOU (2003), o LAM exibe um amplo espectro de resposta imunomodulatória e, apresenta-se como a mais potente molécula não peptídica indutora de resposta imune no hospedeiro.

Essa estrutura compõe-se de três domínios: um ancorador, um polissacarídeo e uma molécula de superfície conforme demonstrado na figura 3 (NIGOU, et al., 2003).

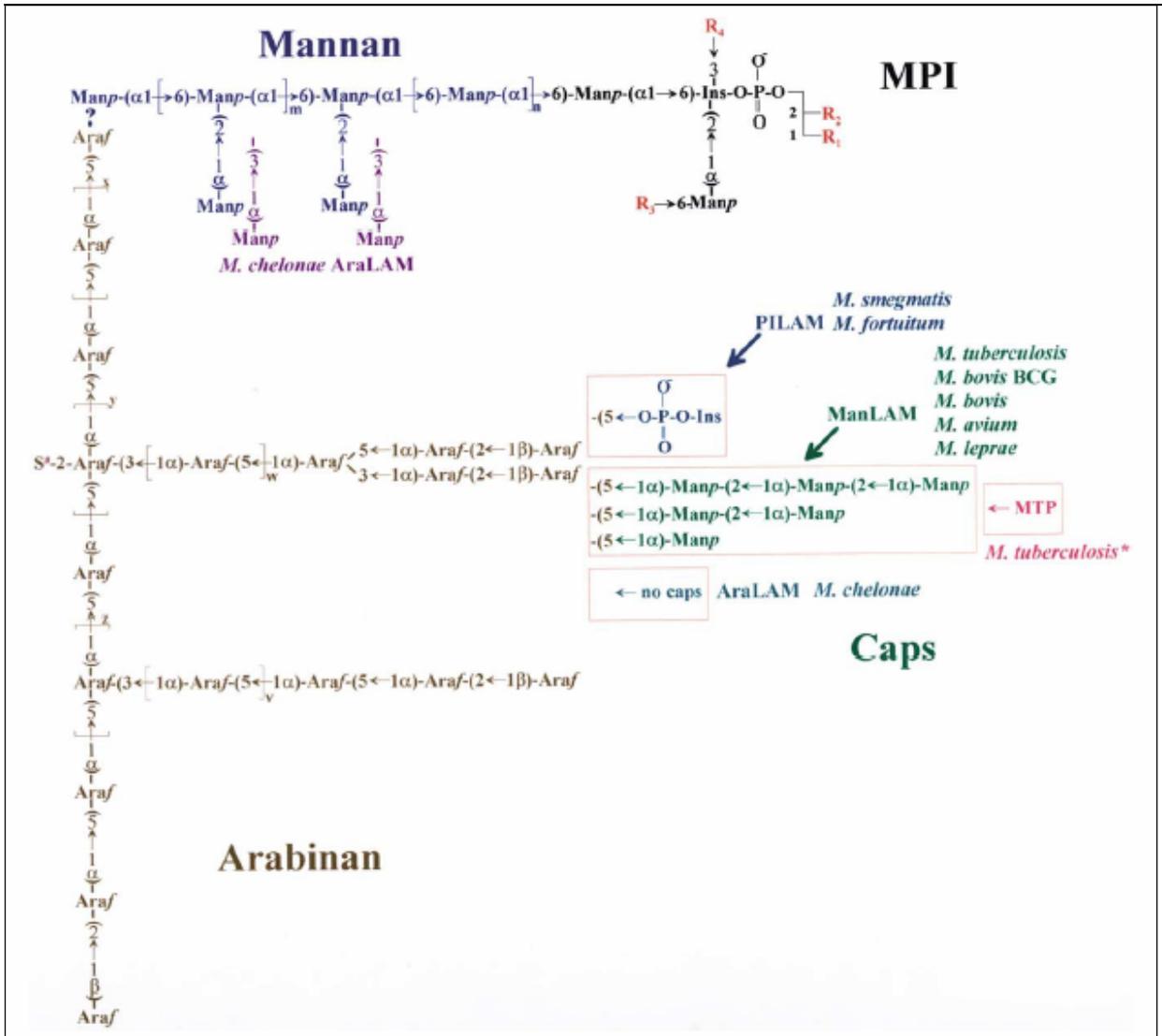
A estrutura do LAM tem como base uma unidade de fosfatidilinositol (PI), o qual é adicionado de resíduos de manopiranoose. Esse ancorador constitui, atualmente, uma família de glicolipídios denominada manosídios de fosfatidilinositol (PIM), que variam de acordo com o grau de glicosilação (NIGOU et al., 2003).

O fosfatidilinositol (PI) é um fosfolipídios encontrado na membrana e na parede celular de micobactérias, é raro em procariotas, mas foi identificado nos gêneros *Mycobacterium*, *Treponema* e em algumas enterobactérias e leveduras (SALMAN et al., 1999).

Vários trabalhos têm demonstrado a importância do PI e manosídeos de fosfatidilinositol (PIMs) na construção da parede celular micobacteriana, pois é evidente que a hiperglicosilação desses elementos originam outros componentes da parede como LM e LAM (CHATERJEE & KHOO, 1998; SALMAN et al., 1999; GUÉRARDEL et al., 2003).

PIM, LM e LAM são importantes fatores de virulência em *M. tuberculosis* e podem mediar resposta imune no hospedeiro. A distribuição comum desses compostos em espécies não-patogênicas e patogênicas sugere também que esses glicolipídios estariam implicados na biogênese da membrana e parede celular de micobactérias (GUÉRARDEL et al., 2003; VILLENEUVE et al., 2003).

O polissacarídeo do LAM é formado por dois homopolissacarídios, D-manana e D-arabinana. Essa região parece conservada entre diferentes espécies (Fig. 3). A D-manana, estrutura muito ramificada, apresenta 30-35 resíduos de manopiranoose (Manp) enquanto a D-arabinana, contém, aproximadamente, 60 unidades de arabinofuranose (Araf). Raramente, ácido succínico pode ser encontrado sobre o LAM (BRENNAN, 2003).



**Fig. 3** O lipoarabinomannano (LAM), descrito por NIGOU et al. (2003). **MTP** corresponde a 5-metilpentose, encontrada em algumas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **S** corresponde a radicais de succinil localizados no ManLAM de *Mycobacterium bovis*. **MPI**, manosídeo de fosfstidilinositol. **Manp**, manopiranoose. **Araf**, arabinofuranose. **Ins**, mioinositol. **R<sub>n</sub>**, grupamentos acil ligados à cadeia de ácidos graxos. ManLAM contém aproximadamente 60 Araf e 50 unidades de Manp.

O LAM pode apresentar diferenças na sua extremidade exposta à superfície. Nesse contexto, ManLAM é caracterizado pela presença de resíduos de manose. Esse tipo de LAM é encontrado em *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis* BCG e *M. avium*. PiLAM apresenta resíduos de fosfoinositol na superfície e tem sido isolado de espécies não tuberculosas como *M. smegmatis* (KHOO et al., 2001; NIGOU et al., 2003). GUÉRARDEL et al. (2003), descreveu uma variedade de LAM (CheLAM) isolado de *M. chelonae* que apresenta tanto resíduos de manose como de fosfoinositol.

Uma diferença entre a parede de micobactérias de crescimento lento e as de crescimento rápido é a presença de galactosamina, a qual está ligada a uma unidade de arabinose da arabinogalactana na matriz da parede celular. Essa molécula tem sido identificada apenas em espécies de crescimento lento (CHATERJEE, 1997).

### **2.2.3. As porinas da parede micobacteriana**

A presença de canais protéicos tem sido evidenciada na parede celular micobacteriana (MUKHOPADHYAY et al., 1997; KARTMANN et al., 1999). Moléculas hidrofílicas difundem-se para o interior da célula através desses canais, enquanto que, compostos hidrofóbicos, utilizam-se da espessa camada lipídica.

Segundo NIEDERWEIS (2003), esses canais protéicos, denominados porinas, desempenham função relevante na nutrição e defesa do gênero *Mycobacterium* contra a acidificação promovida pelos macrófagos do hospedeiro.

Comparando-se com os bastonetes Gram negativos, as porinas do gênero *Mycobacterium* são mais longas, em virtude de uma parede celular mais espessa e se apresentam em uma quantidade até 45 (quarenta e cinco) vezes menor (NIEDERWEIS, 2003). Essa pequena quantidade juntamente com o alto caráter hidrofóbico da parede influencia na baixa permeabilidade das micobactérias aos compostos hidrofílicos (CHATERJEE, 1997).

JARLIER & NIKAIDO (1990), sugeriram que a dificuldade de entrada imposta aos nutrientes hidrofílicos na célula micobacteriana é um dos fatores responsáveis pelo longo tempo de geração desses microrganismos.

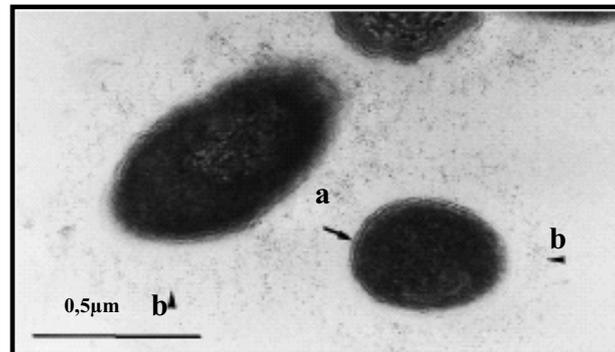
As porinas não apresentam uma estrutura conservada entre as diferentes espécies micobacterianas. Segundo HOWARD & BYRD (2000), a adaptação de micobactérias de crescimento lento, tal como o *M. tuberculosis*, no interior de células hospedeiras, requer mudanças significativas na estrutura das porinas, isso não acontece com microrganismos de crescimento rápido encontrados na água e no solo não considerados patógenos.

#### **2.2.4. A cápsula micobacteriana**

A porção mais externa das micobactérias caracteriza a cápsula conforme observado na figura 4. Uma região que, por vezes, é descrita juntamente com a parede celular. Segundo DAFFÉ & ETIENNE (1999), a divisão do envelope celular em três partes não é simples na prática, uma vez que, muitas substâncias ocorrem tanto no compartimento da parede celular como também na cápsula e na membrana citoplasmática. Ainda, os constituintes dessa região não estão covalentemente ligados na parede.

De acordo com BRENNAN & NIKAIDO (1995), essa camada varia em espessura, densidade eletrônica, aparência (fibrosa, granular ou homogênea) e em constituintes. Segundo DAFFÉ & ETIENNE (1999), essas alterações ocorrem em função da espécie, condições nutricionais e técnicas utilizadas em microscopia eletrônica.

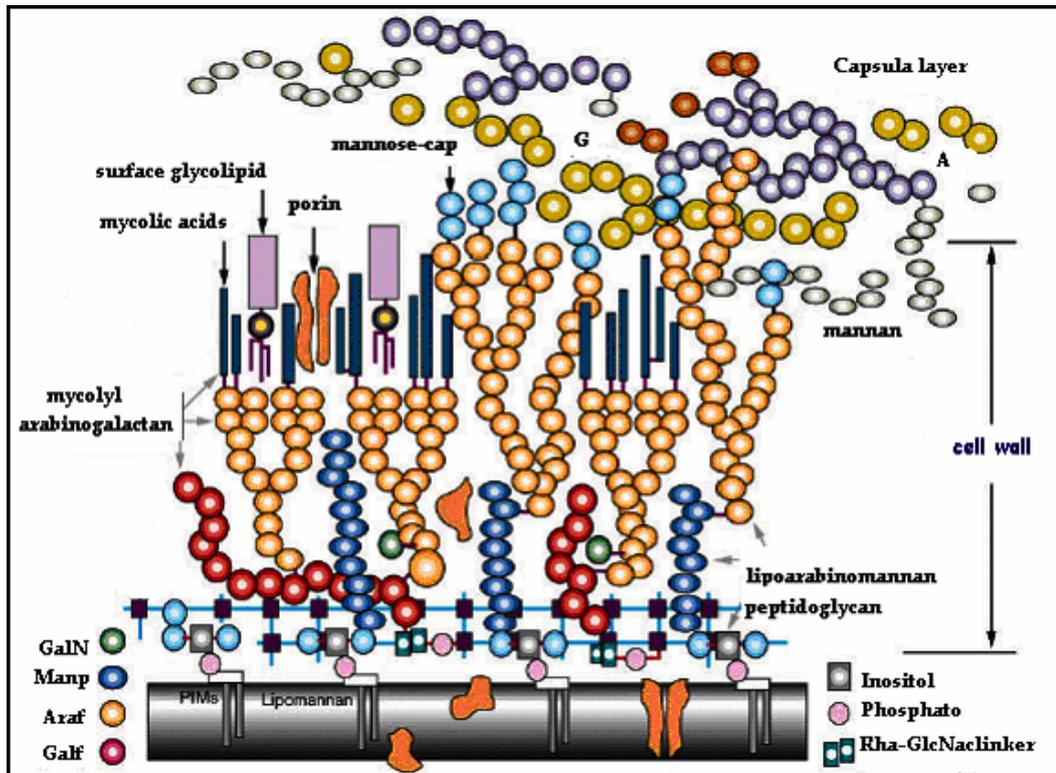
A cápsula constitui a zona de fronteira entre a micobactéria e a célula hospedeira no processo da fagocitose. É, portanto, responsável, em parte, pela indução de repostas imunológicas e a primeira barreira passiva contra a entrada de agentes deletérios na célula (DAFFÉ & ETIENNE, 1999).



**Fig. 4** A cápsula micobacteriana, segundo DAFFÉ & ETIENNE (1999). Esta figura representa uma fina secção de *M. avium* visualizada por microscopia eletrônica de transmissão após incubação com anticorpos de coelho contra a proteína 85, um antígeno secretado pela micobactéria. Os microrganismos apresentam uma fina camada elétrodensa (seta a) que esta sobreposta por uma espessa camada translúcida (setas b) denominada cápsula.

LEMASSU & DAFFÉ (1994) descreveram o material capsular como sendo composto por proteínas, glicana, arabinomanana e manana. Esses dados também foram relatados por ORTALO-MAGNÈ et al. (1996), que também isolaram uma pequena quantidade de lipídios. Adicionalmente, RAYNAUD et al. (1998) identificaram proteínas potencialmente envolvidas na erradicação de radicais livres em filtrados de culturas de patógenos humanos obrigatórios (*M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG) e oportunistas (*M. kansasii* e *M. fortuitum*). Essas enzimas sugerem o início de uma resistência ativa do microrganismo, contra os mecanismos microbicidas dos macrófagos, na cápsula.

Na figura 5 é possível observar a estrutura da parede celular micobacteriana com todos os seus componentes estruturais.



**Fig. 5.** Caracterização da parede celular micobacteriana, segundo CHATEJEE (1997). Micosilarabinogalactana e lipoarabinomannana são os principais constituintes. A cápsula é rica em polissacarídios como glicana, arabinomannana e manana. Os glicolipídios de superfície são bastante variáveis entre as espécies de micobactérias. **G**: glicana, **A**: arabinomannana, **GalN**: galactosamina, **Manp**: manopiranosose, **Araf**: arabinofuranose, **Galf**: galactofuranose, **Rha-GlcNaclinker**: Ligação dissacarídeo-fosfato.

## **2.3. ESTUDO DAS DROGAS**

### **2.3.1. Quinonas**

#### **2.3.1.1. Estrutura química**

Quinonas são compostos orgânicos oriundos da oxidação de fenóis (THOMSOM, 1986).

Na Fig. 6 observa-se que, com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático: Benzoquinonas, um anel benzênico; antraquinonas, um anel antracênico linear ou angular e naftoquinonas, um anel naftalênico. Além disso, variando-se as disposições das carbonilas em um mesmo tipo de anel, pode-se obter diferentes quinonas (SILVA et al., 2003).

#### **2.3.1.2. Ocorrência e distribuição**

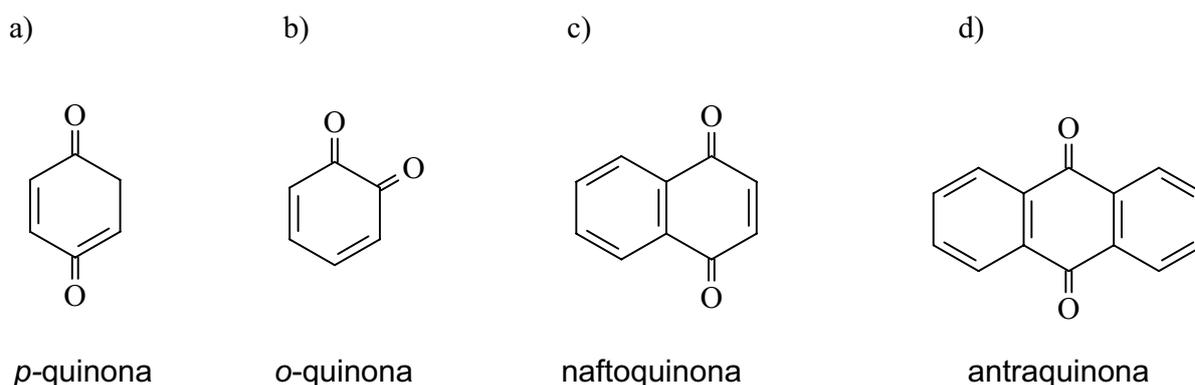
As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural e, as mais representativas, são de vital importância para os vegetais, artrópodes, fungos, líquens, bactérias e algas (THOMSOM, 1986; GIRARD et al., 1988).

Nos últimos anos, foi intensificado o interesse nestas substâncias, não só devido a sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em vários estudos farmacológicos (SILVA et al., 2003).

Mais de 1500 quinonas são conhecidas na natureza encontradas em bactérias, fungos, líquens, gimnospermas e angiospermas (THOMSON, 1991).

A distribuição dessas substâncias nos variados organismos implica, possivelmente, em funções biológicas múltiplas. Na natureza, apresentam-se em importantes etapas do ciclo de vida, são atuantes na fotossíntese (plastoquinonas),

cadeia respiratória (ubiquinonas) e coagulação sanguínea (vitamina K) (SILVA, et al., 2003).



**Fig. 6.** Diferentes tipos de quinonas. (a) e (b), benzoquinonas; (c), naftoquinona (anel naftalênico); (d), antraquinona (anel antracênico) (BRUNETON, 1991).

### **2.3.1.3. Atividades farmacológicas e biológicas**

Algumas quinonas têm um importante papel na defesa das plantas contra insetos e microrganismos (GAFNER et al, 1996).

Diversas quinonas encontradas no lenho de leguminosas são tóxicas para cupins. Na quina (*Cinchona Ledgeriana*) encontram-se antraquinonas em partes da planta infectadas com fungos patógenos. A primina, uma quinona comum em espécies do gênero *Primula*, demonstrou uma ação protetora frente a insetos fitófagos (SPENCER et al., 1986).

O estresse oxidativo que provocam, induzindo a formação de radicais livres, além da ação sobre as topoisomerasas I e II, são os mecanismos de ação responsáveis pelas variadas atividades das quinonas (HEUBER, 1998), como: tripanossomicidas (DOCAMPO et al., 1977, 1978; STOPPANI, 1999; PINTO et al., 2000), bactericidas

(OLIVEIRA, 2001; TRAN et al., 2004), antitumorais (FERNANDEZ et al., 2001; PARDEE et al., 2002) antimalárico (CARVALHO et al., 1988; ANDRADE-NETO et al., 2004), moluscicidas (SANTOS et al., 2001) e antiviral (LI et al., 1993).

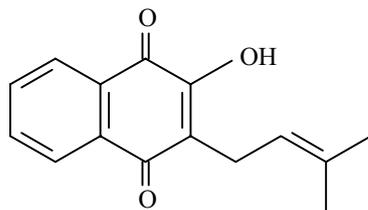
STOPPANI (1999), citou a  $\beta$ -lapachona como inibidora efetiva do crescimento de tripanossomas *in vitro*, incluindo o *Trypanosoma cruzi*, dado observado por DOCAMPO et al. (1978) que, utilizando a  $\beta$ -lapachona numa concentração de 5  $\mu$ g/mL obteve inibição da motilidade das formas epimastigotas desse parasito após 3h de contato e lise celular com aumento do tempo de contato.

