



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SIBELE RIBEIRO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NOVAS TIAZOLIDINAS E IMIDAZOLIDINAS**

**RECIFE
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SIBELE RIBEIRO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NOVAS TIAZOLIDINAS E IMIDAZOLIDINAS**

de Pós-
gicas da
, como
ítulo de

RECIFE

2010

Oliveira, Sibele Ribeiro de

Avaliação da atividade antimicrobiana de novas tiazolidinas e imidazolidinas/ Sibele Ribeiro de Oliveira. – Recife: O Autor, 2010.

105 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Suely Lins Galdino

Co-orientadora: Norma Buarque de Gusmão

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, 2010.**

Inclui bibliografia e apêndice

**1. Tiazolidina 2. Imidazolidina 3. Atividade antimicrobiana I.
Título.**

615.329

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-192

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVAS
TIAZOLIDINAS E IMIDAZOLIDINAS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sueli Lins Galdino (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Norma Buarque de Gusmão (Co-orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Maria do Carmo Alves de Lima
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Beltrão
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**RECIFE - PE
2010**

*Aos meus pais, Terezinha Ribeiro Alves de Oliveira e Valter Zacarias de Oliveira, meus
maiores incentivadores, em todos os momentos.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver, aprender e crescer a cada dia.

Agradeço a minha família, minha irmã Susile, meu cunhado Israel, minhas princesinhas Beatriz e Ingrid, alicerces na minha vida.

Aos professores do Doutorado em Ciências Biológicas pela dedicação na arte de transmitir seus sábios conhecimentos.

À orientadora Prof^a. Dr^a. Suely Lins Galdino por acreditar no meu trabalho como microbiologista e por seu exemplo de trabalho e sabedoria.

À co-orientadora Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão pela qual tenho um imenso respeito, carinho, gratidão e admiração profissional.

Ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta pelas orientações sempre muito bem direcionadas neste trabalho.

À Prof^a. Kêsia Xisto Ribeiro de Senna pelas orientações fundamentais, amizade constante e incentivo em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis.

À Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima, pela ajuda e participação constantes neste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Maria Camargo de Moraes, pela imensa contribuição na melhoria dessa tese.

À Prof^a. Dr^a. Christina Alves Peixoto e a todos que compõem o Laboratório de Microscopia do CETENE, pela colaboração neste trabalho.

À biomédica Dra. Ana Albertina de Araújo, do Laboratório Central da Prefeitura do Recife, pela amizade sempre e contribuição na aquisição e fornecimento dos espécimes biológicos.

A todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos, em especial, aos membros do Laboratório de Ensaio Antimicrobianos, onde, com muita alegria, recordo meu início, como monitora da disciplina de Exames Bacteriológicos, depois meu mestrado e aos quais agradeço intensamente toda contribuição.

Aos funcionários do Doutorado em Ciências Biológicas (CCB), em especial, Sra. Adenilda Eugênia de Lima, pela colaboração e compreensão.

A todos que compõem a Faculdade ASCES pelas oportunidades e por representarem para mim um “berço” de muito aprendizado pessoal e profissional.

Ao amigo Wallacy Milton do Nascimento Feitosa pelo apoio a mim dispensado e por estar presente em grande parte dos momentos de realização deste trabalho.

Aos amigos do meu coração, Adrya, Catarina, Fernanda, Leonardo, Manuela, Paulo, Rosângela, Rita, Rubens, Walkyria, por fazerem parte da minha vida.

A todos que contribuíram, de maneira direta ou indireta, na realização deste trabalho.

“A falsa ciência cria os ateus, a verdadeira, faz o homem prostrar-se diante da divindade”