GOIJMAN & STOPPANI (1985), também indicaram a  $\beta$ -lapachona como um potente inibidor da biossíntese de macromoléculas em *T. cruzi*.

#### **2.3.1.4. Lapachol**

Este composto destaca-se entre as naftoquinonas naturais. Sua descoberta, a partir do estudo da composição do extrato do lenho da árvore *Tabebuia avellanedae* por Max Siewert nos fins do século XVIII, acompanhados dos estudos de Paternò e Hooker representou uma das mais brilhantes na história da fitoquímica. A presença do lapachol foi posteriormente observada em diversas outras espécies de bigoniaceas (THOMSON, 1986).

Este fármaco (Fig. 7), foi estudado por Lima et al. a partir de 1956 com relação a sua atividade antimicrobiana e antineoplásica. Os resultados demonstraram atividade contra bactérias Gram positivas com extratos etanólicos e cetônicos de amostras de madeira da *Tabebuia avellanedae*. Entretanto, em trabalhos posteriores foi verificado que a atividade antimicrobiana do lapachol purificado reduzia quando comparado à atividade antimicrobiana do produto bruto, levando a suspeita de que outros compostos mais ativos acompanhavam-no (ALMEIDA et al., 1990).



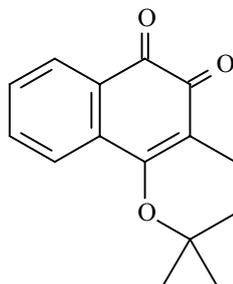
**Fig. 7.** Estrutura química da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-metil-2-butenil)-1,4 naftoquinona (Lapachol) (GUIRAUD et al., 1994).

### **2.3.1.5. $\beta$ -Lapachona**

A  $\beta$ -LAPACHONA (Fig. 8) é uma orto-naftoquinona, isolada da *Tabebuia avelanadae* da família Bigoniaceae ou obtida por tratamento com ácido sulfúrico a partir do lapachol. As investigações recentes sugerem uma potencial aplicação deste fármaco contra numerosas doenças (STOPPANI, 1999; PINTO et al., 2000; SANTOS, 2001).

Este fármaco apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (GUIRAUD et al., 1994; TRAN et al., 2004).

A  $\beta$ -lapachona inibe o crescimento de inúmeros tumores celulares: câncer epidermóide da laringe, próstata, cólon, ovário e mama. Também age em diferentes tipos de células leucemóides, sugerindo um amplo espectro de atividade antitumoral (Li et al., 1995, 2000; FERNANDEZ et al., 2001; GUPTA et al., 2002; PARDEE, 2002).



**Fig. 8.** Estrutura química do 3, 4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naphto (1, 2-b)pirano-5,6-diona ( $\beta$ -lapachona) (PORTELA & STOPPANI, 1996).

Embora a maioria dos estudos cite as naftoquinonas como importantes inibidores tumorais, derivados da  $\beta$ -lapachona e do lapachol também têm sido estudados como antimaláricos e antimicobacterianos (ANDRADE-NETO et al., 2004; TRAN et al., 2004)

Alguns estudos destacam a atividade deste fármaco para utilização na quimioterapia da doença de Chagas (STOPANI, 1999; MOURA et al., 2004) devido, principalmente, ao estresse oxidativo que esse fármaco provoca e a deficiência do *T. cruzi* em enzimas antioxidantes.

#### **2.3.1.5.1. Mecanismo de ação**

Um dos principais interesses sobre quinonas, especialmente a  $\beta$ -lapachona, está no estudo sobre o mecanismo de ação. Diversos trabalhos têm dado ênfase a capacidade da  $\beta$ -lapachona em induzir o estresse oxidativo (ciclo redox), a inibição catalítica sobre as topoisomerasas I e II e, redução a intermediários mais ativos pela quinona oxidorreductase (DOCAMPO et al., 1978; PORTELA et al., 1996; PLANCHON et al., 2001; SILVA et al., 2003).

### **Produção de Radicais livres (ciclo redox)**

As espécies reativas de oxigênio são geradas por fontes ambientais (radiação ultravioleta) ou decorrentes da atividade metabólica dos seres vivos (GRACY et al., 1999). Esses agentes incluem os radicais livres (superóxido e hidroxilas) e espécies não radicalares (peróxido de hidrogênio).

Segundo MATÉS et al. (2000), em células aeróbias, as cadeias transportadoras de elétrons da mitocôndria e retículo endoplasmático são importantes fontes de superóxidos.

Esses agentes oxidantes são capazes de produzir alterações moleculares e não têm apenas propriedades deletérias, pois servem como agentes defensivos quando usados como bactericidas ou parasiticidas além de funcionarem como sinalizadores biológicos (BABIOR, 1997).

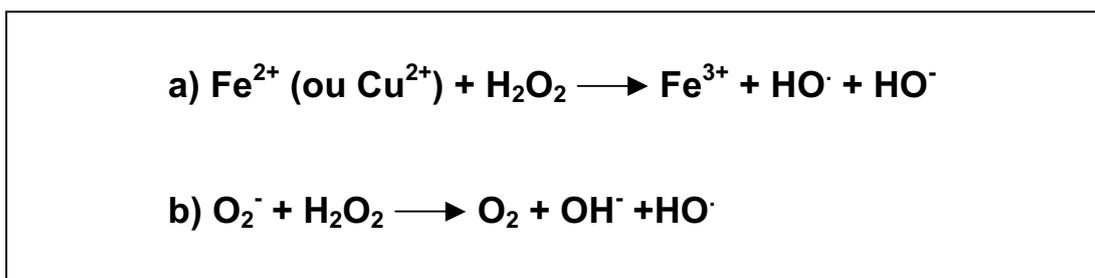
As quinonas, em geral, apresentam a capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células. Assim, o desequilíbrio entre a formação e a remoção de radicais livres no organismo, decorrentes da persistência do processo oxidante, leva à exaustão os mecanismos de defesa como as enzimas catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e as vitaminas E e C, favorecendo lesões em macromoléculas e estruturas celulares que provocam a morte celular (FRIDOVICH, 1998; ROVER JÚNIOR, 2001).

De acordo com SILVA et al. (2003), as enzimas flavinas NADPH citocromo P450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase catalizam a redução de uma quinona com um elétron formando um ânion semiquinona. A semiquinona reduz o oxigênio ao ânion radical superóxido o qual é convertido a peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou por uma reação catalisada por superóxido dismutase. Por sua vez, o  $H_2O_2$  reage com o  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  via reação da Fenton ou com o superóxido via reação de Haber-Weiss produzindo radicais hidroxilas conforme demonstrado na figura 9.

A formação de semiquinonas foi sugerida por DOCAMPO et al. (1978), GOIJMAN & STOPPANI (1985) e RIBEIRO-RODRIGUES et al. (1995) como principal

fator na atividade da  $\beta$ -lapachona frente a cepas de *T. cruzi*, pois espécies reativas de oxigênio danificam a membrana do *T. cruzi*.

A formação de radicais por  $\beta$ -lapachona também foi observada por CRUZ et al. (1978) na inibição de crescimento de *Bacillus subtilis* e *B. stearothermophilus*.



**Fig. 9.** a) Reação de Fenton: O peróxido de hidrogênio reage com o  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  produzindo radicais hidroxilas. O mesmo resultado pode ser obtido via reação de Haber-Weiss (b) sem a participação de metais de transição (MATÉS et al., 2000).

A  $\alpha$ -lapachona, que tem baixa atividade oxidante não apresenta ação tóxica contra tripanossomas, diferentemente da  $\beta$ -lapachona (PORTELA et al., 1996). A ineficácia da  $\alpha$ -lapachona sobre tripanossomas, e a reação de peroxidação que, segundo BABIOR (1997) fosfolípidios e triglicerídios podem sofrer quando expostos a agentes oxidantes, são dados que colaboram com o proposto mecanismo citotóxico da  $\beta$ -lapachona frente a tripanossomas via formação de espécies reativas de oxigênio.

A ação de quinonas também foi estudada sobre a enzima quinona oxidoreductase (NQO1), uma flavoproteína encontrada na maioria dos eucariotas e abundante no fígado da maioria dos mamíferos. Essa enzima reduz as quinonas a hidroquinonas utilizando NADH ou NADPH como doadores de elétrons, um efeito protetor a partir do qual compostos quinônicos são rapidamente excretados (PINK et al., 2000).

A NQO1 também pode reduzir certas quinonas a espécies mais reativas que desencadeiam a formação de radicais livres e danos a macromoléculas tais como lípidios e proteínas com conseqüente morte celular (PINK et al., 2000).

PLANCHON et al. (2001), sugeriram que a atividade enzimática da NQO1 é determinante na citototoxicidade mediada por  $\beta$ -lapachona em células neoplásicas que apresentam uma expressão acentuada da enzima. Em células neoplásicas de seio a  $\beta$ -lapachona apresentou-se ativa, mas sua citototoxicidade foi inibida por dicumarol. O dicumarol compete com NADH ou NADPH, previne a redução de quinonas e aumenta a toxicidade de drogas que são inativadas pela enzima quando reduzidas, tal como ocorre com a menadiona, mas não com as quinonas

### **Ação sobre as enzimas topoisomerases**

As topoisomerases são enzimas que alteram o estado topológico do DNA por quebras transitórias na ligação açúcar-fosfato do DNA. Para manter a integridade do material genético durante este processo, as topoisomerases formam ligações covalentes com a extremidade do DNA criada após a quebra, essas ligações covalentes são uma marca de todas as topoisomerases (BERGER, 1998).

A topoisomerase I (topo I) é uma enzima fundamental para o comportamento normal de qualquer célula. Essa enzima promove um relaxamento do DNA introduzindo um corte numa única fita de DNA (BURDEN & OSHEROFF, 1998; PROMIER et al., 1998). Assim, a topo I funciona, principalmente, durante a transcrição do RNA, replicação do DNA, recombinação genética, encapsulação viral e condensação/descondensação cromossomal (WANG, 1996).

De acordo com OSHEROFF (1998), a topoisomerase II (topo II), diferentemente da topo I, depende de ATP para desempenhar suas funções e age por quebra transitória de uma dupla fita de DNA. Com este mecanismo, a topo II não apenas modula supertorção ou super-relaxamento, mas também pode separar cromossomos filhos que foram formados durante a replicação.

Há substâncias que agem como inibidoras catalíticas das topoisomerases enquanto outras sobre o complexo de clivagem DNA-topoisomerase (camptotecina e topotecan) (PIZZOLATO & SALTZ, 2003).

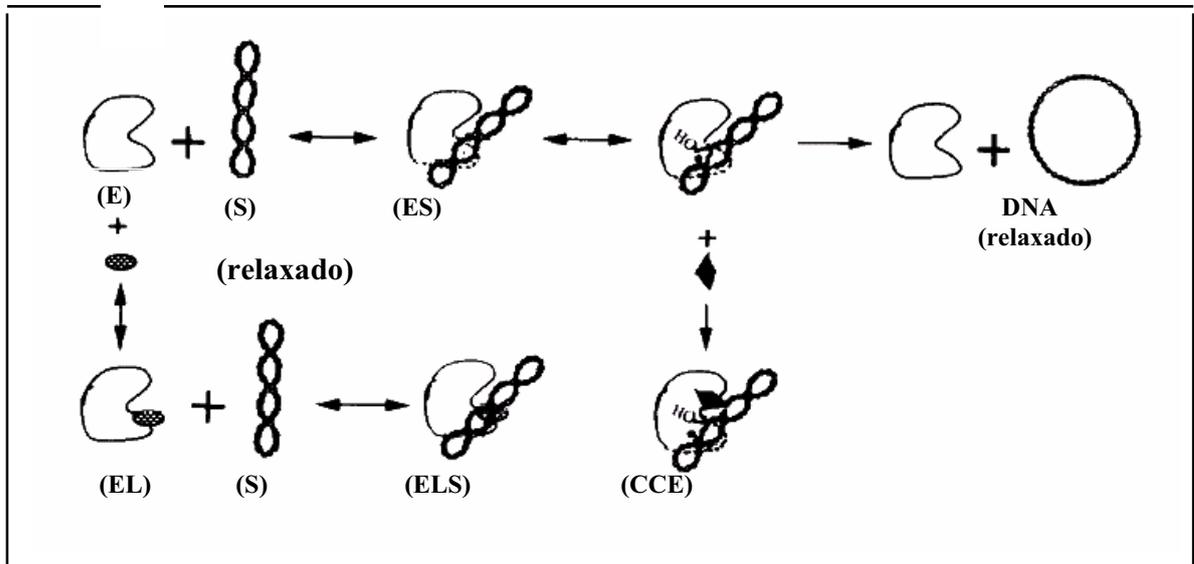
Entre as quinonas, a  $\beta$ -lapachona apresenta uma potente ação frente as topo I e II, sendo a droga modelo para identificar o mecanismo de ação dessa classe de compostos. De acordo com HEUBER et al. (1998), a  $\beta$ -lapachona atua como inibidor catalítico da topo I, uma ação particularmente importante, uma vez que inibidores catalíticos de topisomerases não são freqüentes quando comparados com os estabilizadores do complexo DNA-topoisomerase.

Segundo LI et al. (1993) e FRYDMAN et al. (1997) este fármaco não promove uma ação de relaxamento no DNA, nem se intercala entre as duas fitas de DNA, como ocorre com o brometo de etídio. Uma pré-incubação de DNA com topo I inibe completamente a ação da  $\beta$ -lapachona e o pré-tratamento de topo I com  $\beta$ -lapachona, antes da adição de DNA como substrato, aumenta a atividade inibitória deste composto. Esses dados sugerem uma ação da  $\beta$ -lapachona diretamente sobre a enzima não ligada ao DNA. De outra maneira, a camptotecina, um composto usado para estudos comparativos com a  $\beta$ -lapachona requer, primeiramente, a formação do complexo DNA-topoisomerase I.

A ação direta sobre a topo I, como proposta por LI et al. (1993), é corroborada com KRISHNAN & BASTOW (2001) que sugeriram que a droga não se liga ao DNA.

A inibição da atividade catalítica da topo I *in vitro* também foi observada por PARDEE (2002), mas a concentração da  $\beta$ -lapachona requerida para esta inibição foi acima da concentração necessária para indução de apoptose.

A figura 10 resume o mecanismo de ação proposto por LI et al. (1993) para  $\beta$ -lapachona frente a topo I.

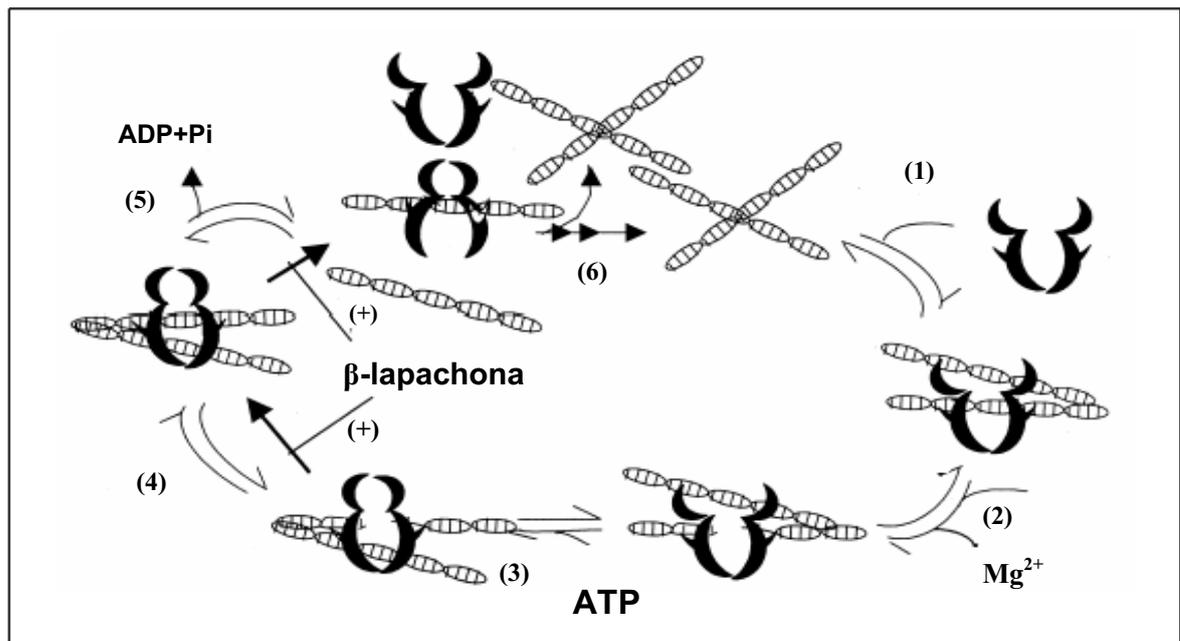


**Fig. 10.** Ação da  $\beta$ -lapachona (L) sobre a topoisomerase I (E). Diferentemente da camptotecina (C), ela age na topoisomerase I livre formando um complexo (EL). A ligação de EL com o DNA (S) forma um complexo cataliticamente inativo (ELS), enquanto a camptotecina forma um complexo de clivagem estabilizado (CCE). A  $\beta$ -lapachona não apresenta atividade após ligação enzima-DNA (ES) (LI et al., 1993).

Além da  $\beta$ -lapachona, outras quinonas, como saintopina e eleuterina, apresentam atividade de inibição catalítica da Topo II. Conforme a figura 11, KRISHNAN & BASTOW (2001) sugeriram que a inibição da atividade catalítica da  $\beta$ -lapachona frente a topo II está na indução da religação do DNA cortado pela enzima antes da dissociação do complexo DNA-Topoisomerase II. Essa indução caracteriza um mecanismo de ação diferente de outros inibidores da topo II (LARSEN et al., 2003).

De acordo com KRISHNAN & BASTOW (2001) a topo II apresenta quinze resíduos de cisteína essenciais à sua atividade os quais podem estar susceptíveis as oxidações pelas quinonas. Isso pode explicar, pelo menos em parte, a ação de quinonas frente a Topo II.

GOIJMAN & STOPPANI (1985) e OLIVEIRA-BRETT et al. (2002), salientam a ação de quinonas frente a moléculas que apresentam o grupo -SH (tiol), resultados que corroboram com KRISHNAN & BASTOW (2001).



**Fig. 11.** Ciclo catalítico da topoisomerase II apresentando o estágio em que a  $\beta$ -lapachona induz religação de DNA (modificado de KRISHNAN & BASTOW, 2001).

### Indução dos pontos de checagem no ciclo celular

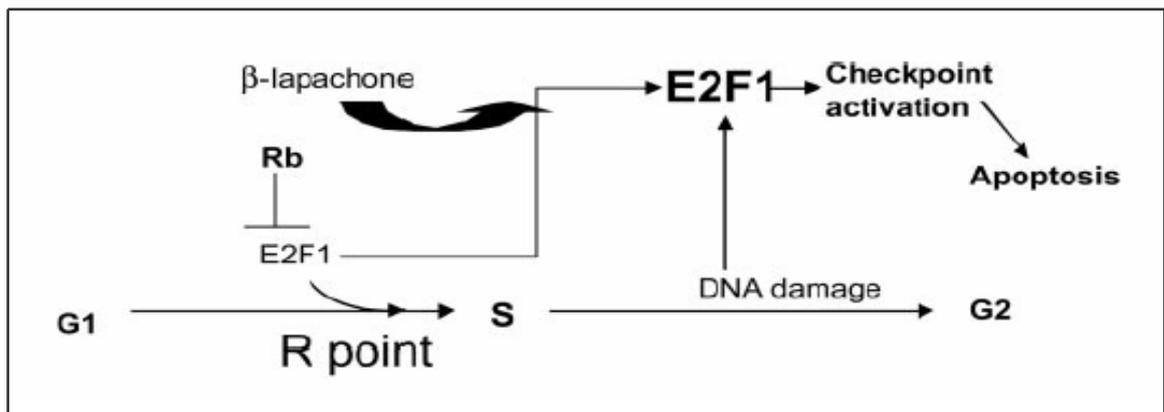
Segundo SILVA et al. (2003), após cada estágio da divisão celular a célula apresenta um período de espera denominado ponto de checagem, no qual faz uma avaliação e confere se o novo conjunto de cromossomos é idêntico ao parental.