Voltaire

RESUMO

A utilização de antibióticos pode ser considerada um dos principais avanços no tratamento de doenças infecciosas desde o século passado, entretanto, a redução da sensibilidade aos agentes antimicrobianos de uso corrente tem aumentado em uma grande variedade de patógenos e a resistência a múltiplas drogas tem sido comum a vários microrganismos. Esta diminuição tem sido observada quando se avalia, por exemplo, o perfil de sensibilidade de bacilos Gram-negativos como *Escherichia coli* frente aos betalactâmicos, uma classe de antibióticos muito utilizada clinicamente. A busca por novos medicamentos que possam trazer maior sucesso nos tratamentos, minimizando os casos de resistência microbiana, tem aumentado significativamente, e a química orgânica, através dos planejamentos e modificações moleculares tem contribuído em grande parte das descobertas. As tiazolidinas e imidazolidinas representam uma classe de compostos de grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e ao extenso espectro de atividades biológicas. Neste trabalho, derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos foram avaliados acerca da atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos. O caldo e o ágar Mueller-Hinton e Sabouraud foram usados para os testes e diluições seriadas dos compostos de concentrações variando entre 128µg/ml e 0,5µg/ml foram preparadas em Dimetilformamida(DMF). Os experimentos foram realizados em microplacas, incubadas em estufa bacteriológica, após as quais o conteúdo foi semeado em placas de Petri, contendo meio sólido, para análise da presença ou ausência de crescimento, sendo considerada a Concentração Inibitória Mínima(CIM) a menor concentração da droga para a qual não havia presença de colônias. Foi verificada atividade antimicrobiana frente a todos os compostos, estando o melhor resultado de CIM igual a 32µg/mL. O derivado imidazolidínico NN-41 foi utilizado para avaliação do efeito sinérgico, quando combinado com o antibiótico ampicilina sobre a bactéria *Escherichia coli* resistente (ATCC 35218). O teste de difusão em meio sólido, após a ação sinérgica, mostrou halo de inibição de 20mm, enquanto a ampicilina isolada mostrou halo 14mm, demonstrando que a combinação resultou em maior ação antibacteriana. A mesma bactéria foi avaliada, via microscopia eletrônica de transmissão acerca das alterações estruturais, após o tratamento com o composto NN-41, sendo observado alterações na morfologia da parede celular, formação de vacúolos e edemas intracelulares. Os resultados sugerem capacidade antimicrobiana dos novos derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos utilizados, inclusive com potencial de utilização frente a uma bactéria Gram negativa multirresistente da espécie *Escherichia coli* de grande interesse clínico.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, tiazolidinas, imidazolidinas

ABSTRACT

The use of antibiotics can be considered a of the mainly advance in the treatment of infeccious disease since in the last century, however, the reduction of the sensitivity the antimicrobial agents in current use increased in the several microorganisms and the resistance to several drugs can be common in many microorganisms. This reduced was observed to consider, for example, the profile of sensitivity of Gram-negative bacilli *Escherichia coli* in front of the betalactamics, a class of antibiotics used in the clinic. The search for new drugs to bring success in the treatments, decreasing the cases of resistance increased and the organic chemistry, through of the plans and molecular change can contributed in several discovery. The tiazolidine and imidazolidine are class of compounds of cientific interesting due to chemistry properties and the wide biologic activities. In this paper, tiazolidine and imidazolidine were tested in front of microorganisms. The Sabouraud and Mueller-Hinton agar and broth were used to the tests and serial dilutions of the compounds of concentration of 128µg/ml or 0,5µg/ml were prepared in Dimetilformamide (DMF). The tests were in microplates, incubation at 37°C, after the contents was inoculated in plates of Petri with agar. The plates are examined for the presence or absence of growth after 18h of incubation at 37°C. The Minimal Inhibitory Concentration (CIM) is considered to be the lowest drug concentration for which there is no microbial growth. Some compounds presented MIC of 32µg/ml. The imidazolidine compound NN-41 was used to assessment of the synergic effect, when combined with the ampicilin antibiotic in front of resistant bacteria *Escherichia coli* (ATCC 35218). The diffusion test in agar, after the synergic effect showed 20 mm, while the only ampicilin showed 14mm, showing that the combination was the better result. The same bacteria was analyzed, by transmission electron microscopy showing structure modifications in the cell wall thickening. The new tiazolidines and imidazolidines were evaluated as potential antimicrobial agents, including activity against a resistant *Escherichia coli* of the large clinical interesting.

Key-words: tiazolidine, imidazolidine, antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Abordagem “triangular” para instituição de terapia antimicrobiana.	19
	Estrutura química das imidazolidinas: (I) 5-benzileno-2-tioxi-imidazolidina-4-ona, (II) 2-amino-5-benzileno-imidazolidina-2,4-	
FIGURA 2	diona, (III) 5,5-difenil-imidazolidina-2,4-diona e (IV) 5-(p-clorofenil)-5-metil-imidazolidina.	25
	Fórmula estrutural do ácido para-amino-benzóico e de algumas	
FIGURA 3	sulfonamidas.	27
FIGURA 4	Fórmula estrutural da trimetaoprim.	28
FIGURA 5	Fórmula estrutural de alguns derivados quinolônicos.	30
FIGURA 6	Etapas metabólicas afetadas por antibióticos.	33
FIGURA 7	Mecanismo de ação dos antibióticos betalactâmicos.	33
FIGURA 8	Mecanismo de ação da polimixina.	34
FIGURA 9	Etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação de antibióticos.	35
FIGURA 10	Etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação de antibióticos.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

CMI	Concentração Mínima Inibitória
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
DAEC	<i>E. coli</i> que adere difusamente
DEC	Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBL	Extended Spectrum betalactamase
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária aos glicopeptídeos
GPIT	Grupo de Pesquisa em Inovações Terapêuticas
HLR	High Level Resistance
ITU	Infecção do Trato Urinário
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PABA	Paraminobenzóico
PBP	Protein Binding Penicilin
PRSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> penicilina resistente
PVL	Leucocidina de Pantón-Valentine
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome MEC
VRE	<i>Enterococcus</i> spp. com resistência à vancomicina

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS **IX**

LISTA DE ABREVIATURAS **X**

SUMÁRIO **XI**

CAPÍTULO 1 **12**

1. INTRODUÇÃO **13**

2. OBJETIVOS **16**

2.1 Objetivo Geral **16**

2.2 Objetivos específicos **16**

3. REVISÃO DA LITERATURA **17**

3.1 Antibióticos **17**

3.2 Busca por novos fármacos **20**

3.3 Uso na clínica de antibióticos de origem sintética x microrganismos testes **21**

3.3.1 Tiazolidinas **22**

3.3.2 Imidazolidinas **23**

3.4 Antibióticos de origem sintética frente à bactérias **25**

3.5 Antibióticos de origem sintética frente à fungos **29**

3.6 Mecanismos de ação **31**

3.7 Microrganismos **36**

3.7.1 Bactérias **36**

3.7.1.1 *Staphylococcus aureus* **36**

3.7.1.2 *Escherichia coli* **38**

3.7.1.3 O gênero *Klebsiella* spp. **40**

3.7.1.4 O gênero *Salmonella* spp. **42**

3.7.1.5 O gênero *Shigella* spp. **44**

3.7.1.6 O gênero *Proteus* spp. **45**

3.7.1.7 O gênero *Pseudomonas* spp. **46**

3.7.1.8 O gênero *Acinetobacter* spp. **48**

3.7.2 Fungos **49**

3.8 Resistência microbiana **52**

3.9 Sinergismo **57**

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
5. CONCLUSÕES	76
CAPÍTULO 2: Artigo 1	77
CAPÍTULO 3: Artigo 2	89
CAPÍTULO 4: Artigo 3	97

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são responsáveis por um grande número de mortes na população em todo mundo. A redução da sensibilidade aos agentes antimicrobianos de uso corrente tem aumentado em uma grande variedade de patógenos e a resistência a múltiplas drogas tem sido comum a vários microrganismos. O perfil de sensibilidade de espécies de bacilos Gram negativos fermentadores de glicose como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* tem diminuído frente aos β -lactâmicos, uma classe de antibiótico muito utilizada clinicamente, composta por: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (BERTONCHELI, et al, 2008). Esses últimos, apresentam amplo espectro de atividades, atuando sobre Gram positivos e Gram negativos, inclusive sobre os bacilos Gram negativos não fermentadores, constituindo a terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves e para aquelas situações causadas por microrganismos resistentes, entretanto, a resistência a esta classe de fármacos tem sido alvo de preocupações entre vários casos de tratamentos que não apresentaram sucesso, como relatado por Superti (2009).

Um dos aspectos relevantes no desenvolvimento de cepas resistentes é o uso inadequado de antibióticos, que afeta a ecologia bacteriana e exerce força seletiva. O problema vem aumentando progressivamente, em paralelo ao uso crescente de drogas antimicrobianas. A prescrição desses medicamentos faz parte do tratamento de 25 a 33% dos pacientes internados e estima-se que, nesses casos, 25 a 50% das drogas sejam usadas incorretamente. Estudos apontam que a sobrevivência dos pacientes internados é significativamente aumentada quando a escolha inicial do antibiótico é apropriada, estando, o custo da resistência bacteriana oscilando anualmente, nos Estados Unidos,

entre 100 milhões e 30 bilhões de dólares (SOUZA, et al., 2008; CASTRO, et al., 2002).