Uma avaliação desfavorável põe o processo de divisão a espera de reparo e, caso o dano cromossomal seja irreparável, a célula entra em apoptose. Segundo RICH et al. (2000), células tumorais não apresentam pontos de checagem, isso evita a sua apoptose mesmo tendo ocorrido um acúmulo de danos genéticos, mas TRIMACHI &

LEES (2002) descreveram que algumas rotas que ativam pontos de checagem são mantidas. As E2Fs, formam um desses caminhos preservados e servem como importantes conectores para apoptose.

As E2Fs são proteínas que dirigem a expressão de genes que induzem ou regulam a divisão celular. A E2F1 é um membro dessa família e controla a entrada da célula na fase S do ciclo celular (TRIMARCHI & LEES, 2002). A E2F1 é produzida na fase final de G1 e, segundo JONHSON et al. (1993), uma superexpressão de E2F1 é suficiente para entrada da célula na fase S. De acordo com NAHLE et al. (2002), uma inativação é necessária para célula sair da fase S e entrar na G2. A persistência de E2F1 ativa resulta em apoptose celular.

LI et al. (1999, 2003) propuseram uma ação da  $\beta$ -lapachona por indução de pontos de checagem durante o ciclo celular. Esse fármaco induziu a E2F1 em células cancerosas de pâncreas humano e cólon antes da liberação de citocromo c da mitocôndria, o que sugere o envolvimento de E2F1 na apoptose induzida por  $\beta$ -lapachona. A figura 12 resume o mecanismo apoptótico da  $\beta$ -lapachona proposto por LI et al. (2003).

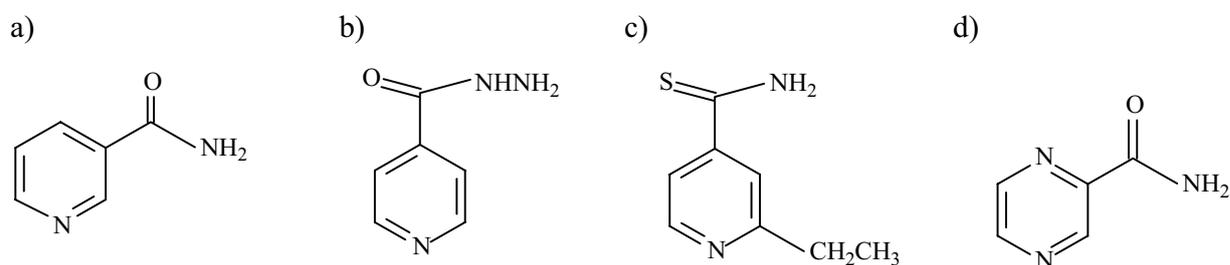


**Fig. 12.** A  $\beta$ -lapachona, diretamente, induz E2F1 convertendo um regulador da proliferação em regulador de apoptose por ponto de checagem (Segundo LI et al., 2003).

### 2.3.2. ISONIAZIDA

A descoberta de que a nicotinamida apresenta efeitos contra o *M. tuberculosis* estimulou a pesquisa de novas drogas estruturalmente relacionadas (Fig. 13). Esses estudos permitiram a descoberta da isoniazida e outros análogos estruturais da nicotinamida como etionamida e pirazinamida (MCKENZIE et al., 1948; MIDDLEBROOK, 1952).

A isoniazida é o mais antigo fármaco sintético utilizado contra micobactérias e foi descrito pela primeira vez em 1912, mas foi considerado um agente antimicobacteriano apenas em 1951 (MIDDLEBROOK, 1952; MIDDLEBROOK et al., 1954). Conforme a figura 13, a isoniazida é uma hidrazida derivada do ácido isonicotínico, um heterocíclo que contém um átomo de nitrogênio. O núcleo piridínico também é observado em substâncias naturais (piridoxina).



**Fig. 13.** Estrutura química dos análogos da nicotinamida que apresentam atividade antimicobacteriana a. nicotinamida, b. isoniazida, c. etionamida, d. pirazinamida (LAMBERT, 2002).

#### 2.3.2.1. Atividade antimicobacteriana

BERSTEIN (1952) demonstrou que a isoniazida exerce ação contra o bacilo da tuberculose. Esse quimioterápico é essencialmente bactericida sobre micobactérias em

fase logarítmica de crescimento e não atua contra micobactérias em fase latente. MDLULI et al. (1998) acrescentaram que a atividade microbiana é limitada as micobactérias.

A sensibilidade do *M. tuberculosis* a isoniazida tem feito desse fármaco o principal quimioterápico de combate à tuberculose ativa. Entretanto, a droga não apresenta os mesmos resultados com as micobactérias atípicas. Os agentes causadores de micobacterioses apresentam uma CIM elevada quando comparados com o *M. tuberculosis* (DUSSURGET et al., 1998; SLAYDEN & BARRY, 2000; TENG & DICK, 2003; MOHAMADE et al., 2004).

#### **2.3.2.2. Mecanismo de ação**

A emergência da tuberculose e micobacterioses devido a cepas multiresistentes e da associação com o HIV resultaram na necessidade de um melhor entendimento do mecanismo de ação da isoniazida, da resistência microbiana e estudo de novos fármacos (HEYM, 1993; MIESEL et al., 1998; CHOUDHURI et al., 1999; MOHAMAD et al., 2004).

A isoniazida é uma molécula hidrofílica que atravessa a parede micobacteriana via canais protéicos denominados porinas (LAMBERT, 2002; MAILAENDER et al., 2004).

TAKAYAMA et al. (1975), demonstraram que durante o contato da isoniazida com células micobacterianas a viscosidade do citoplasma aumenta, entretanto, o volume celular se mantém inalterado. Além disso, componentes estruturais do envelope micobacteriano são facilmente extraídos após contato da bactéria com o fármaco (DAVIDSON & TAKAYAMA, 1979; ASSELINEAU et al., 2002).

Micobactérias expostas a isoniazida acumulam ácidos graxos saturados de cadeia alifática com 24 a 26 carbonos precursores de ácidos micólicos. O acúmulo de intermediários de moléculas importantes da parede celular resulta em alterações ultra-

estruturais (BARDOU et al. 1996; SOUSA, 2001), perda da integridade da célula e lise (VILCHEZE et al., 2000).

Essas pesquisas têm demonstrado a inibição da síntese de ácidos micólicos e, conseqüentemente da parede celular, como o fator principal na morte de micobactérias (QUÉMARD et al., 1991; QUÉMARD et al., 1995; HEATH et al., 2001).

### **2.3.2.3 Alvos moleculares da isoniazida**

A isoniazida é uma pró-droga ativada no interior da célula micobacteriana por uma catalase-peroxidase (KatG). A importância dessa enzima na ativação do fármaco foi confirmada por ZHANG et al. (1992).

Esse mecanismo de ativação bem como a identificação dos alvos moleculares para a forma ativa é motivo de estudos para o desenvolvimento de análogos menos tóxicos para o homem e mais potentes contra micobactérias, principalmente contra microrganismos resistentes (HEYM et al., 1993; MOHAMAD et al., 2004).

O alvo de um fármaco é um substrato, freqüentemente uma enzima a qual a droga se liga, inibi e altera o metabolismo celular com conseqüências letais para a célula (LARSEN et al., 2002).

Especulações sobre a forma ativa da isoniazida variam desde a produção de radicais livres com alvos não específicos a metabólitos com alvos direcionados (SHOEB et al., 1985; WANG et al., 1998; LEI et al., 2000; SLAYDEN & BARRY, 2000).

Espécies oxidantes produzidas durante a ativação da isoniazida agem de maneira inespecífica contra ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e carboidratos (DUSSURGET & SMITH, 1998).

Micobactérias são mais sensíveis a isoniazida quando esse fármaco é utilizado em combinação com agentes oxidantes. Esses estudos sugerem que espécies oxidantes têm uma importante função nos efeitos tóxicos da isoniazida, inclusive, na ativação do fármaco (WANG et al., 1998; WENGENACK & RUSNAK, 2001; BULATOVIC et al., 2002).

Em recente trabalho, SINGH et al. (2004) descreveram que a KatG catalisa a oxidação de NADH a  $\text{NAD}^+$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou radical superóxido. Essa enzima também é responsável pela síntese do isonicotinoil-NAD, a forma ativa da isoniazida. Segundo os autores, a atividade de catalase e peroxidase acontece de forma independente das reações de formação da forma ativa da isoniazida.

É sugerido que a forma ativa da isoniazida tem como alvo primário a enoil-ACP redutase (InhA), a enzima que catalisa uma etapa primária na síntese de ácidos graxos de cadeia longa (MARRAKCHI et al., 2000; NGUYEN et al., 2001; RAWAT et al., 2003; KREMER et al., 2003). A sua alta afinidade pela InhA é consistente com a sensibilidade (CMI de 0,01-0,02) do *M. tuberculosis* à isoniazida (LEI et al., 2000).

BANERJEE et al. (1994) observaram que cepas de *M. smegmatis* mutantes no gene que codifica a InhA apresentavam resistência a isoniazida (CIM maior que 50  $\mu\text{g/ml}$ ), enquanto isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes apresentavam uma CIM de 1-5  $\mu\text{g/ml}$ . De acordo com LEI et al. (2000), essa diferença no grau de resistência entre as duas espécies pode ser devido à variação na seqüência de aminoácidos da InhA entre as duas espécies que têm uma falta de identidade correspondente a 11,7% dos aminoácidos.

SLAYDEN & BARRY (2000) também citaram que o mecanismo de regulação do estresse oxidativo, a velocidade de síntese dos componentes da parede celular e a concentração da enzima catalase-peroxidase são diferentes entre o *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*.

Outros estudos têm contestado a InhA como alvo primário para isoniazida e citam a  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase (KasA) como o principal alvo do fármaco (MDLULI et al., 1996; BARRY, 2001).

A  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase (KasA) está envolvida na síntese de ácidos micólicos. A KasA, diferentemente da InhA, é mais expressada após tratamento com isoniazida em resposta a uma diminuição na síntese de micolatos. Isso tem sugerido que sua atividade está diretamente ligada aos níveis de ácidos micólicos na célula. (MDLULI et al., 1998; SLAYDEN & BARRY, 2000).

SLAYDEN et al. (2000) sugeriram que KasA e InhA são alvos da isoniazida, mas a KasA é o alvo primário, uma vez que, uma acentuada expressão de KasA conferiu uma resistência cinco vezes maior em relação ao controle, enquanto a InhA conferiu baixa resistência em *M. tuberculosis*.

Muitos efeitos bioquímicos da isoniazida são idênticos aos efeitos observados pela tiolactomicina, uma droga inibidora de KasA, mas que apresenta efeitos intracelulares distintos do triclosan, um inibidor de InhA. Ainda, micobactérias que apresentam resistência a tiolactomicina são mais resistentes a isoniazida quando comparadas àquelas resistentes ao triclosan (SLAYDEN et al., 2000).

Entretanto, LARSEN et al. (2002), concluíram que uma acentuada expressão de InhA, mas não de KasA, conferiu resistência a isoniazida e a etionamida (resistência cruzada) em *M. smegmatis*. A resistência foi diretamente relacionada aos níveis de RNA mensageiro da InhA.

O complexo modo de ação da isoniazida ainda não está completamente entendido e os resultados publicados divergem quanto ao alvo primário e a forma ativa da isoniazida.

#### **2.3.2.4 Resistência micobacteriana a isoniazida**

A combinação de drogas para o tratamento de infecções micobacterianas tem se mostrado eficaz contra cepas sensíveis. Entretanto, a resistência micobacteriana aos fármacos atualmente utilizados na terapia tem sido relatada em diversas partes do mundo (SILVA et al., 2001; ZUMLA & GRANGE, 2001; CARDOSO et al., 2004; HERRERA et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2004).

A resistência a um determinado quimioterápico é definida como a habilidade de um microrganismo crescer na presença de uma elevada concentração de droga. Microrganismos resistentes apresentam um aumento da concentração inibitória mínima (TENG & DICK, 2003).

O tratamento inadequado de pacientes infectados com micobactérias é o principal fator de risco para a seleção de cepas resistentes. Estudo realizado por SILVA et al. (2001) apresentou um maior número de cepas resistentes entre pacientes com prévio tratamento de tuberculose.

Quatro diferentes mecanismos de resistência têm sido descritos em micobactérias: resistência intrínseca da parede celular (NIKAIDO, 1994), bloqueio da ativação do fármaco (ZHANG et al., 1992), aumento da expressão de enzimas (PAYTON et al., 1999) e inativação da forma ativa (SANDY et al., 2002).

A parede celular micobacteriana apresenta uma baixa permeabilidade devido à alta hidrofobicidade e a pequena quantidade de canais protéicos. Essas duas características da parede conferem resistência intrínseca as micobactérias contra antibióticos e ajudam na defesa frente à acidificação promovida por macrófagos (NIKAIDO, 1994; NIEDERWEIS, 2003).

A resistência intrínseca de micobactérias também tem sido atribuída à velocidade de ativação da isoniazida no interior da célula. De acordo com MDLULI et al. (1998), apesar do *M. avium* ser cem vezes mais resistente a isoniazida que o *M. tuberculosis* a velocidade de entrada desse fármaco nas duas espécies é semelhante, porém, a conversão da droga na sua forma ativa é quatro vezes maior no *M. tuberculosis*. Esse dado sugere que outros fatores de resistência intrínseca estão envolvidos além da parede celular.

A ausência da KatG em micobactérias induz resistência a isoniazida por bloquear a ativação do fármaco. Esse fato tem sido descrito como o principal mecanismo de resistência a isoniazida (MUSSER et al., 1996; ROSSETTI et al., 2002). Entretanto, sabe-se que a catalase-peroxidase é uma enzima importante para sobrevivência da célula, principalmente no interior de macrófagos (SLAYDEN & BARRY, 2000).

A ausência da catalase-peroxidase é acompanhada por um aumento da expressão da alquil-hidroperóxido redutase (ahpC), uma enzima capaz de inativar peróxidos orgânicos. Essa compensação tem sido sugerida como importante fator para defesa de micobactérias deficientes em catalase-peroxidase (SHERMAN et al., 1996).

Apesar das discussões sobre o alvo primário da isoniazida ativa ser a InhA ou a KasA, pesquisas sugerem a resistência micobacteriana por aumento da expressão dessas duas enzimas (LARSEN et al., 2002; SLAYDEN & BARRY, 2002).

A InhA, KasA e KatG são os principais responsáveis pela resistência micobacteriana, mas nem todas as micobactérias resistentes apresentam alterações nessas enzimas. Isso sugere o envolvimento de outros mecanismos ainda desconhecidos (SLAYDEN & BARRY, 2002)..

De acordo com MIESEL et al. (1998), a deficiência de NADH desidrogenase, uma enzima importante na cadeia respiratória, é freqüentemente encontrada em cepas de *M. smegmatis* resistentes a isoniazida. Essa alteração também confere baixos níveis de resistência a etionamida.

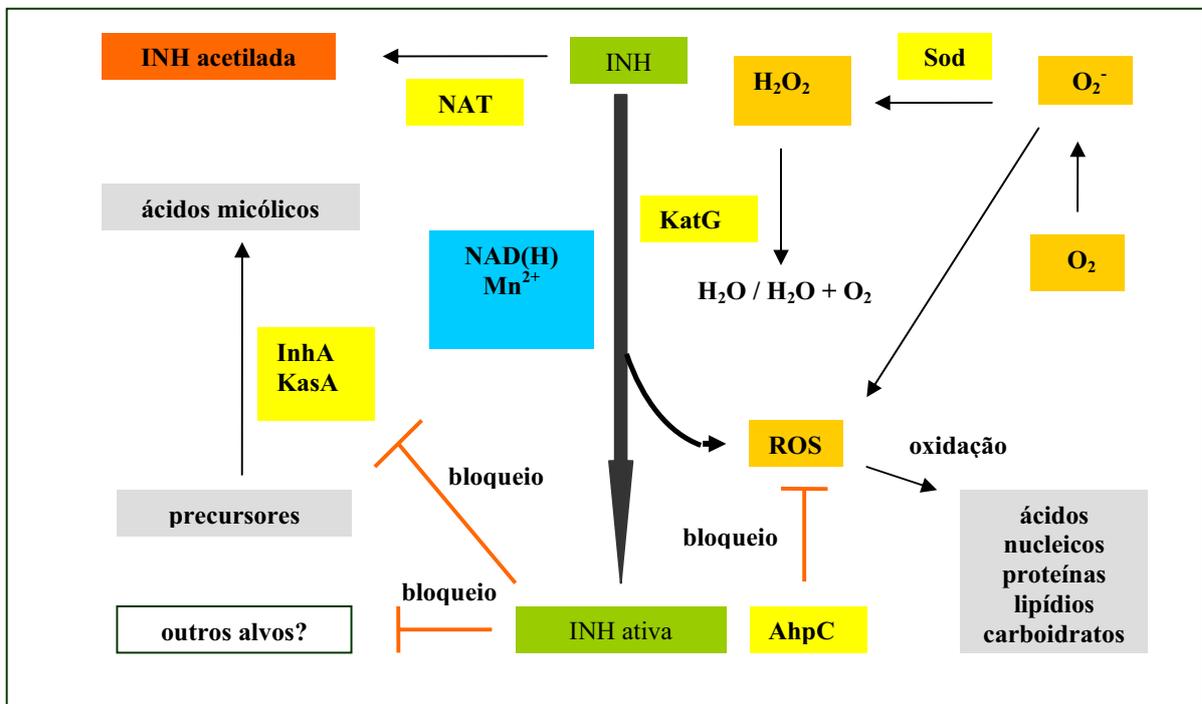
Segundo MIESEL et al. (1998), provavelmente, a deficiência de NADH desidrogenase aumenta os níveis intracelulares de NADH o qual interfere com a ativação do fármaco pela KatG ou compete com a forma ativa pelo sítio ativo da InhA.

A N-acetiltransferase (NAT), uma enzima também requerida para síntese de ácidos micólicos, tem sido estudada como uma provável contribuinte para a resistência entre isolados clínicos de micobactérias. Essa enzima tem sido descrita em *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG e *M. avium* (SANDY et al., 2002; ANDERTON et al., 2004).

Segundo BHAKTA et al. (2004), a NAT é essencial para a síntese de ácidos micólicos, lipídios complexos e glicolipídios em *M. bovis* BCG e a perda de sua função é letal para micobactérias no interior de macrófagos.

A NAT inativa a isoniazida por acetilação (UPTON et al., 2001). BHAKTA et al. (2004), citaram que há uma competição *in vitro* entre a NAT e a KatG pela isoniazida, logo, uma expressão acentuada da NAT poderia diminuir os níveis de isoniazida ativa.

A figura 14 resume as atividades da isoniazida no interior de uma célula micobacteriana e os possíveis mecanismos de resistência desenvolvidos pela célula.

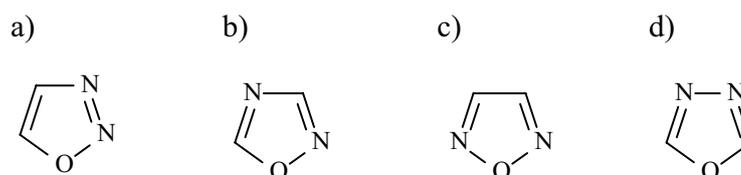


**Fig. 14.** Mecanismo de ação da isoniazida e resistência micobacteriana. Sod: superóxido dismutase, **KatG**: catalase-peroxidase, **NAT**: N-acetiltransferase, **AhpC**: alquil-hidroperóxido redutase, **InhA**: enoil-ACP redutase. **KasA**:  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase e **ROS**: espécies reativas de oxigênio (MAGLIOZZO & MAREINKEVICIENE, 1997; WANG et al., 1998; NGUYEN, 2001; SANDY et al., 2002; RAWAT et al., 2003; SINGH et al., 2004)

### 2.3.3 OXADIAZÓIS

O núcleo oxazolidínico tem despertado o interesse de pesquisadores devido as suas propriedades farmacêuticas como antipasmódico, dilatador coronário, anestésico local, sedativo, antiinflamatório, analgésico e anti-helmíntico (LEITE et al., 1999, 2000; SRIVASTAVA et al., 2003).

São quatro os isômeros oxadiazóis (Fig. 15), mas os anéis 1,2,4-oxadiazol e 1,3,4-oxadiazol têm apresentado os melhores resultados farmacológicos (SANTOS FILHO, 2002).