A busca por novos medicamentos que possam trazer maior sucesso nos tratamentos de doenças infecciosas minimizando os casos de resistência microbiana tem aumentado. Nesse contexto, a química orgânica, através dos planejamentos e modificações moleculares tem contribuído em grande parte das descobertas, observando-se um crescimento considerável de compostos sintéticos no uso clínico (VEÇOZA, et al, 2009).

As tiazolidinas e imidazolidinas representam uma classe de compostos sintéticos de grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e ao extenso espectro de atividades biológicas. O anel 4-tiazolidinona possui vários sítios de substituição, o que leva a um grande número de análogos estruturais, podendo-se, desta maneira, obter diferentes atividades biológicas que podem ser atribuídas a grupos substituintes nas posições 2, 3 e 5 do anel, onde promovem modificações nos parâmetros físico-químicos e estruturais (lipofílicos, eletrônicos, polares e esféricos) das moléculas (LIESEN, et al, 2008).

Kavitha, et al, 2006 relataram que 4-tiazolidinonas substituídas em N-3 contendo o grupo 1-[2-amino-1-(4-metóxi-fenil)-etil]-ciclo-hexanol apresentam atividade antimicrobiana significativa para *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma* spp. Os compostos apresentaram menores valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) quando comparados com fármacos padrões, como estreptomicina e nistatina, respectivamente.

Aquino et al, 2008 e Tenório et al, 2004 demonstraram que as tiazolidinonas contendo o grupo ácido acético na posição 5, bem como com uma função aril-hidrazona

substituída na posição 2 do anel tiazolidinônico, possuem consideráveis atividades antibióticas para várias bactérias e fungos.

As imidazolidinas são compostos que contém o sistema hidantoínico. Marton et al, 1993 relataram propriedades antifúngica e antibacteriana da iprodiona [3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioxo-imidazolidina-1-carboxiamida], havendo inibição, ao mesmo tempo, da germinação de esporos e do crescimento de micélios de fungos. As moléculas 5-(aril-metileno)-hidantoínas e 5-(aril-metileno)-2-tio-hidantoínas, obtidas pela condensação de aldeídos aromáticos com hidantoínas ou tio-hidantoínas também apresentaram atividade fungicida e bactericida.

Em 1991, Góes et al relataram a ação antibacteriana apresentada por derivados 5-benzilideno-3-fenil-imidazolidinônicos frente ao *Enterococcus faecalis* e *Mycobacterium smegmatis*, tendo sido também observada a ação antifúngica de alguns derivados desta série frente aos fungos *Candida albicans* e *Neurospora crassa*.

Lima et al, 1992, estudaram a atividade antimicrobiana de derivados 3-(4-cloro-benzil)-5-benzilideno-imidazolidinônicos e observaram, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI), que o derivado com o substituinte NO₂ em posição 4 no grupo benzilideno foi ativo contra *Candida albicans* e *Neurospora crassa* e também frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*.

A atividade antimicrobiana de compostos da série 3-(4-bromo-benzil)-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona variou de 30 a 50 µg/mL para *Candida albicans* e *Neurospora crassa*, enquanto que a CMI para o *Mycobacterium smegmatis* ficou entre 10 e 50 µg/mL (CAVALCANTI AMORIM et al, 1992).

Desta maneira, a utilização de novas tiazolidinas e imidazolidinas com atividade antimicrobiana constituem alternativas terapêuticas para uso frente a microrganismos

isolados na clínica médica atual com potencial de resistência aos fármacos de uso corrente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho contribuiu, no âmbito da Química Medicinal, na avaliação da atividade antimicrobiana de novos agentes tiazolidínicos e imidazolidínicos com potencial de utilização frente a microrganismos patogênicos.

2.2. Objetivos Específicos

- ❑ Avaliar a atividade antimicrobiana de tiazolidinas e imidazolidinas *in vitro* frente à bactérias com potencial patogênico;
- ❑ Analisar a atividade antimicrobiana de tiazolidinas e imidazolidinas *in vitro* frente à leveduras com potencial patogênico;
- ❑ Verificar a atividade antibacteriana frente à microrganismos resistentes;
- ❑ Determinar o sinergismo entre os melhores resultados das tiazolidinas e imidazolidinas com os antibióticos da clínica frente a *Escherichia coli* resistentes;
- ❑ Acompanhar as possíveis modificações ultra-estruturais da bactéria resistente após contato com os melhores compostos tiazolidínicos e imidazolidínicos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Antibióticos

O uso de antibióticos pode ser considerado um dos principais avanços terapêuticos do século passado, sendo moléculas de origem natural, sintética ou semi-sintética, capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos (SILVA, P., 2010).