**Fig. 15** Estruturas químicas dos isômeros oxadiazóis, 1,2,3-oxadiazol (a); 1,2,4-oxadiazol (b); 1,2,5-oxadiazol (c); e 1,3,4-oxadiazol (d) (VICENTE, 2003).

A atividade antimicrobiana dos derivados oxadiazóis também tem sido observada. SAHIN, et al. (2002) descreveram oxadiazóis ativos contra cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* com a CIM entre 64-256  $\mu$ g/ml. GEZGINCI et al. (2001) obtiveram 1,2,4-oxadiazóis com atividade contra *M. tuberculosis*.

Trabalho realizado por SANTOS FILHO (2002) com uma série de novos derivados 1,2,4-oxadiazol-acil-hidrazona demonstrou que o [3-(4-hidroxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-acil-hidrazina (H) apresentou atividade frente ao *M. fortuitum*, *M. smegmatis* e *M. phlei*. Esse composto apresentou halos de inibição de 35 mm para o *M. fortuitum*, 30 mm para o *M. phlei* e 16 mm para o *M. smegmatis* nos testes de atividade

utilizando-se o método de Kirb-Bauer. Posteriormente, VICENTE (2003), encontrou valores de CIM de 25 a 50  $\mu\text{g/ml}$  para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, respectivamente.

## 2.4 ASSOCIAÇÃO DE DROGAS

O tratamento urgente de infecções graves não diagnosticadas, infecções polimicrobianas, o risco de seleção de mutantes resistentes, o aumento do efeito microbicida e a diminuição de doses tóxicas são os fatores que incentivam a utilização de combinações de drogas para o tratamento de infecções (KROGSTAD & MOELLERING, 1986).

O tratamento de infecções micobacterianas requer o uso de drogas que não são comumente usados em infecções por outras bactérias. As micobactérias não são eliminadas rapidamente por agentes microbicidas e a terapia utiliza-se de múltiplas drogas por períodos prolongados. Esses fatores tornam necessário o monitoramento de possíveis efeitos tóxicos das drogas utilizadas e da falta de aderência por parte do paciente ao tratamento (NUERMBERGER & GROSSET, 2004).

A CIM e a CBM são parâmetros utilizados para verificar a ação de um agente frente a um determinado microrganismo. A CIM corresponde a menor concentração da droga que não permite o crescimento microbiano visível de inóculos padronizados, após exposição a uma série de diluições da droga e incubação por 18 a 24 h a 35-37°C. A CBM é a menor concentração da droga que reduz um inóculo microbiano em 99,99% (CRAIG & EBERT, 1991).

A CIM e a CBM são técnicas utilizadas para a seleção de drogas para uso clínico e quantifica a atividade de um antibiótico frente a um agente infeccioso (NICOLAU, 2003)

O sucesso de um tratamento antimicrobiano depende não somente da interação entre o patógeno, droga e hospedeiro, mas também do bloqueio no surgimento da resistência microbiana (NICOLAU, 2003).

Entretanto, com esses parâmetros é possível apenas definir se a droga elimina ou não o microrganismo, é impossível avaliar a extensão da ação bactericida ao longo do tempo ou os efeitos de variação no tamanho de inóculos e concentração do fármaco (LI, 2000).

Essas informações podem ser obtidas pela cinética bactericida a qual descreve a ação do fármaco ou a ação de associações de drogas ao longo do tempo de contato. Assim, pode-se avaliar o andamento e extensão da ação bactericida quantificando-se em intervalos regulares de tempo o número de células viáveis durante a exposição do microrganismo as concentrações farmacológicas da droga ou de associações de drogas (LI & ZHU, 2002).

Com os dados obtidos durante o contato do microrganismo com as drogas é possível fazer uma curva de morte *versus* tempo a qual consiste de uma fase *lag*, uma fase *log* e a fase de recrescimento (LI, 2000).

O tempo requerido para penetração do antimicrobiano dentro da célula caracteriza a fase *lag* enquanto que a fase *log* refere-se à medida quantitativa para a intensidade do efeito bactericida. Uma fase de recrescimento pode ser observada e caracteriza a habilidade do microrganismo em resistir ao ataque da droga (LI, 2000).

### 3. MATERIAIS E MÉTODO

---

#### 3.1. Microrganismos

Os estudos da CIM, CBM e Cinética bactericida foram realizados com dois isolados clínicos de micobactérias atípicas: *M. fortuitum* e *M. smegmatis* que pertencem ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos da UFPE.

#### 3.2. Meios de cultura

O meio para manutenção do microrganismo foi o de Lowenstein-Jensen (Bio-Merieux). Para experimentação, os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller-Hinton (Oxoid) suplementado com 0,1% de tween 80 (Merck) e meio sólido de Mueller-Hinton (Oxoid).

#### 3.3. Preparação e padronização do inóculo

A partir das culturas mantidas em meio sólido de Lowenstein-Jensen foram preparadas culturas em meio líquido de Mueller-Hinton contendo 0,1% v/v de Tween 80. *M. fortuitum* e *M. smegmatis* foram incubados por um período de 120 h a 37°C, originando assim, culturas primárias. Estas culturas primárias foram diluídas em novo meio de Mueller-Hinton e incubadas por 72 h a 37°C. Após incubação, as culturas foram diluídas em meio caldo de Mueller-Hinton a fim de obter um inóculo padronizado em  $10^6$ UFC/mL.

### **3.4. Preparação das soluções estoque das drogas**

As soluções estoque das drogas de concentração equivalente a 2560  $\mu\text{g/mL}$  foram preparadas a partir de suas substâncias de referência; isoniazida a 98% de pureza (LAFEPE),  $\beta$ -lapachona a 100% de pureza (Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco) e do derivado 1,2,4-oxadiazol a 100% de pureza, sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE sobre a responsabilidade do Professor Ivan da Rocha Pitta.

A isoniazida foi diluída em água destilada esterilizada, a  $\beta$ -lapachona foi diluída em um sistema composto de água e propilenoglicol (1:1) e o derivado 1,2,4-oxadiazol em um sistema formado por DMSO, Tween 80 e água destilada esterilizada (1:1:48).

### **3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

#### **3.5.1. Enumeração inicial da cultura**

A partir do inóculo padronizado em  $10^6$  UFC/mL foram realizadas diluições seriadas que variaram de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . Para tanto, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um tubo contendo 4,5 mL de água destilada esterilizada. Cinco alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram inoculadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton e incubadas. Após 72 h de incubação foi realizada uma enumeração e o resultado expresso em UFC/mL.

### **3.5.2. Diluição seriada dos fármacos**

As soluções estoque dos fármacos foram diluídas sucessivamente a fim de obter uma série de diluição de razão dois que variaram de 2560 a 5  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.5.3. Exposição dos microrganismos às drogas**

Uma alíquota de 0,5 mL de cada uma dessas soluções seriadas de fármaco foi transferida para tubos contendo 4,5 mL de caldo Mueller-Hinton, com o microrganismo padronizado. Assim, as concentrações finais dos fármacos nos tubos variaram de 256 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . No tubo controle foi utilizado 0,5 mL de água destilada esterilizada. Tubos controle, contendo apenas os microrganismos e os sistemas de solventes utilizados na diluição do derivado 1,2,4-oxadiazol e  $\beta$ -lapachona foram incorporados aos testes para averiguar possíveis efeitos intrínsecos dos diluentes sobre os microrganismos. Os tubos foram incubados por 72 h a 37°C (Fig. 16).

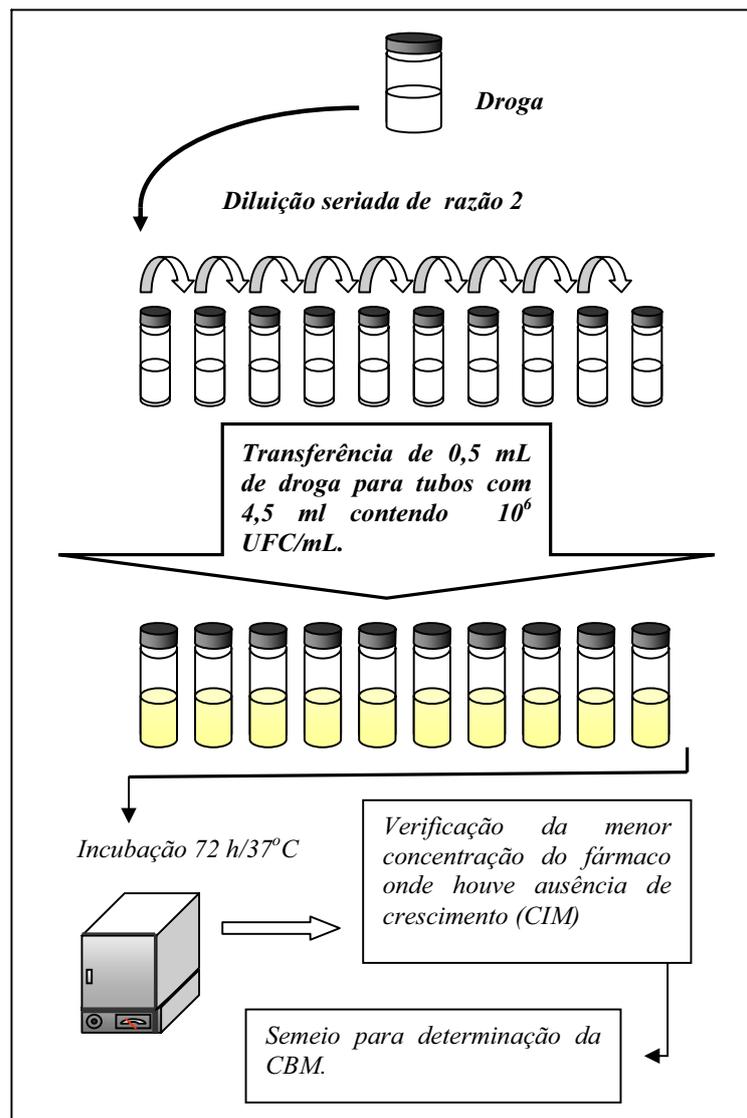
### **3.5.4. Leitura**

Após a incubação, a menor concentração de droga, na qual houve ausência de crescimento visível, foi considerada como a concentração inibitória mínima (CIM).

### **3.6. Determinação da CBM**

A partir do tubo no qual não houve crescimento visível do microrganismo, foi feito semeio em placas contendo ágar Mueller-Hinton. Cinco alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada tubo foram semeadas. As placas foram incubadas a 37°C por 72 h. A CBM foi definida pela diluição da droga onde houve sobrevivência de 0,01% de microrganismo (Fig. 16).

Todos os resultados foram obtidos em triplicata e foram expressos pela média e desvio padrão. A CIM e a CBM do derivado 1,2,4-oxadiazol foi anteriormente determinada por VICENTE (2003).



**Fig. 16.** Esquema da metodologia utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima da  $\beta$ -lapachona, isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.

### **3.7. Cinética bactericida**

A atividade bactericida do derivado 1,2,4-oxadiazol-hidrazida, da isoniazida, da  $\beta$ -lapachona e suas associações foi determinada pela técnica das cinéticas bactericidas. A técnica consiste em determinar por enumeração das unidades formadoras de colônias o número de bactérias sobreviventes de um inóculo previamente padronizado exposto as concentrações conhecidas de drogas, em função do tempo (KROGSTAD & MOELLERING, 1996). As concentrações das drogas utilizadas no experimento foram iguais as CIMs, previamente estabelecidas.

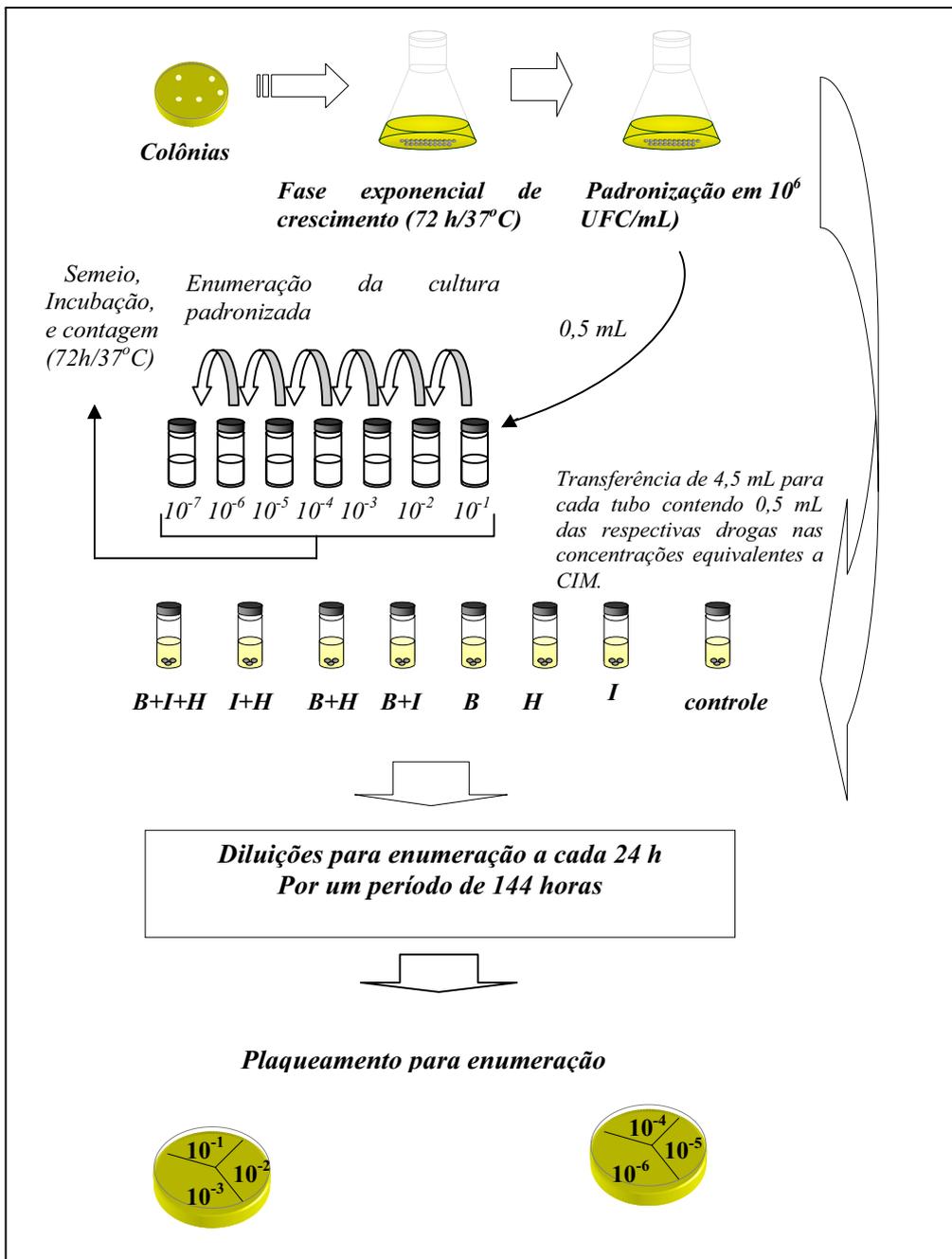
Os inóculos foram padronizados de acordo com a metodologia descrita no item 3.3. Volumes de 0,5 mL contendo as drogas ou suas associações foram transferidos para tubos contendo 4,5 mL de meio líquido de Mueller-Hinton com a suspensão bacteriana padronizada. O tubo controle foi formado por 4,5 mL de cultura padronizada mais 0,5 mL de água destilada esterilizada.

#### **3.7.1. Protocolo experimental**

O acompanhamento da atividade bactericida foi realizado por um período de 144h. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas do tubo controle e de cada tubo contendo o microrganismo exposto à droga ou associações a cada 24 h e enumeradas conforme o item 3.5.1.

Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética e desvio padrão. Com os valores obtidos foi possível traçar uma curva representando o número de bactérias viáveis em logaritmo decimal (ordenada) em função do tempo de exposição em horas (abscissa).

A figura 17 resume a metodologia utilizada para o estudo da cinética bactericida da  $\beta$ -lapachona, da isoniazida, do derivado 1,2,4-oxadiazol e de suas associações frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.



**Fig. 17.** Esquema da Cinética bactericida da  $\beta$ -lapachona (B), isoniazida (I), do derivado 1,2,4-oxadiazol (H) e suas associações frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Os valores da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima da  $\beta$ -lapachona, isoniazida e do [3-(p-hidroxi-fenil)1,2,4-oxadiazol-5-il] acil hidrazida estão apresentados na tabela 2. As figuras 18 e 19 mostram os resultados da CIM obtidos para  $\beta$ -lapachona frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.

Das drogas ensaiadas *in vitro* a isoniazida mostrou ser a mais ativa. Essa droga apresentou uma CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$  e uma CBM de 16  $\mu\text{g/mL}$  para ambos os microrganismos. Esses resultados corroboram com os dados publicados por TENG & DICK (2003) para o *M. smegmatis* que obtiveram uma CIM para isoniazida de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Resultados superiores a 30  $\mu\text{g/mL}$  para cepas de *M. smegmatis* também foram obtidos por HEYM & COLE (1992). Essas diferenças na sensibilidade destes microrganismos à isoniazida podem ser devido origem destes microrganismos.

Esses dados reafirmam a característica de ser as micobactérias atípicas mais resistentes a isoniazida que o *M. tuberculosis* (BANERJEE et al., 1994; LEI et al., 2000). Essa resistência está ligada ao mecanismo de regulação do estresse oxidativo, a velocidade de síntese dos componentes da parede celular e a concentração da enzima catalase-peroxidase (MAGLIOZZO & MARCINKEVICIENE, 1997; LEI et al., 2000; SLAYDEN & BARRY, 2000).

A CIM e a CBM da  $\beta$ -lapachona obtida para ambos os microrganismos estudados foram de 32  $\mu\text{g/mL}$  e 64  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Figs 18 e 19). Estes valores foram próximos dos encontrados por D'ALBUQUERQUE et al. (1972) cujas CIMs para o *M. smegmatis* ficaram situadas entre 40 e 60  $\mu\text{g/mL}$ .

A atividade microbida da  $\beta$ -lapachona tem sido amplamente divulgada, entretanto, escassos são os trabalhos que relacionam a atividade desta quinona frente as micobactérias (GUIRAUD et al., 1994; RIFELL et al., 2002; ANDRADE-NETO et al., 2004).

Recentemente, TRAN et al. (2004) estudaram uma série de quinonas e encontraram valores de CIM e CBM de 12,5 e 50  $\mu\text{g/mL}$  para plumbagina frente ao *M. smegmatis*, respectivamente. O 2,3-dipropil-1,4-naftoquinona apresentou CIM de 50  $\mu\text{g/mL}$  frente a um isolado clínico de *M. fortuitum*.

A CIM e a CBM obtida para a  $\beta$ -lapachona frente ao *M. fortuitum* e *M. smegmatis* neste trabalho demonstra que esta droga, assim como outras quinonas, apresentam atividade bactericida contra esses microrganismos.

**Tabela. 2.** Resultados da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima em  $\mu\text{g/mL}$  da  $\beta$ -lapachona, isoniazida e do derivado do 1,2,4-oxadiazol\*.

drogas	isoniazida		$\beta$ -lapachona		derivado 1,2,4-oxadiazol	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>M. fortuitum</i>	8	16	32	64	25	100
<i>M. smegmatis</i>	8	16	32	64	50	>100

\* A CIM e a CBM do derivado 1,2,4-oxadiazol foram obtidos por VICENTE (2003).



**Fig. 18** Resultados do teste da Concentração Inibitória Mínima da  $\beta$ -lapachona (32  $\mu\text{g/mL}$ ) para o *Mycobacterium fortuitum*. A concentração da  $\beta$ -lapachona decresce, na razão 2, de 256 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$



**Fig. 19** Resultados do teste da Concentração Inibitória Mínima da  $\beta$ -lapachona para o *Mycobacterium smegmatis*. A concentração da  $\beta$ -lapachona decresce, na razão 2, de 256 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Trabalhos publicados têm proposto vários mecanismos de ação de quinonas em células eucariontes, mas poucos são os estudos em relação às bactérias (DOCAMPO et al., 1978; PORTELA et al., 1996; PINK et al., 2000; SILVA et al., 2003).

TRAN et al. (2004), sugeriram que o mecanismo de ação de quinonas em micobactérias poderia ser diferente dos propostos para células de mamíferos, pois a 2,3-dimetil-1,4-naftoquinona apresentou atividade antimicobacteriana similar a 1,4-naftoquinona, mas o primeiro composto é dez vezes menos citotóxico em hepatócitos de cobaias *in vitro*. Diferentemente, a plumbagina (2-metil-5-hidroxi-naftoquinona) apresentou-se oito vezes mais efetiva contra *M. avium* quando comparado com a 1,4-naftoquinona, mas apenas 2,6 vezes mais tóxica para hepatócitos de cobaias. Porém, é necessário observar as diferenças nos mecanismos de defesa contra os agentes deletérios ou uma possível conversão a um agente mais ativo no interior dos hepatócitos ou nas micobactérias. Assim, o mecanismo de ação da  $\beta$ -lapachona pode ser semelhante em células de mamífero e micobactérias, mas a sensibilidade e a resistência desenvolvida pelos microrganismos serem diferentes.

Os resultados da CIM e CBM do derivado 1,2,4-oxadiazol foram obtidos por VICENTE (2003). A CIM foi de 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$  para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, respectivamente. A CBM situou-se em 100 e  $>100$   $\mu\text{g/mL}$  para o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*, respectivamente.

O núcleo oxazolidínico tem sido amplamente estudado quanto a sua atividade biológica (SAHIN et al., 2002; SRIVASTAVA et al., 2003. GEZGINCI et al. (2001) obtiveram uma série de derivados do 1,2,4-oxadiazol com valores da CIM variando de 4,5 a  $> 286$   $\mu\text{g/mL}$ . Estes resultados foram influenciados pelos substituintes no grupamento farmacofórico.

Modificações estruturais no derivado [3-(4-hidroxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-acil-hidrazina poderá ser uma ferramenta para obter moléculas mais ativas frente as micobactérias.

Quanto à atividade bactericida das drogas e suas associações, as curvas traçadas a partir das médias calculadas das três manipulações estão ilustradas nas figuras 20-29.

A  $\beta$ -lapachona reduziu o inóculo de *M. fortuitum* em 1,27  $\log_{10}$  UFC/mL em 72 h (Fig. 20). Um recrescimento deste microrganismo foi observado após 96 h de contato.

Frente ao *M. smegmatis* (Fig. 21), a  $\beta$ -lapachona induziu uma redução do inóculo de 0,70 e 2,03  $\log_{10}$  UFC/mL após 24 e 72 h, respectivamente. Uma redução progressiva da população microbiana foi observada até a esterilização em 120 h de contato.

A atividade microbicida da  $\beta$ -lapachona envolve a produção de radicais livres que promovem alterações celulares e levam a exaustão dos mecanismos celulares de defesa (BABIOR, 1997; FRIDOVICH, 1998; SILVA et al., 2003). Esta atividade pode ser revertida pelo aumento da expressão da enzima superóxido dismutase (WANG et al., 1998).

Quando comparamos os microrganismos, estes resultados demonstram uma maior sensibilidade do *M. smegmatis* à  $\beta$ -lapachona e pode ser devido a uma maior habilidade do *M. fortuitum* em desenvolver resistência a droga por aumento da expressão de enzimas antioxidantes (BULATOVIC, 2002).

Para ambos os microrganismos houve uma diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias após contato com a isoniazida nas primeiras 24 h. (Fig. 20 e 21). Esta droga reduziu o número de células viáveis do *M. fortuitum* em 1,54  $\log_{10}$  UFC/mL após 24 h. Para o *M. smegmatis* a redução do inóculo foi de 1,56  $\log_{10}$  UFC/mL em 24 h e 2,45  $\log_{10}$  UFC/mL em 48 h. Essas reduções foram seguidas de recrescimento após 48 h para o *M. fortuitum* e 72 h para o *M. smegmatis*.

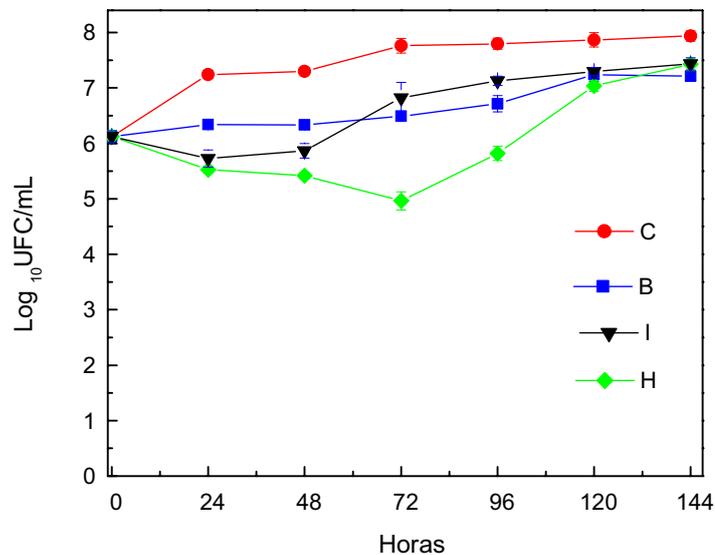
A resistência das micobactérias não tuberculosas a isoniazida tem sido amplamente descrita na literatura, alguns estudos sugerem que a parede celular desempenha um papel importante nos mecanismos de resistência além da velocidade de ativação da isoniazida no interior de diferentes espécies micobacterianas (MDLULI et al. 1998).

O derivado 1,2,4-oxadiazol foi responsável por uma redução de 1,72  $\log_{10}$  UFC/mL nas primeiras 24 h frente ao *M. fortuitum* e 1,81  $\log_{10}$  UFC/mL frente ao *M. smegmatis*. A máxima redução observada para o *M. fortuitum* frente ao derivado 1,2,4-

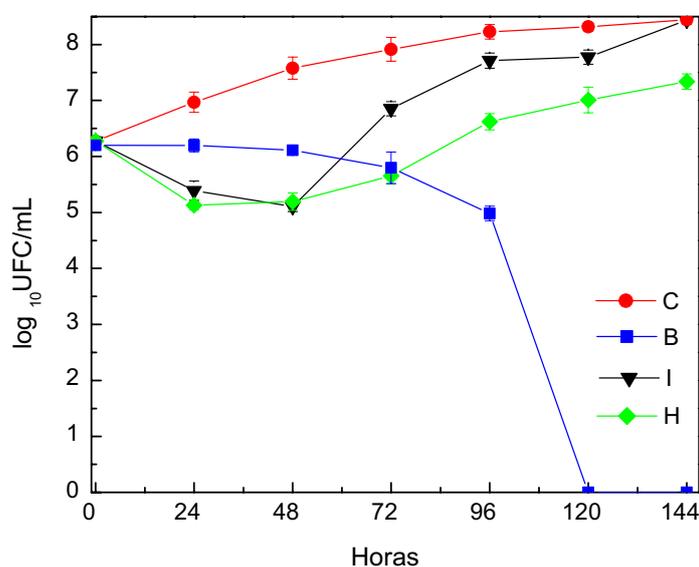
oxadiazol foi 2,8 UFC/mL em 72 h e 2,39  $\log_{10}$  UFC/mL frente ao *M. smegmatis* em 48h. Essas reduções foram seguidas de recrescimento até 144 h de contato (Fig. 20 e 21).

Estes resultados permitem afirmar que o derivado 1,2,4-oxadiazol apresentou uma atividade bactericida mais acentuada que a  $\beta$ -lapachona e isoniazida nas primeiras 24 h de incubação frente as duas micobactérias. Porém, o recrescimento microbiano observado com as drogas informa a seleção de microrganismos resistentes durante o período de contato. A atividade antimicrobiana observada neste estudo para o derivado 1,2,4-oxadiazol permite afirmar que os oxadiazóis podem ser estudados para o desenvolvimento de novas drogas.

A habilidade no desenvolvimento de resistência durante a antibioticoterapia é o principal motivo para a utilização de associações de drogas, principalmente em micobacterioses (SILVA et al., 2001).



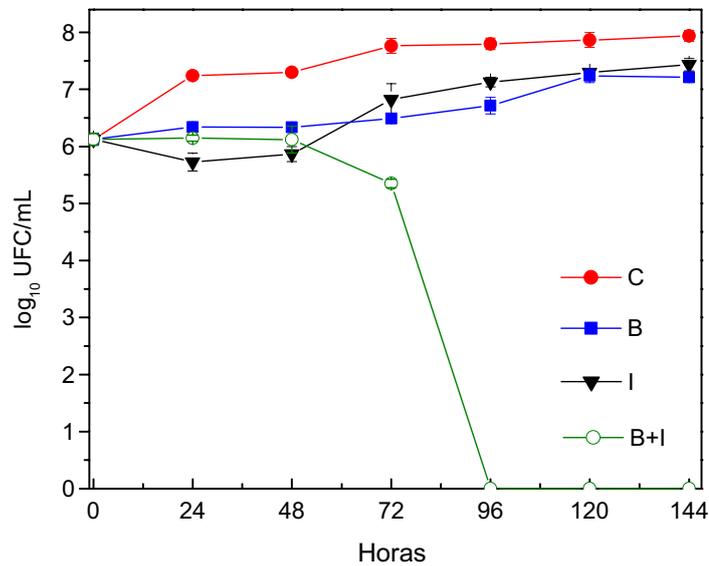
**Fig. 20** Atividade bactericida da, isoniazida (I),  $\beta$ -lapachona (B) e do derivado 1,2,4-oxadiazol hidrazida (H) frente ao *M. fortuitum*. C = controle.



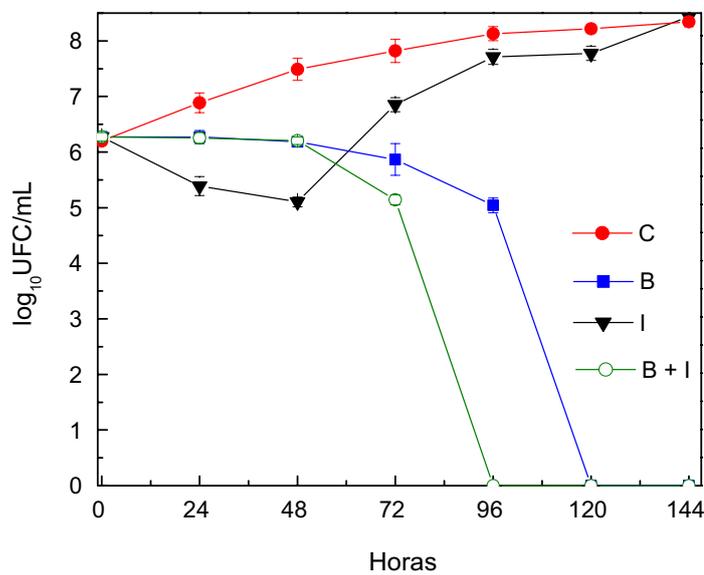
**Fig. 21** Atividade bactericida da isoniazida (I),  $\beta$ -lapachona (B) e do derivado 1,2,4-oxidiazol hidrazida (H) frente ao *M. smegmatis*. C = controle.

A utilização da associação isoniazida- $\beta$ -lapachona aumentou a atividade bactericida quando comparada com a isoniazida ou  $\beta$ -lapachona. Foi observado uma redução do inóculo de 2,74  $\log_{10}$  UFC/mL para o *M. smegmatis* e 2,42  $\log_{10}$  UFC/mL para o *M. fortuitum* em 72 h. A dupla associação esterilizou o cultivo de ambos os microrganismos em 96 horas de contato (Fig. 22 e 23).

Dois são os motivos sugeridos para o aumento da atividade da associação  $\beta$ -lapachona-isoniazida em relação as drogas ensaiadas isoladamente: os danos causados pela ação oxidante as macromoléculas dos microrganismos e o aumento da ativação da isoniazida pela KatG em presença da  $\beta$ -lapachona.



**Fig. 22** Atividade bactericida da associação  $\beta$ -lapachona (B) e isoniazida (I) frente ao *M. fortuitum*. C = controle.



**Fig. 23** Cinética bactericida da associação  $\beta$ -lapachona (B) e isoniazida (I) frente ao *M. smegmatis*. C = controle

Resultados obtidos por CRUZ et al. (1978) frente a cepas de *Bacillus stearothermophilus* e *B. subtilis* afirmam que a toxicidade da  $\beta$ -lapachona em bactérias é devido a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio com conseqüente inativação de enzimas e danos aos lipídios da parede celular.

A ação oxidante da  $\beta$ -lapachona também é sugerida como o fator de indução de morte celular em células de mamíferos e protozoários tratados com esta droga *in vitro* (MATÈS et al., 2000; PLANCHON et al., 2001; ROVER JÚNIOR, 2001; SILVA et al., 2003).

Um aumento na atividade micobactericida da isoniazida *in vitro* tem sido observado quando micobactérias são tratadas por esse fármaco em presença de agentes oxidantes. WANG et al. (1998) demonstraram que a plumbagina potencializou a ação da isoniazida sobre uma cepa de *M. smegmatis* contendo a KatG de *M. tuberculosis*. Segundo WANG (1998), a enzima KatG é convertida à forma ativa em presença de superóxido (item 2.3.2.3) e, conseqüentemente, ativa a isoniazida.

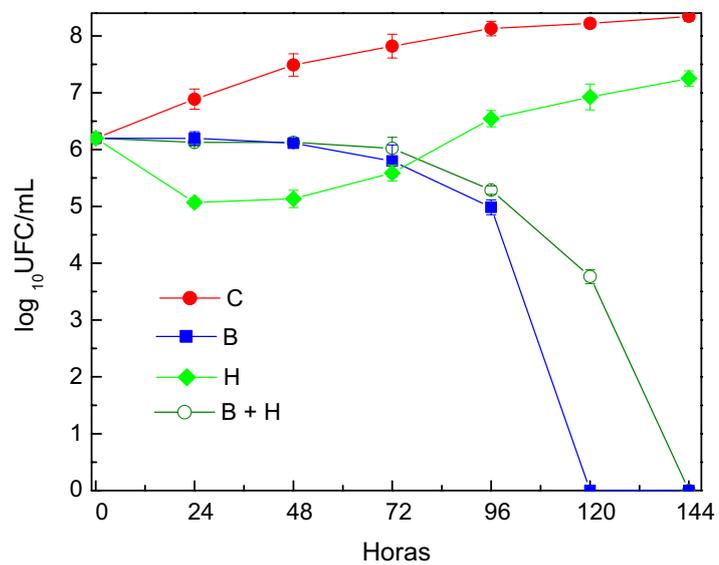
Sugere-se que o aumento da produção de superóxidos pela  $\beta$ -lapachona aumentou a biossíntese de KatG ativa na célula micobacteriana induzindo assim uma maior produção de isoniazida ativa e, conseqüentemente, um maior efeito bactericida.

O trabalho realizado por BULATOVIC et al. (2002), demonstrou que a CIM da isoniazida frente a uma cepa de *M. tuberculosis* reduziu de 0,025 para 0,012  $\mu\text{g/mL}$  na presença de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de clofazimina, uma droga geradora de superóxidos e utilizada no combate ao *M. leprae*, e 0,008  $\mu\text{g/mL}$  na presença de 20  $\mu\text{M}$  de plumbagina, resultados que corroboram com os dados obtidos neste trabalho.

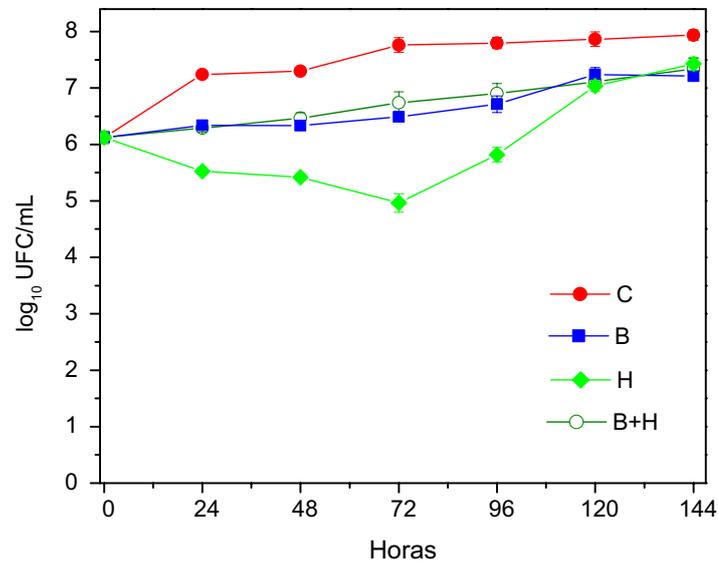
Frente ao *M. smegmatis*, a associação  $\beta$ -lapachona e o derivado 1,2,4-oxadiazol demonstrou uma redução de 1,8  $\log_{10}$  UFC/mL em 72 horas de contato. A redução progrediu até a esterilização do inóculo em 144 h (Fig. 24). Embora tenha esterilizado a cultura, essa dupla associação demonstrou um caráter antagônico, uma vez que essa combinação não potencializou o efeito da droga mais ativa, no caso a  $\beta$ -lapachona. Para o *M. fortuitum* essa associação foi menos ativa (Fig. 25). A máxima redução observada foi 1,0  $\log_{10}$  UFC/mL em 72 h com posterior recrescimento da cultura. Esse

resultado deve-se ao fato da maior resistência do *M. fortuitum* a  $\beta$ -lapachona quando comparado com a cepa de *M. smegmatis*.

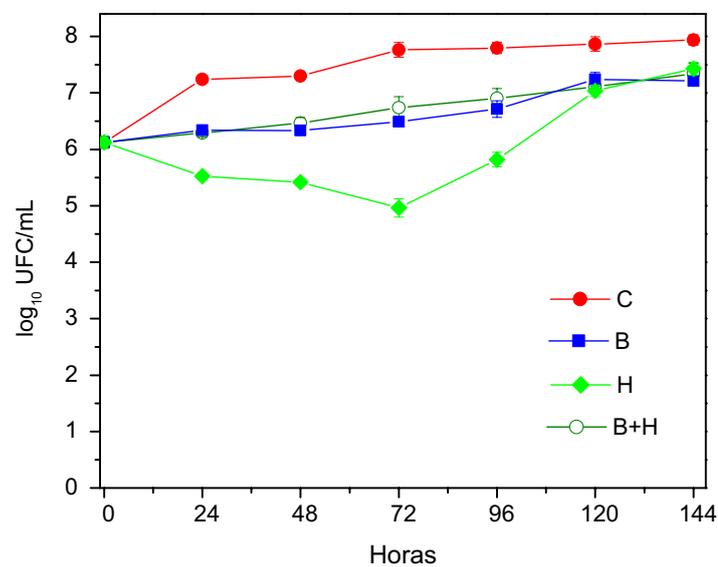
A dupla associação isoniazida e o derivado 1,2,4-oxadiazol reduziu o inóculo do *M. smegmatis* em 1,7  $\log_{10}$  UFC/mL em 24 h de contato. A máxima redução foi observada em 48 h, 2,46  $\log_{10}$  UFC/mL (Fig. 26).



**Fig. 24** Atividade bactericida da associação  $\beta$ -lapachona (B), e do derivado 1,2,4-oxadiazol (H) frente ao *M. smegmatis*. C = controle.

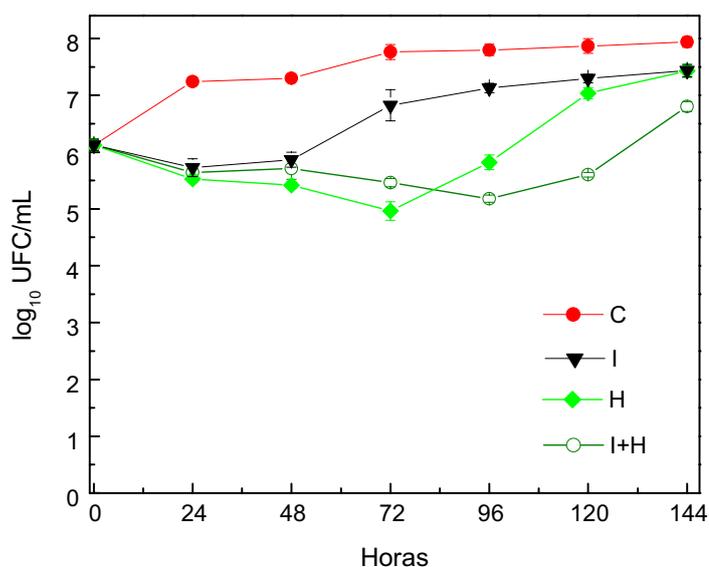


**Fig. 25** Atividade bactericida da associação  $\beta$ -lapachona (B) e do derivado 1,2,4-oxadiazol (H) frente ao *M. fortuitum*. C = controle.