Cerca de 8.000 substâncias com atividade antimicrobiana são conhecidas a cada ano e centenas de novas substâncias são descobertas, mas, poucas são efetivamente aproveitadas e utilizadas como agentes antimicrobianos, visto que muitas destas não atendem aos requisitos mínimos para seu emprego terapêutico (NWOBIKE, J. C., 2006). Paralelamente, são encontrados cada vez mais microrganismos resistentes, correspondendo a um dos principais desafios dos pesquisadores, visto que a multirresistência vem se tornando diariamente mais disseminada nas populações microbianas, sejam patogênicas ou não (HADADI et al., 2008).

A terapêutica dos antimicrobianos deve ser realizada de forma conscienciosa, levando-se em consideração que o objetivo da administração do fármaco não é, de forma alguma, “esterilizar” o paciente, mas sim coadunar para que a resposta orgânica do hospedeiro possa mais efetivamente resolver o processo infeccioso. Desse modo, antes de se prescrever um antibiótico é lícito ponderar sobre uma série de questões, em especial as relativas ao enfermo, ao patógeno provavelmente implicado e ao antimicrobiano a ser utilizado (Figura 1) (GOLAN et al., 2009; BATISTA et al., 2003).

No paciente infectado, deve-se localizar a infecção e o patógeno envolvido, bem como os fármacos a serem escolhidos, dada a não distribuição homogênea dos medicamentos pelo organismo. No caso de uma infecção do sistema nervoso central por algumas bactérias Gram-negativas, por exemplo, o tratamento é realizado empregando-

se ceftriaxona em vez de aminoglicosídeos, já que esses fármacos não atravessam a barreira hematoencefálica (VERONESI et al., 2010).

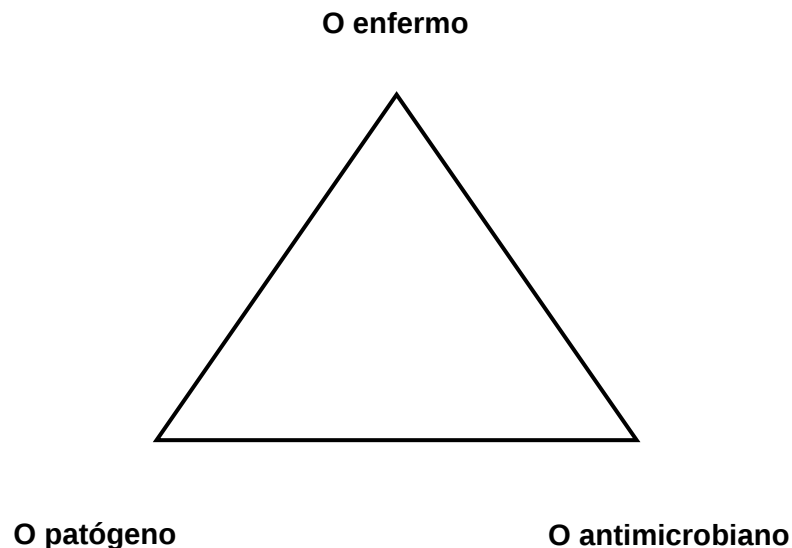


Figura 1. Abordagem “triangular” para instituição de terapia antimicrobiana. Fonte: Batista et al., 2003.

É mister que se leve em consideração, igualmente, a necessidade de uso premente de antimicrobiano (por exemplo, meningite, sepse), a necessidade de coleta de material para estudo microbiológico (necessário na maior parte das vezes – por exemplo, mandatória para todos os doentes hospitalizados ou que requerem hospitalização) e a existência de fatores que possam influenciar na escolha do antimicrobiano, da via de administração e do estado do paciente, como gravidez, insuficiência renal, distúrbios da função circulatória, história de alergias medicamentosas (a qual deverá ser sempre investigada), entre outros (KESTER et al., 2008).