**Fig. 26** Atividade bactericida da associação isoniazida (I) e do derivado 1,2,4-oxadiazol hidrazida (H) frente ao *M. smegmatis*. C = controle.

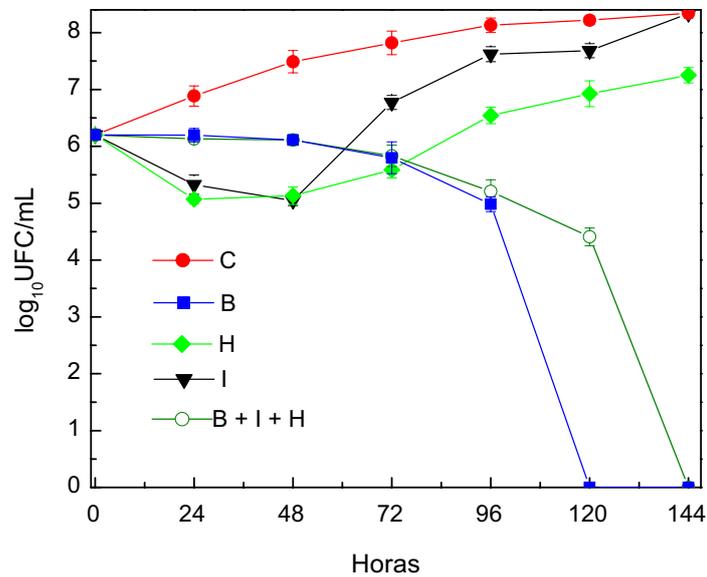
Frente ao *M. fortuitum*, essa associação reduziu o inóculo em  $1,6 \log_{10}$  UFC/mL nas primeiras 24 h de contato. A máxima redução foi observada em 96 h,  $2,62 \log_{10}$  UFC/mL (Fig. 27).



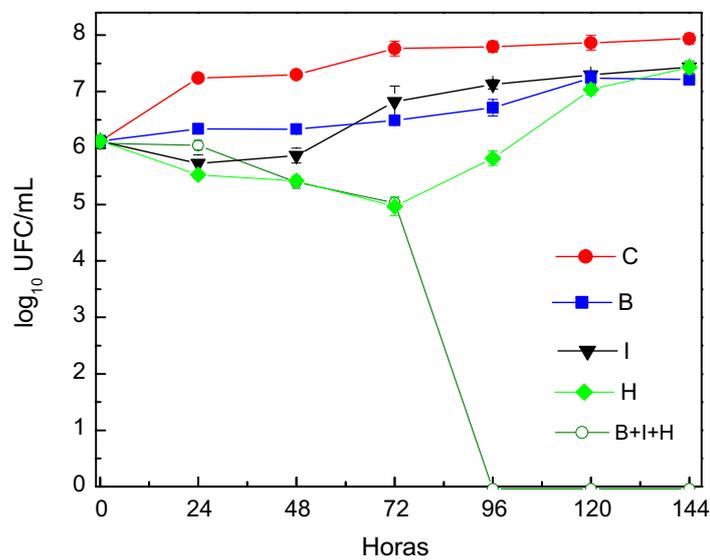
**Fig. 27** Atividade bactericida da associação isoniazida (I) e do derivado 1,2,4-oxadiazol frente ao *M. fortuitum*. C = controle.

A tripla associação  $\beta$ -lapachona, isoniazida e o derivado 1,2,4-oxadiazol, frente ao *M. smegmatis*, apresentou uma redução do cultivo de  $2,02 \log_{10}$  UFC/mL em 72 horas. A redução do número de células viáveis foi progressiva até a esterilização do meio em 144 horas de contato (Fig. 28). Para o *M. fortuitum*, os resultados foram semelhantes aos obtidos para a dupla associação  $\beta$ -lapachona e isoniazida, ou seja, a tripla associação esterilizou o cultivo em 96 horas de contato (Fig. 29).

A atividade observada para o derivado 1,2,4-oxadiazol permite afirmar que os anéis oxadiazóis são promissores para o desenvolvimento de novas drogas antimicobacterianas.



**Fig. 28** Atividade bactericida da associação  $\beta$ -lapachona, isoniazida e do derivado 1,2,4-oxadiazol hidrazida frente ao *M. smegmatis*. C = controle.



**Fig. 29** Atividade bactericida da associação  $\beta$ -lapachona (B), isoniazida (I) e do derivado 1,2,4-oxadiazol (H) frente ao *M. fortuitum*. C = controle.

## 5. CONCLUSÕES

---

Os resultados da CIM e CBM apresentados pela  $\beta$ -lapachona demonstram que esta possui atividade bactericida sobre o *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.

O recrescimento dos microrganismos observados na cinética bactericida caracteriza o surgimento de microrganismos resistentes, um fator não desejável em terapias antimicrobianas.

A dupla associação  $\beta$ -lapachona-isoniazida esterilizou os inóculos do *M. fortuitum* e *M. smegmatis* em 96 h de contato. Esses resultados caracterizam uma potencialização da atividade da isoniazida em presença da  $\beta$ -lapachona.

Esses resultados, conjuntamente com dados descritos na literatura, sugerem que a atividade oxidante da  $\beta$ -lapachona é a responsável pelo aumento da atividade bactericida da associação.

A atividade observada para o derivado do 1,2,4-oxadiazol permite afirmar que os anéis oxadiazóis são promissores para o desenvolvimento de novas drogas antimicobacterianas.

A adição do derivado 1,2,4-oxadiazol para formação da tripla associação ou a combinação dessa droga com a  $\beta$ -lapachona ou isoniazida mostrou-se ineficaz. É necessário estudar o mecanismo de ação da droga bem como o sítio de ação a fim de se obter dados que permitam descrever as causas desse antagonismo.

## 6. REFERÊNCIAS

---

ABSHIRE, R.; COCKRUM, P.; CRIDER, J.; SCHLECH, B. Topical antibacterial therapy for Mycobacterial keratitis: potential for surgical prophylaxis and treatment. **Clin. Ther.** v. 26, n. 2, p. 191-196, 2004.

ALMEIDA, E. R.; SILVA FILHO, A. A.; SANTOS, E. R.; LOPES, C. A. C. Antiinflammatory action of lapachol. **J. Ethnopharm.** v. 29, p. 239-241, 1990.

ANDERTON, M. C.; SIM, E. Arylamine N-acetyltransferase is required for synthesis of mycolic acids and complex lipids in *Mycobacterium bovis* BCG and represents a novel drug target. **J. Exp. Med.** v. 199, n. 9, p. 1191-1199, 2004.

ANDRADE-NETO, V. F.; GOULART, L. O. F.; SILVA FILHO, J. F.; SILVA, M. J.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V.; ZALIS, M. G.; CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol,  $\beta$ -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berberighei* in vivo. **Bio. Med. Chem. Letters.** v. 14, p. 1145-1149, 2004.

ARA, M.; DE SANTAMARIA, C. S.; ZABALLOS, P.; YUS, C.; LEZCANO, M. A. *Mycobacterium chelonae* infection with multiple cutaneous lesions after treatment with acupuncture. **Int. J. Dermatol.** v. 42, n. 8, p. 642-644, 2003.

ASSELINEAU, C.; ASSELINEAU, J.; LANÉELLE, G.; LANÉELLE, M. The biosynthesis of mycolic acids by mycobacteria : current and alternative hypotheses. **Progress Lipid Res.** v. 41, p. 501-523, 2002.

BABIOR, B. M. Superoxid: a two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 30, p. 141-155, 1997.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K. S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; LISLE, G.; JACOBS, W. R. Jr. InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, p. 227-230, 1994.

BARDOU, F.; QUEMARD, A.; DUPONT, M. A.; HORN, C.; MARCHAL, G.; DAFÉ, M. Effects of isoniazid on ultrastucture of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium tuberculosis* and on production of secreted proteins, **Antimicrob. Agents Chemoter**, v. 40, p. 2459-2467, 1996.

BARROW, W. W. Processing of mycobacterial lipids and effects on host responsiveness. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. d387-400, 1997.

BARROW, E. L. W.; WINCHESTER, G. A.; STAAS, J. K.; QUENELLE, D. C.; BARROW, W. W. Use of microsphere technology for sustained and targeted delivery of rifampin to *Mycobacterium tuberculosis*-infect macrophages. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 42, n. 10, p. 2682-2689, 1998.

BARRY, C. E. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis. **Trends Microbiol**. v. 9, p. 473-474, 2001.

BERGER, J. M. Structure of DNA topoisomerases. **Biochim. Bio. Acta**. v. 1400, p.3-18, 1998.

BHAKTA, S.; BESRA, G. S.; UPTON, A. M.; PARISH, T.; SHOLTO-DOUGLAS-VERNON, GIBSON, K. J. C.; KNUTTON, S.; GORDON, S.; DASILVA, R. P.; ANDERTON, M. C.; SIM, E. Arylamine N-acetyltransferase is required for síntesis of mycolic acids and complex lipids in *Mycobacterium Boris* BCG and represents a novel drug target. **J. Exp. Med**. v. 199, n. 9, p. 1191-11990, 2004.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annu Rev. Biochem**. v. 64, p. 29-63, 1995.

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

BRUNETON, J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. v. 3, ed. 1, Acribia. Zaragoza, 1991.

BULATOVIC, V. M.; WENGENACK, N. L.; UHL, J. R.; HALL, L.; ROBERTS, G. D.; COCKERILL, F. R.; RUSNAK, F. Oxidative stress increases susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. **Antimicrob. Agents Chemoter.** v. 46, n. 9, p. 2765-2771, 2002.

BURDEN, D. A.; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukariotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. **Biochim. Bio. Acta.** v. 1400, p. 139-154, 1998.

CAMPOS, H. S. Manejo da doença micobacteriana não tuberculosa. **Boletim de Pneumologia Sanitária.** n. 2, 2000.

CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C. Q.; SATO, D. N.; SHIKAMA, MDE. L.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother,** v. 48, n. 9, p. 3373-3381, 2004.

CARVALHO; ROCHA, E. M.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, A. B.; KRETTLI, A. V. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. **Braz. J. Med. Bio. Res.** v. 21, 485-487, 1988.

CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. **Cur. O. Chem. Bio.** v. 1, p. 579-588, 1997.

CHATERJEE, D.; KHOO, K. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology,** v. 8, n. 2, p. 113-120, 1998.

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

COVERT, T. C.; RODGERS, M. R.; REYES, A. L.; STELMA, G. N., JR. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 31, p. 2882-2889, 1999.

CRAIG, W. A.; EBERT, S. C. Killing and regrowth of bacteria in vitro- a review. **Scan. J. Infect. Dis.** v. 74, p. 63-70, 1991.

CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anions and hydrogen peroxide from  $\beta$ -lapachone in bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 14, n. 4, p. 630-633, 1978.

DAFFÉ, M.; ETIENNE, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. **Tub. Lung Dis.** v. 79, n. 3, p. 153-169, 1999.

DAILLOUX, M.; LAURAIN, C.; WEBER, M.; HARTEMANN, M. Water and nontuberculous mycobacteria. **Wat. Res.** v. 33, n. 10, p. 2219-2228, 1999.

D'ALBUQUERQUE, I. L.; MACIEL, M. C. N.; SCHULER, A. R. P.; ARAUJO, M. C. M.; MACIEL, G. M.; CAVALCANTI, M. S. B.; MARTINS, D. G.; LACERDA, A. L. Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogos inferiores na série da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-2-butenil)-1,4-naftoquinona(lapachol). **Rev. Inst. Antib.** v. 12, n.1/2, p. 31-40, 1972.

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

DAVIDSON, L. A.; TAKAYAMA, K. Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrob. Agents Chemoter**, v. 16, p. 104-105, 1979.

DOCAMPO, R. et al. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by beta-lapachone. **Exp. Parasitol.** v. 42, n. 1, p. 142-149, 1977.

DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; BOVERIS, A.; MUNIZ, R. P. A.; ESQUIVEL, D. M. S. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in  $\beta$ -lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Arch. Biochem. Bio.** v. 186, n. 2, p. 292-297. 1978.

DUNCAN, K. Progress in TB drug development and what is still needed. **Tuberculosis.** v. 83, p. 201-207, 2003.

DUSSURGET, O.; SMITH, I. Interdependence of mycobacterial iron regulation, oxidative-stress response and isoniazid resistance. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 354-358, 1998.

ESCALONILLA, P.; ESTEBAN, J.; SORIANO, M. L.; FARINA, M. C.; PIQU, E.; GRILLI, R.; RAMIREZ, J. R.; BARAT, A.; MARTIN, L.; REQUENA, L. Cutaneous manifestations of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clin. Exp. Dermatol.** v. 23, n. 5, p. 214-221, 1998.

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

FERNANDEZ, D. M.; VILLAMIL, S, H.; STOPPANI, A. O. Cytotoxicity of beta-lapachone, an naphthoquinone with possible therapeutic use. **Medicina (Buenos Aires)**. v. 61, n. 3, p. 343-350, 2001.

FRYDMAN, B.; MARTON, L. J.; SUN, J. S; NEDER, K.; WITIAK, D. T.; LIU, A. A.; WANG, H.; MAO, Y.; WU, H.; SANDERS, M. M.; LIU, L. F. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by  $\beta$ -lapachone and related naphthoquinones. **Cancer Res.** v. 57, p. 620-627, 1997.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Bio.** v. 201, p.1203-1209, 1998.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLÍ-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1315-1320, 1996.

GEZGINCI, M. H.; MARTIN, A. R. ; FRANZBLAU, S. G. Antimycobacterial activity of substituted isosteres of pyridine- and pyrazinecarboxylic acids. **J. Med. Chem.** v. 44, p. 1560-2563, 2001.

GILLESPIE, S. H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 2, p. 267-274, 2002.

GIRARD, M.; KINDACK, D.; DAWSON, B. A.; ETHIER, J. C.; AWANG, D. V. C.; GENTRY, A. H. Naphthoquinone constituents of *Tabebuia* sp. **J. Mat. Prod.** v. 51, n. 5, p. 1023-1024, 1988.

GOIJMAN, S. G.; STOPPANI, A. O. M. Effects of  $\beta$ -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma Cruzi*. **Arch. Biochem. Bio.** v. 240, n. 1, p.273-280, 1985.

GOMES, J.; MCKNNEY, J. D. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. **Tuberculosis**, v. 84, p. 29-44, 2004.

GRACY, R. W.; TALENT, J. M.; KONG, Y.; CONRAD, C. C. Reactive oxygen species: The unavoidable environmental insult?. **Mut. Res.** v. 428, p. 17-22, 1999.

GRANGE, J. M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **J. Ap. Bac. Symp. Ser.** v. 25, p. 1S-9S, 1996.

GROSSET, J.; TRUFFOT-PERNOT, C. Biology of the tubercle bacillus. **Rev. Med. Suisse Romande**, v. 102, n. 3, p. 257-263, 1982.

GUÉRARDEL, Y.; MAES, E.; BRIKEN, V.; CHIRAT, F.; LEROY, Y.; LOCHT, C.; STRECKER, G.; KREMER, L. Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*. **J. Biol. Chem.** v. 278, n. 38, p. 36637-36651, 2003.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; TAKAKI, G. M. C.; MURANDI, F. S.; BOUCHBERG, M. S. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and  $\beta$ -lapachone. **Planta Med.** v. 60, p. 373-374, 1994.

GUPTA, D.; PODAR, K.; TAI, Y.; LIN, B.; HIDESHIMA, T.; AKIYAMA, M.; LEBLANE, R.; CATLEY, L.; MITSIADES, N.; MITSIADES, C.; CHAUHAN, D.; MUNSHI, N. C.; ANDERSON, K. C.  $\beta$ -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Exp. Hem.** v. 30, p. 711-720, 2002.

HEATH, R. J.; WHITE, S. W.; ROCK, C. O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 467-497, 2001.

HERRERA, L.; VALVERDE, A.; SAIZ, P.; SÁEZ-NIETO, J. A.; PORTERO, J. L.; JIMÉNES, M. S. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Philippines. **Inter. J. Ant. Agents**, v. 23, p. 572-576, 2004.

HEUBER, A.; ESSER, P.; HEIMANN, K.; KOCIOK, N.; WINTER, S.; WELLER, M. The topoisomerase I inhibitors, camptothecin and  $\beta$ -lapachone, induce apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. **Exp. Eye Res.** v. 67, p. 525-530, 1998.

HEYM, B.; ZHANG, Y.; POULET, S.; YOUNG, D.; COLE, S. T. Characterization of the KatG gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.** v. 175, n. 13, p. 4255-4259, 1993.

HEYM, B.; COLE, S. T. Isolation and characterization of isoniazid-resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*. **Res. Microbiol.** v. 143, p. 721-730, 1992.

HOFFNER, S. E., SVENSON, S. B. Studies on the role of the Mycobacterial cell envelope in the multiple drug resistance of atypical mycobacteria. **7<sup>th</sup> Forum in Microbiology**. p.448-451, 1991.

HONG, T.; BUTLER, W. R.; HOLLIS, F.; FLOYD, M. M.; TONEY, S. R.; TANG, Y. W.; STEELE, C.; LEGGIADRO, R. J. Characterization of a novel rapidly growing Mycobacterium species associated with sepsis. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, n. 12, p. 5650-5653, 2003.

HORSBURGH, C. R. Jr. Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. **Semin. Respir. Infect.** n. 4, v. 11, p. 244-251, 1996.

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

JACKSON, M.; CRICK, D. C.; BRENNAN, P. J. Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 39, p. 30092-30099, 2000.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*, **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 3, p. 1418-1423.

JESENKÁ, A.; SEDLACEK, I.; DAMBORSKÝ, I. Dehalogenation of haloalkanes by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and other mycobacteria. **Applied Environ. Microb.** v. 66, p. 219-222, 2000.

JOHNSON, D. G.; SCHWARZ, J. K.; CRESS, W. D.; NEVINS, J. R. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. **Nature**. v. 365, p.349-352, 1993.

KARTMANN, B.; STENGER, S.; NIEDERWEIS, M. Porins in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.** v. 181, n. p. 6543, 1999.

KHOO, K. H.; TANG, J. B.; CHATTERJEE, D. Variation in mannose-capped terminal arabinan motifs of lipoarabinomannans from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 3863-3871, 2001.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanism of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives- eleuterina,  $\alpha$ -lapachone, and  $\beta$ -lapachone. **Cancer Chemother. Pharm.** v. 47, n. 3, p. 1367-1379, 2001.

KREMER, L.; DOVER, L. G.; MORBIDONI, H. R.; VILCHÈZE, C.; MAUGHAN, W. N.; BAULARD, A.; TU, S.; HONORÉ, N.; DERETIC, V.; SACCHETTINI, J. C.; LOCHT, C.; JACOBS, W. R., Jr.; BESRA, G. S. Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. **J. Bio. Chem.** v. 278, n. 23, p. 20547-20554, 2003.

KROGSTAD, D. J.; MOELLERING, R. C., Jr. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. Antibiotics in Laboratory medicine. ed. 2, Baltimore: **Williams & Wilkins**, p. 537-557, 1986.

KULLAVANIJAYA, P. Atypical mycobacterial cutaneous infection. **Clin. Dermatol.** v. 17, p. 153-158, 1999.

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **J. Applied Microbiol. Symp. Supplement**, v. 92, p. 46S-54S, 2002.

LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharm. Ther.** v. 99, p. 167-181, 2003.

LARSEN, M. H.; VILCHÈZE, C.; KREMER, L.; BESRA, G. S.; PARSONS, L.; SALFINGER, M.; HEIFETS, L.; HAZBON, M. H.; ALLAND, D.; SACCHETTINI, J. C.; JACOBS JR, W. R. Overexpression of InhA, but not KasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 453-466, 2002.

LEI, B.; WEI, C.; TU, S. Action mechanism of antitubercular isoniazid. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 4, p. 2520-2526, 2000.

LEITE, L. F.; RAMOS, M. N.; DA SILVA, J. B.; MIRANDA, A. L.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J. Synthesis and analgesic profile of novel N-containing heterocycle derivatives: arylidene 3-phenyl-1,2,4-oxadiazole-5-carbohydrazide. **Farmaco**. v. 54, p. 747-757, 1999.

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

LEMASSEU, A.; DAFFÉ, M. Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochimie**, p. 535-538, 1994.

LEVINSON, M. E. Pharmacodynamics of antimicrobial agents-bactericidal and postantibiotic effects. **Infect. Dis. Clin. North America**. v. 9, n. 3, p. 483-495, 1995.

LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B.  $\beta$ -lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptotecin. **J. Bio. Chem.** v. 268, n. 30, p. 22463-22468, 1993.

LI, C. J.; ZHANG, L. J.; DEZUBE, B. J. CRUMPACKER, C. S.; PARDEE, A. B. Three inhibitors of type I human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90, p. 1839-1842, 1993.

LI, C. J.; WANG, C.; PARDEE, A. B. Induction of Apoptosis by beta-lapachone in Human Prostate Cancer Cells. **Cancer Res.** v. 55, n. 17, p. 3712-3715, 1995.

LI, C. J.; LI, Y.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Potent inhibition of tumor survival in vivo by  $\beta$ -lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **PNAS.** v. 96, n. 23, p. 13369-13374, 1999.

LI, C. J.; YU, D.; PARDEE, A. B. Potent induction of apoptosis by beta-lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cell. **Mol. Med.** v. 6. n. 12, p.1008-1015, 2000.

LI, R. C. New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. **Int. J. Ant. Agents.** v. 13, p. 229-235, 2000.

LI, R. C.; ZHU, Z. Y. The integration of four major determinants of antibiotic action: bactericidal activity, postantibiotic effect, susceptibility, and pharmacokinetics. **J. Chemother.** v. 14, n. 6, p. 579-583, 2002.

LI, Y.; SUN, X.; LAMONT, J. T.; PARDEE, A. B. LI, C. J. Selective killing of cancer cells by  $\beta$ -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **PNAS.** v. 100, p. 2674-2678, 2003.

MA, Y.; MILLS, J. A.; BELISLE, J. T.; VISSA, V.; HOWELL, M.; BOWLIN, K.; SCHERMAN, M. S.; MCNEIL, M. Determination of the pathway for rhamnose biosynthesis in mycobacteria: cloning, sequencing and expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding D-glucose-1-phosphate thymidyl transferase. **Microbiology**, v. 143, p. 937-945, 1997.

MAGLIOZZO, R. S.; MARCINKEVICIENE, J. A. The role of Mn(II)-peroxidase activity of mycobacterial catalase-peroxidase in activation of antibiotic isoniazid. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 14, p. 8867-8870, 1997.

MAILAENDER, C.; REILING, N.; ENGELHARDT, H.; BOSSMANN, S.; EHLERS, S.; NIEDERWEIS, M. The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, v. 150, p.853-864, 2004.

MARRAKCHI, H.; LANEÉLLE, G.; QUÉMARD, A. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. **Microbiology**, v. 146, p. 289-296, 2000.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMENES, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **Int. J. biochem. & cell biol.** v. 32, p. 157-170, 2000.

MCKENZIE, D.; MALONE, L.; KUSHNER, S.; OLESON, J.; SUBARROW, J. The effect of nicotinic acid amide on experimental tuberculosis of white mice. **Lab. Clin. Med.** v. 33, p. 1249-1253, 1948.

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. Microbiol.**, v. 142, p. 451-463, 1990.

MDLULI, K.; SHERMAN, D. R.; HICKEY, M. J.; KREISWIRTH, B. N.; MORRIS, S.; STOVER, C. K.; BARRY, C. E III. Biochemical and genetic data suggest that InhA is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.** v. 174, n. 5, p. 1085-1090, 1996.

MDLULI, K.; SWASON, J.; FISCHER, E.; LEE, R. E.; BARY III, C. E. Mechanisms involved in the intrinsic isoniazid resistance of *Mycobacterium avium*. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1223, 1998.

MDLULI, K.; SLAYDEN, R.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D.; CRANE, D. D.; MUSSER, J. M.; BARRY III, C. E. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -ketoacyl ACP synthase by isoniazid. **Science**, v. 280, p. 1607-1610, 1998.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazid and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. **Am. Rev. tuberc.** v. 65, p. 765-767, 1952.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. L.; SCHAEFER, W. B. Studies on isoniazid and tubercle bacilli III. The isolation drug-susceptibility and catalase testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. **Am. Rev. tuberc.** v. 70, p. 852-872, 1954.

MIESEL, L.; WEISBROD, T. R.; MARCINKEVICIENE, J. A.; BITTMAN, R.; JACOBS W. R. NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol.** v. 180, n. 9, p. 2459-2467, 1998.

MIKUSOVÁ, K.; SLAYDEN, R. A.; BESRA, G. S.; BRENNAN, P. J. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. **Antimicrob. Agents chemother.** p. 2484-2489. 1995.

MINOR, L. L., VERON, M. Bactériologie Medicali. ed. 1, Paris: **Flammarion Médecine-Science**, 1982.

MOHAMAD, S.; IBRAHIM, P.; SADIKUN, A. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and its derivative, 1-isonicotinyl-2-nonanoyl hydrazine: investigation at cellular level. **Tuberculosis**, v. 84, p. 56-62, 2004.

MOURA, K. C. G.; SALOMÃO, K.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; EMERY, F. S.; PINTO, M. C. F. R.; PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[b-4,3]naphtho[1,2-d]imidazoles from  $\beta$ -lapachone. **Eur. J. Med. Chem.** v. 39, p. 639-645, 2004.

MUSSER, J. M.; KAPUR, V.; WILLIAMS, D. L.; KREISWIRTH, B. N.; VAN SOOLINGEN, D.; VAN EMBDEN, J. D. Characterization of catalase-peroxidase gene (KatG) and inhA locus in isoniazid-resistant and-susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug reistance. **J. Infect. Dis.** v. 173, p. 196-202, 1996.

MUKHOPADHYAY, S.; BASU, D.; CHAKRABARTI, P. Characterization of a porin from *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol.** v. 179, n. 19, p. 6205-6207, 1997.

NGUYEN, M.; QUEMARD, A.; MARRAKCHI, H.; BERNADOU, J.; MEUNIER, B. The nonenzymatic activation of isoniazid by  $Mn^{III}$ -pyrophosphate in the presence of NADH reductase InhA from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry**, v. 4, p. 35-40, 2001.

NICOLAU, D. P. Optimizing outcomes with antimicrobial therapy through pharmacodynamic profiling. **J. infect. Chemother.** v. 9, n.4, p. 292-296, 2003.

NIEDERWEIS, M. Mycobacterial porins- new channel proteins in unique outer membranes. **Mol. Microbiol.** v. 49, n. 5, p. 1167-1177, 2003.

NIGOU, J.; GILLERON, M.; PUZO, G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. **Biochimie**, v. 85, p. 153-166, 2003.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382-388, 1994.

NUERMBERGER, E; GROSSET, J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of mycobacterial infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 23, p. 243-255, 2004.

OLIVEIRA, C. G. T.; MIRANDA, F. F.; FERREIRA, V. F.; FREITAS, C. C.; RABELLO, R. F.; CARBALLIDO, J. M.; CORRÊA, L. C. D. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-hydrazino-naphthoquinones as analogs of lapachol. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 12, n. 3, p. 339-345, 2001.

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; GOULART, F. C.; ABREU, F. C. Reduction of lapachones and their reaction with L-cysteine and mercaptoethanol carbon electrodes. **Bioelectro.** v. 56, p. 53-55, 2002.

ORTALO-MAGNÈ, A.; LEMASSU, A.; LANÉELLE, M.; BARDOU, F. ; SILVE, G. ; GOUNON, P. ; MARCHAL, G. ; DAFFÉ, M. Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. **J. Bacteriol.** v. 178, n. 2, p. 456-461, 1996.

OHKAWA, K.; HASHIGUCHI, M.; OHNO, K.; KIUCHI, C.; TAKAHASHI, S.; KONDO, S.; ECHIZEN, H.; OGATA, H. Risk factors for antituberculous chemotherapy-induced hepatotoxicity in Japanese pediatric patients. **Clin. Pharm. Ther.**, v. 72, n. 2, 2002.

OSHEROFF, N. DNA topoisomerases. **Bioch. Bio. Acta.** v. 1400, p. 1-2, 1998.

PARDEE, A. B.; LI, Y. Z.; LI, C. J. Cancer Therapy with beta-lapachone. **Curr. Cancer Drug Targets.** v. 2, n. 3, p. 227-242, 2002.

PAYTON, M.; AUTY, R.; DELGODA, R.; EVERETT, M.; SIM, E. Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 1342-1347, 1999.

PINTO, C. N.; DANTAS, A. P.; DE MOURA, K. C.; EMERY, F. S.; POLEQUEVITCH, P. F.; PINTO, M. C.; DE CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from tabebuia with anti-trypanosomal efficacy. **Arzneimittelforschung.** v. 50. n. 12, p. 1120-1128, 2000.

PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M. E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D. A. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of  $\beta$ -lapachone cytotoxicity. **J. Bio. Chem.** v. 275, n. 8, p. 5416-5424, 2000.

PITULLE, C.; DORSCH, M.; KAZDA, J.; WOLTERS, J.; STACKEBRANDT, E. Phylogeny of rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 42, p. 337-343, 1992.

PIZZOLATO, J. F.; SALTZ, L. B. The camptothecins. **Lancet.** v. 361, p. 2235-2242.

PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNEMANN, W. G.; VARNES, M. E.; BOOTHMAN, D. A.  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Exp. Cell Res.** v. 267, p. 95-106, 2001.

PORTAELS, F. Epidemiology of mycobacterial disease. **Clin. Dermatol.**, v.13, p. 207-222, 1995.

PORTELA, M. P. M.; STOPPANI, A. O. M. Redox cycling of  $\beta$ -lapachone and related o-naphthoquinone in the presence of dihydrolipoamide and oxygen. **Bioc. Pharm.** v. 51, p. 275-283. 1996.

PORTELA, M. P. M.; VILAMIL, S. H. F.; PERISSINOTTI, L. J.; STOPPANI, A. O. M. Redox cycling of o-naphthoquinones in trypanosomatids. **Bioc. Pharm.** v. 52, p. 1875-1882, 1996.

PROMIER, Y.; POURQUIER, P.; FAN, Y.; STRUMBERG, D. Mechanism of action of eukariotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. **Biochem. Bio. Acta.** v. 1400, p. 83-106, 1998.

QUÉMARD, A.; LACAVE, C.; LANÉELE, G. Isoniazid inhibition of mycolic acid synthesis by cell extracts of sensitive and resistant strains of *Mycobacterium aurum*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 35, n. 6, p. 1035-1039, 1991.

QUÉMARD, A.; MAZÈRES, S.; SUT, A.; LANÉEELLE, G.; LACAVE, C. Certain properties of isoniazid inhibition of mycolic acid synthesis in cell-free systems of *M. aurum* and *M. avium*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1254, p. 98-104, 1995.

QUENELLE, D. C.; STAAS, J. K.; WINCHESTER, G. A.; BARROW, E. L. W. Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Ant. Agents Chem.** P.1144-1151, 1999.

RAYNAUD, C.; ETIENNE, G.; PEYRON, P.; LANÉEELLE, M.; DAFFÉ, M. Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology.** v. 144, p. 577-587, 1998.

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. **Biochemistry**, v. 100, n. 24, p. 13881-13886, 2003.

RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SANTOS, W. G.; OLIVEIRA, A. B.; SNIECKUS, V.; ZANI, C. L.; ROMANHA, A. J. Growth inhibitory effect of naphthofuran and naphthofuranquinone derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Bio. Méd. Chem. Letters.** v. 5, n. 14, p. 1509-1512, 1995.

RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. **Nature**. v. 407, p. 307-310, 2000.

RIFFEL, A.; MEDINA, L. F.; STEFANI, V.; SANTOS, R. C.; BIZANI, D.; BRANDELLI, A. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 35, p. 811-818, 2002.

RODRIGUES, J. C.; RUIZ, M.; CLIMENT, A.; ROYO, G. *In vitro* activity of fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. **Inter. J. Anti. Agents**. v.17, n.3, p. 229-231, 2001.

ROITMAN, D. A.; BLAUVELT, A.; KERDEL, F. A. Widespread primary cutaneous infections with *Mycobacterium fortuitum*. **Int. J. Dermatol.** v. 32, n. 7, p. 512-514, 1993.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev. Saúde Pública**. v. 36, n. 4, p. 525-532, 2002.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**. v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

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

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

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A.; ABREU, F. C.; CHIAKI, E.; GOULART, M. D.; SANT'ANA, A. E. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. **Panta Med.** v. 67. n. 1, p. 92-93, 2001.

SANTOS FILHO, J. M. S. Planejamento bioisotérico, síntese e avaliação farmacológica de novos análogos 1,2,4-oxadiazólicos. Dissertação (Mestrado em biotecnologia de Produtos Bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco. 2002.

SCHNEIDER, E.; LASERSON, K. F.; WELLS, C. D.; MOORE, M. Tuberculosis along the United States-Mexico border, 1993-2001. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 16, n. 1, p. 23-34, 2004.

SELIK, R. M., STARCHER, E. T., CURRAN, J. W. Opportunistic disease reported in AIDS patients: frequencies, association, and trends. **AIDS**. v. 1, n. 3, p. 175-182, 1987.

SEPKOWITZ, K. A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L.; KIEHN, T. E.; ARMSTRONG, D. *Tuberculosis* in the AIDS era. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 8, n. 2, p.180-199, 1995.

SHERMAN, D. R.; MDLULI, K.; HICKEY, M. J.; ARAIN, T. M.; MORRIS, S. L.; BARRY III, C. E.; STOVER, C. K. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 272, p. 1641-1643, 1996.

SHINNICK, T. M.; GOOD, R. C. Mycobacterial taxonomy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 13, p. 884-901, 1994.

SHOEB, H. A.; BOWMAN JR, B. U.; OTTOLENGHI, A. C.; MEROLA, J. Evidence for the generation of oxygen by isoniazid treatment of extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 27, n. 3, p. 404-407, 1985.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Quim. Nova**. v. 26, n. 3. p. 407-416, 2003.

SILVA, P. E. A.; OSÓRIO, M.; REINHARDT, M. C.; FONSECA, L. S.; DELLAGOSTIN, O. A. Drug resistance of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Brazil. **Microbes and Infection**. v. 3, p. 1111-1113, 2001.

SINGH, R.; WISEMAN, B.; DEEMAGAM, T.; DONALD, L. J.; DUCKWORTH, H. W.; CARPENA, X.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Catalase-peroxidase (KatG) exhibit NADH oxidase activity. **J. Biol. Chem.** v. 279, n. 41, p. 43098-43106, 2004.

SKIEST D. J.; LEVI, M. E. Catheter-related bacteremia due to *Mycobacterium smegmatis*. **South. Med. J.** v. 91, n. 1, p. 36-37, 1998.

SLAYDEN. R. A.; BARRY, C. E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection.** v. 2, p. 659-669, 2000.

SLAYDEN, R. A.; LEE, R. E.; BARRY, C. E. Isoniazid affects multiple components of the type fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.** v. 38, n. 3, p. 514-525, 2000.

SLAYDEN R. A.; BARRY, C. E. The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis.** v. 82, n.4-5, p. 149-160, 2002.

SMEUDERS, M. J.; KEER, J.; SPEIGHT, R. T.; WILLIAMS, H. D. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 270-283, 1999.

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

SRIVASTAVA, R. M.; LIMA, A. A.; VIANA, O. S.; COSTA SILVA, M. J.; CATANHO, M. T. J. A.; MARAIS, 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. **Bio. Med. Chem.** v. 11, p. 1821-1827, 2003.

STOPPANI, A. O. M. The chemotherapy of Chagas disease. **Medicina (Buenos Aires).** v. 59, n. 2, p. 147-165, 1999.

TAKAYAMA K.; KEITH, A. D.; SNIPES, W. Effect of isoniazid on the protoplasmic viscosity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 7, p. 22-24, 1975.

TENG R.; DICK, T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. **FEMS Microbiology Letters**. v. 227, p. 171-174, 2003.

THOMSOM, R. H. Naturally Occuring Quinones III: Recent advances. **Chapman and Hall**. London, 1986.

THOMSOM, R. H. Distribution of naturally occurring quinones. **Pharm. Weekbl. Sci.** v. 13, ,n. 2, p. 70-73,1991.

TRAN, T.; SAHEBA, E.; ARCERIO, A. V.; CHAVES, V.; LI, Q.; MARTINEZ, L. E.; PRIMM, T. P. Quinones as antimycobacterial agents. **Bio. Med. Chem.** v. 12, p. 4809-4813, 2004.

TRIMARCHI, J. M.; LEES, J. A. Sibling rivalry in the E2F family. **Molecular cell Biology**. v. 3, p. 11-20, 2002.

UPTON, A. M.; MUSHTAQ, A.; VICTOR, T. C.; SAMPSON, S. L.; SANDY, J.; SMITH, D. M.; VAN HELDEN, P. V.; SIM, E. Arylamine N-acetyltransferase of *Mycobacterium tuberculosis* is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 42, p. 309-317, 2001.

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

VILCHEZE, C.; MORBIDONE, H. R.; WEISBROD, T. R.; IWAMOTO, H.; KUO, M.; SACCHETTINI, J. C.; JACOBS, W. R. Inactivation of the inh-A-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol.** v. 182, p. 4059-4067, 2000.

VILLENEUVE, C.; ETIENNE, G.; ABADIE, V.; MONTROZIER, H.; BORDIER, C.; LAVAL, F.; DAFTE, M.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; ASTARIE-DEQUEKER, C. Surface-exposed glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis* specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. **J. Biol. Chem.** v. 278, n. 51, p. 51291-51300, 2003.

WAYNE, L. G.; SRAMEK, H. A. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 5, n.1, p. 1-25, 1992.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Ann. Review. Biochem.** v. 65, p. 635-692, 1996.

WANG, J.; BURGER, R. M.; DRLICA, K. Role of superoxide in catalase-peroxidase-mediated isoniazid action against mycobacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 42, n. 3, p. 709-711, 1998.

WENGENACK, N. L.; RUSNAK, F. Evidence for isoniazid-dependent free radical generation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistance mutant KatG(S315T). **Biochemistry.** v. 40, p. 8990-8996, 2001.

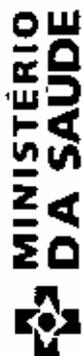
WOLINSKI, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Am. Rev. Respir. Dis.** v. 119, n. 1, p. 107-159, 1979.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEM, B.; YOUNG, D.; COLE, S. T. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature.** v. 358, p. 591-593, 1992.

ZUMLA, A.; GRANGE, J. M. Multidrug-resistant tuberculosis-can the tide be turned? **Infectious Disease.** v. 1, p. 199-202, 2001.



**Trabalhos apresentados em congressos na forma de painéis**



*Certificamos que o trabalho abaixo descrito foi apresentado na forma de poster no*

### *I Encontro Nacional de Tuberculose*

*Título: In vitro bacterial activity of B-lapachone alone and in combination against mycobacterium fortuitum*

*Autores: Silva, JL; Ximenes, EA*

*Brasília, 30/06 a 03/07/2004 - Hotel Naonim Plaza*

*Comissão Científica*

Universidade  
Federal  
do Piauí



**3 Congresso Norte-Nordeste de Multiresistência Bacteriana  
I Simpósio Norte-Nordeste de Infecção Hospitalar  
I Simpósio Norte-Nordeste de Controle da Qualidade dos Medicamentos**  
9, 10, 11 e 12 de maio de 2004

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DA  $\beta$ -LAPACHONA** dos autores **Amanda Rafaela Carneiro de Mesquita, Joás Lucas da Silva, Edilaine Azevedo Ximenes**, foi apresentado na forma de painel neste congresso.

  
Prof. Joás Lucas da Silva

  
Profa. Edilaine Azevedo Ximenes

Joás Lucas da Silva

Atividade Bactericida da  $\beta$ -lapachona, da isoniazida...

**Manuscrito submetido à revista International Journal of Pharmaceutics**

***In vitro* activity of  $\beta$ -lapachone singly and in combination with isoniazid against  
*Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*.**

J. L. Silva<sup>1\*</sup>, R. A. S. Oliveira<sup>1</sup>, A. R. C. Mesquita<sup>1</sup>, E. A. Ximenes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade  
Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Corresponding author:

Departamento de Antibióticos

Universidade Federal de Pernambuco

Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Tel.: + 55 81 21268347; Fax.: + 55 81 21268346

e-mail address: [joaslucas@oi.com.br](mailto:joaslucas@oi.com.br)

## 1. Abstract

Nontuberculous mycobacteria are ubiquitous and saprophytic organisms that have been implicated in a wide spectrum of diseases due to the increase in immunocompromised patients. Indeed, the natural resistance of atypical mycobacteria to the classical antituberculous drugs has encouraged researches in order to obtain new chemotherapeutic agents against mycobacteria. The aim of this study was to determine *in vitro* antimycobacterial activities of  $\beta$ -lapachone alone and in combination with isoniazid against *Mycobacterium fortuitum* and *M. smegmatis* by the Time-Kill Curve method. The results confirmed  $\beta$ -lapachone as an active drug against both microorganisms as well as other quinones. The combined effect of  $\beta$ -lapachone and isoniazid was significantly greater than when these drugs were tested separately.

Key words: time-kill curves,  $\beta$ -lapachone, Nontuberculous mycobacteria, isoniazid

## 2. Introduction

Nontuberculous or atypical mycobacteria are opportunistic pathogens frequently found in water sources, soil, dust, air and animals. These organisms are implicated in infections of skin, bones and soft tissues (Falkinhan, 1996; Ara et al., 2003; Hong et al., 2003).

Immunocompromised patients are susceptible to disseminated infection caused by nontuberculous mycobacteria, particularly patients in the terminal stages of AIDS since immunological status is important to the advance of disease. Nontuberculous mycobacterial infection has been documented most notably after the outbreak AIDS epidemic (Falkinhan, 1996).

Treatment of infections caused by members of the mycobacterial genus is difficult, lengthy and not always successful. This is a result of multi-drug regimens, administered over prolonged periods, taken from a small selection of drugs available, with significant side effects, and the intrinsic resistance to a wide range of drugs (Nuernberger and Grosset, 2004). These problems have stimulated researches to find novel antimycobacterial agents (Duncan, 2003).

Most atypical bacteria are resistant to isonicotinic acid hydrazide (isoniazid), one of the most used therapeutic agents for the treatment of tuberculosis. Isoniazid is a prodrug that requires activation by an endogenous mycobacterial enzyme, catalase-peroxidase (KatG), in a process that requires molecular oxygen (Zhang et al., 1992; Singh et al., 2004).

In recent study, Tran et al. (2004) demonstrated quinones as active drugs against *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* and *M. avium*. The mechanism of toxicity in these

compounds is being investigated and some reports have suggested that quinones stimulate oxidative stress in biological systems (Ribeiro-Rodrigues et al., 1995; Portela et al., 1996).

$\beta$ -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-*b*]pyran-5,6-dione), a natural quinone extracted from the bark of Lapacho tree (*Tabebuia avellanae*) or synthesized from lapachol or lomatiol (Lima et al., 1962; Schaffner-Sabba et al., 1984) is well known to have a variety of pharmacological effects as trypanocidal, moluscicidal, antifungal, antibacterial, antiviral and anticancer (Li et al., 1993; Guiraud et al., 1994; Santos et al., 2001; Pardee et al., 2002).

Quinones have been reported to stimulate isoniazid activity, most likely by increasing intracellular superoxide production. Recent works have suggested that the resting form of KatG is converted to an active form in the presence of superoxide. Consequently, further isoniazid active may be produced when this drug is combined with a compound that stimulates oxidative stress (Bulatovic et al., 2002).

The present work compares the *in vitro* antimycobacterial activity of  $\beta$ -lapachone alone, as well as in combination with isoniazid at minimum inhibitory concentration against *Mycobacterium fortuitum* and *M. smegmatis* by using the Time-Kill Curve method. Note that there are no reports about oxidant activity of  $\beta$ -lapachone in combination with isoniazid.

### 3. Material and methods

#### *Strains*

*M. fortuitum* and *M. smegmatis* strains were clinical isolates obtained from AIDS patients. They were scraped from Lowenstein-Jensen slants, and recultured in Mueller-Hinton broth (Oxoid) plus 0.01% tween 80.

#### *Drugs*

Isoniazid (LAFEPE) was dissolved in distilled sterile water.  $\beta$ -lapachone was provided by Departamento de antibióticos-Universidade Federal de Pernambuco and dissolved in propyleneglicol, followed by water. All drug solutions were prepared on the day of testing. Appropriate solvent controls were made to exclude the possibility that the higher concentrations of solvents used would have toxic effects on their own.

#### *Determination of viable counts*

Samples of culture were removed and 10-fold dilutions were made in sterile saline. After that, six 10  $\mu$ L aliquots from each tube were plated onto Mueller-Hinton agar. After incubation at 37° C for 72 h, colonies were counted using a colony counter (Biomatic).

#### *MIC and MBC determinations*

The MICs for the two drugs were measured by a standard twofold dilution method in Mueller-Hinton broth (Oxoid) plus 0.01% of tween 80. The inocula of *M. fortuitum* and *M. smegmatis* were grown at 37° C for 72 h. The microorganisms were then diluted into fresh broth and adjusted to obtain a final inoculum of approximately  $10^6$  CFU/mL, as

determined by the viable count method. Then, 4.5 mL of each culture was used as the inoculum for each 0.5mL of the drug. The final concentration of each drug ranged from 0.5 to 128  $\mu$ g/mL. The MIC was determined as the lowest concentration that prevented visible growth after incubation at 37° C for 72 h.

Samples of 10  $\mu$ L were transferred from tubes, which had not grown microorganisms, onto Mueller-Hinton agar plates which were then incubated for 72 h at 37° C. The MBC was the lowest drug concentration inhibiting  $\geq 99.9\%$  of the bacterial population. All experiments were carried out in triplicate on three different days.

#### *Bactericidal kinetic studies*

The bactericidal activity of drugs was determined by the Time-kill curve method. The log-phase inoculum was prepared in a manner similar to the MIC and MBC. Tubes containing the inoculum and either single drugs or combined drugs at MIC were prepared. A growth tube without drugs was used as a control. The tubes were incubated at 37°C and appropriate dilutions were performed at 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h in order to determine the number of viable bacteria ( $\log_{10}$  CFU/mL). Time-kill curves at each drug, individually and in combinations were then constructed by plotting  $\log_{10}$  CFU/mL versus time. All experiments were carried out in triplicate on three different days.

## 4. Results

### 4.1 Determination of MIC and MBC of $\beta$ -lapachone and isoniazid

The MIC and MBC values of  $\beta$ -lapachone for both microorganisms were 32 and 64  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. For isoniazid, the MIC and MBC for both microorganisms were 8 and 16  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Table 1).

### 4.2 Bactericidal activity

The results obtained by incubating *M. fortuitum* in the presence of  $\beta$ -lapachone alone as well as in combination with isoniazid are given in Fig. 1. For  $\beta$ -lapachone, there was no significant reduction in the number of viable bacteria during 144-h incubation at 37° C. On the other hand, isoniazid produced a 1.54-log reduction in count at 24-h compared with the control. A regrowth was observed after 48-h incubation.

The combination of these two drugs exhibited an excellent inhibitory effect on *M. fortuitum* compared with either  $\beta$ -lapachone or isoniazid alone. The bactericidal effect was observed at 96-h incubation. This combination was able to prevent regrowth.

The  $\log_{10}$  decrease of viable cell counts induced by  $\beta$ -lapachone either alone or in combination with isoniazid against *M. smegmatis* is given in Fig. 2.

$\beta$ -lapachone alone was more highly active against *M. smegmatis*. Bactericidal effect was detected at 120-h incubation, while similar results were not observed with *M. fortuitum*.

Isoniazid produced a 1.46-log reduction in count at 48 h compared with the control; however, regrowth was observed after 48-h incubation. On the other hand, these

compounds in combination exhibited satisfactory activity against *M. smegmatis*. The bactericidal effect was observed at 96-h incubation and regrowth was not observed.

## 5. Discussion

The MIC and MBC of isoniazid and  $\beta$ -lapachone were determined by broth dilution method. Although the data in the literature on the *in vitro* activity of quinones against atypical mycobacteria is limited, our MIC values for  $\beta$ -lapachone our MIC values for  $\beta$ -lapachone are in general agreement with those obtained by D'albuquerque et al. (1972) against *M. smegmatis*. This study, using *M. smegmatis*, reported MICs ranging from 40 to 60  $\mu\text{g/mL}$ . In recent study, Tran et al. (2004) reported the *in vitro* antimycobacterial of quinone derivatives against *M. fortuitum* and *M. smegmatis*. Plumbagin was the most potent synthesized quinone against *M. smegmatis* and *M. avium* exhibiting a MIC value of 12,5  $\mu\text{g/mL}$  while 2,3-dipropyl-1,4-naphthoquinone had a MIC of 50 $\mu\text{g/mL}$  against *M. fortuitum*.

The results of MIC and MBC for  $\beta$ -lapachone described above confirmed this compound as an active drug against *M. fortuitum* and *M. smegmatis* as well as other quinones.

The results of MIC and MBC for isoniazid against both microorganisms presented here are in agreement with previously published articles (Telles and Yates, 1994; Teng and Dick, 2003). These results are consistent with the isoniazid activity against nontuberculous mycobacteria which have intrinsic resistance to this drug. This resistance has often been attributed to a decreased permeability of the cell wall and the rate of conversion of isoniazid to active form (Mdluli et al., 1998). In addition, higher

levels of resistance may be acquired with the loss of catalase-peroxidase activity and overproduction of superoxide dismutase (Zhang et al., 1992; Bulatovic et al., 2002).

Analysis of the results obtained using the killing curve method indicates that regrowth of *M. fortuitum* and *M. smegmatis* occurred in the presence of the isoniazid alone at MIC. Regrowth in the experiments reported here is the result of a selection of resistant variants. Some in vitro studies use only one drug to evaluate the efficacy of a new antimicrobial agent; however a combination of two or more antibiotics to avoid the appearance of drug-resistant mycobacteria during therapy is needed (Nuermberger and Grosset, 2004).

The discrepancies between the kill curves of  $\beta$ -lapachone alone against *M. fortuitum* and *M. smegmatis* can not be immediately explained, although it is likely that the higher resistance shown by *M. fortuitum* may be a result of the defensive mechanism against free radicals, seeing that  $\beta$ -lapachone damages microorganisms by generating reactive oxygen species. This supposition does not apply to other *M. fortuitum* and *M. smegmatis* strains because it may be an isolated result. Further studies must be carried out.

The results obtained for the combination of  $\beta$ -lapachone and isoniazid demonstrated a satisfactory bactericidal activity against both microorganisms. Some quinones, including  $\beta$ -lapachone, possess superoxide generating properties that can damage lipids, proteins and deoxyribonucleic acids. Published works have postulated that the toxicity of  $\beta$ -lapachone against bacteria and *Trypanosoma cruzi* is expressed through superoxide and hydrogen peroxide formation (Cruz et al., 1978; Ribeiro-Rodrigues et al., 1995; Portela et al., 1996).

The potential involvement of superoxide in isoniazid action is being studied. Some works have reported the synergistic activity of plumbagin and isoniazid in combination against *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*. This activity can be reversed by overexpressing superoxide-dismutase (Bulatovic et al., 2002).

Isoniazid is a prodrug that requires KatG protein to be activated. This enzyme is closely correlated to the effectiveness of this drug. Indeed, activation of isoniazid produces reactive oxygen species as byproducts that affect DNA, proteins, and other macromolecules (Zhang et al., 2004).

In this study,  $\beta$ -lapachone stimulated isoniazid activity as a result of cell damage induced by oxidative stress. Indeed, the increase of superoxide anion raised the active form of KatG. Consequently, further active form of isoniazid was produced when this drug was combined with  $\beta$ -lapachone, a compound that stimulates oxidative stress.

### **Acknowledgements**

This research was supported by Coordenação de Apoio ao Ensino Superior, CAPES, Brazil. The Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos, Universidade Federal de Pernambuco is also appreciated.

## References

Ara M., De Santamaria C.S., Zaballos P., Yus C., Lezcano M.A., 2003. *Mycobacterium chelonae* infection with multiple cutaneous lesions after treatment with acupuncture. Int. J. Dermatol. 42, 642-4.

Bulatovic V.M., Wengenack N.L., Uhl J.R., Hall L., Roberts G. D., Cockerill F. R., Rusnak F., 2002. Oxidative stress increases susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. Antimicrob. Agents Chemoter. 46, 2765-71.

Cruz F.S, Docampo R., Boveris A., 1978. Generation of superoxide anions and hydrogen peroxide from  $\beta$ -lapachone in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 14, 630-33.

D'Albuquerque I.L., Maciel M.C.N., Schuler A.R.P., Araujo M. C. M., Maciel G. M., Cavalcanti M. S. B., Martins D. G., Lacerda A. L., 1972. Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogos inferiores na série da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). Rev. Inst. Antibiot. 12, 31-40.

Duncan K., 2003. Progress in TB drug development and what is still needed. Tuberculosis 83, 201-7.

Falkinhan III J.O., 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9, 177-215.

Guiraud P., Steiman R., Campos-Takaki G.M., Seigle-Murandi F., Buochberg M.S., 1994. Comparison of antimicobacterial and antifungal activities of lapachol and  $\beta$ -lapachone. Planta Med. 60, 373-4.

Hong T., Butler W.R., Hollis F. Floyd M. M., Toney S. R., Tangg Y. W. Steele C., Leggiadro R. J., 2003. Characterization of a novel rapidly growing *Mycobacterium* species associated with sepsis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5650-53.

Li C.J., Zhang L.J., Dezube B.J., Crumpacker C.S., Pardee A.B., 1993. Three inhibitors of type I human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1839-42.

Lima O.G., D'Albuquerque I.L., Lima C.G, Lima M.H.D., 1962. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev. Inst. Antibiot.* 4, 3-17.

Mdluli k., Swanson J., Fischer E., Lee R.E., Barry C.E., 1998. Mechanism involved in the intrinsic isoniazid resistance of *Mycobacterium avium*. *Mol. Microbiol.* 27(6), 1223-33.

Nuermberger E., Grosset J., 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of mycobacterial infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 243-55.

Pardee A.B., LI Y.Z., LI C.J., 2002. Cancer Therapy with beta-lapachone. *Curr. Cancer. Drug. Targets* 2, 227-42.

Portela M.P.M., Vilamil S.H.F., Perissinotti L.J., Stoppani A.O.M., 1996. Redox cycling of o-naphthoquinones in trypanosomatids. *Biochem. Pharm.* 52, 1875-82.

Ribeiro-Rodrigues R., Santos W.G., Oliveira A.B., Snieckus V., Zani C.L., Romanha A.J., 1995. Growth inhibitory effect of naphthofuran and naphthofuranquinone derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Bio. Med. Chem. Letters.* 5, 1509-12.

Santos A.F., Ferraz P.A., Abreu F.C., Chiaki E., Goulart M.D., Sant'ana A.E., 2001. Moluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. *Planta Med.* 67, 92-93.

Schaffner-Sabba K., Schmidt-Ruppin K.H, Wehrli W., Schuerch A.R., Wasley J.E.F., 1984.  $\beta$ -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. J. Med. Chem. 27(8), 990.

Singh R., Wiseman B., Deemagam T., Donald L. J., Duckworth H. W., Carpena X., Fita I., Loewen P. C. 2004. Catalase-peroxidase (KatG) exhibit NADH oxidase activity. J. Biol. Chem. 279, 43098-106.

Telles M.A.S., Yates M.D., 1994. Single and double drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and mycobacteria other than the tubercle (MOTT) bacilli by micro-dilution broth minimum inhibitory concentration (MIC) method. Tubercle. Lung. Dis. 75, 286-90.

Teng R., Dick T., 2003. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. FEMS Microbiol. Letters 227, 171-4.

Tran T., Saheba E., Arcerio A.V., Chaves V., Li Q., Martinez L. E., Primm T. P., 2004. Quinones as antimycobacterial agents. Bio. Med. Chem. 12, 4809-13.

Zhang Y., Heym B., Allem B., Young D., Cole S.T., 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature 358, 591-3.

Table 1. MIC and MBC values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of  $\beta$ -lapachone and isoniazid for *M. fortuitum* and *M. smegmatis*.

Drugs	Isoniazid		$\beta$ -lapachone	
Microorganism	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>M. fortuitum</i>	8	16	32	64
<i>M. smegmatis</i>	8	16	32	64

\*Values are mean of 3 independent observations

**Figure Legends**

Fig.1. In vitro activity at MIC of  $\beta$ -lapachone (●), isoniazid (○) and their combination (□) against *M. fortuitum*. The data represent the mean average of six replicates of three separate experiments. (◆) *M. fortuitum* control.

Fig. 2. In vitro activity at MIC of  $\beta$ -lapachone (●), isoniazid (○) and their combination (□) against *M. smegmatis*. The data represent the mean average of six replicates of three separate experiments. (◆) *M. smegmatis* control.

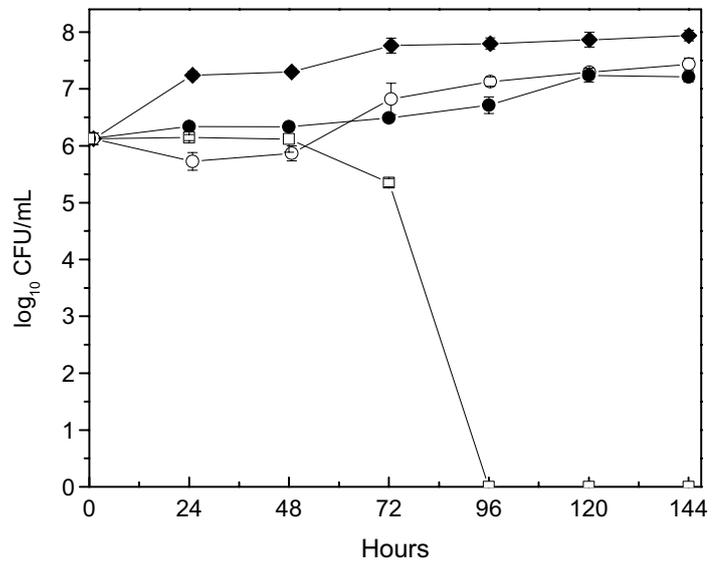


Figure 1

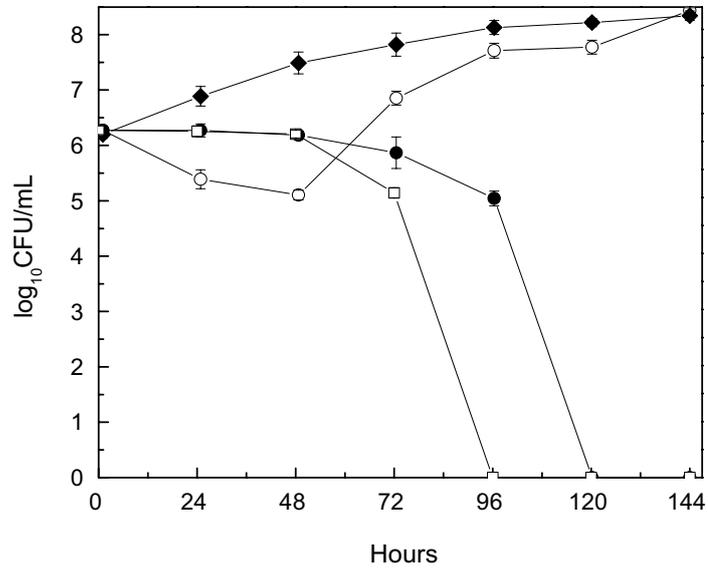


Figure 2

Joás Lucas da Silva

Atividade Bactericida da  $\beta$ -lapachona, da isoniazida...