A partir da anamnese e exame físico minuciosos é quase sempre possível estabelecer o provável foco infeccioso do paciente. Isso tem importância na suspeição dos possíveis patógenos implicados, muitas vezes com estimativas da sensibilidade a antimicrobianos (por exemplo, diferenciando-se a infecção como comunitária ou hospitalar). É assim, pois, que se pensaria em *Streptococcus pneumoniae* causando

pneumonia comunitária típica, *Escherichia coli* nas infecções comunitárias do trato urinário, *Staphylococcus epidermidis* na sepse associada a cateter venoso profundo (CESTARI et al., 2008).

Desta maneira, antes da instituição da terapia antimicrobiana o patógeno provável deverá ser considerado, prescrevendo-se assim um fármaco com ação sobre o microrganismo em questão, respeitadas as considerações sobre as características do paciente (OLSON et al., 2009; BATISTA et al., 2003).

Segundo Veronesi et al. (2010), somente após as ponderações acerca do enfermo e do patógeno estarem claras, é que se justifica iniciar a escolha do melhor antimicrobiano a ser usado, sendo importante a determinação de alguns conceitos extremamente úteis, como: (1) Concentração Mínima Inibitória (CMI), que trata-se da menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento de bactérias após 18 a 24 horas em cultura; (2) Susceptibilidade, que é definida pela ocorrência de níveis séricos/tissulares de antimicrobianos superiores à concentração inibitória mínima; sendo que quando esta é maior que os níveis do fármaco fica caracterizada a resistência; (3) Sinergismo, conceituado como uma otimização da atividade antimicrobiana quando se empregam dois fármacos simultaneamente e o resultado da associação é superior ao obtido com cada antibiótico isoladamente. Como exemplos de importância na prática clínica mencionam-se a associação ampicilina + gentamicina para *Enterococcus* spp, ceftazidima + ampicilina para infecções graves por Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, e na febre em neutropênicos; (4) Atividade bactericida, onde fármacos que possuem esta característica são capazes de destruir microrganismos independentemente dos mecanismos de defesa do hospedeiro (por exemplo, antibióticos β -lactâmicos), sendo o antibiótico chamado de bacteriostático se houver apenas inibição do crescimento sem lise do patógeno (por exemplo, tetraciclina). Sem embargo, um

antibiótico caracteristicamente bactericida pode ser bacteriostático em alguns casos (por exemplo, ampicilina para *Enterococcus* spp) e vice-versa (clorafenicol, tipicamente bacteriostático, é bactericida para *Neisseria meningitidis* no liquor); (5) Via de administração, levando-se em consideração que os antimicrobianos podem ser administrados por distintas vias: uso tópico, uso em aerossol, uso retal, uso intracavitário, uso intrarraquiano e intraventricular, uso intramuscular, uso intravenoso e uso oral, de acordo com a importância de uso de cada uma delas (SOUZA et al., 2008; ULLMANN et al., 2007; MARTON et al., 1993).

3.2 Busca por novos fármacos

A descoberta, na década de 30, do primeiro antibiótico útil representou um marco na busca de novos fármacos e estimulou a pesquisa intensiva de substâncias de atividade antimicrobiana, prática que continua até os dias de hoje. Mais de 6.000 antibióticos já foram convenientemente isolados e identificados, e a cada ano 100 novas alternativas são introduzidas, apesar de poucos serem realmente novos (SILVA, 2010).

Os antibióticos estão entre os fármacos mais utilizados, correspondendo a 30% do total de medicamentos administrados em pacientes hospitalizados. O uso inadequado e a consequente resistência levam a uma necessidade cada vez maior de novos antimicrobianos e contribuem para os custos cada vez maiores da assistência farmacêutica (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Os avanços, sobretudo da química orgânica sintética e da química analítica tornaram possível a síntese de moléculas antes provenientes de fontes naturais, especialmente vegetais, e também daquelas não encontradas na natureza. Estima-se que tenham sido

identificadas, até o presente, mais de 5 milhões de substâncias químicas, das quais cerca de 63.000 são de uso corrente e, dessas, aproximadamente 6.000 são fármacos.

A maioria dos fármacos são de origem sintética ou semi-sintética, e, dos 277 fármacos utilizados, além de nove associações, constantes na relação dos fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde, 143 (51,6%) foram obtidos por síntese, 28 (8%) provenientes de fontes minerais, 22 (7,9%) de órgãos animais, 20 (7,2%) de origem microbiana, 14 (5%) são vacinas e 8 (2,9%), soros (SILVA, 2010).

As perspectivas de uso de novos fármacos no tratamento de infecções bacterianas têm levado vários pesquisadores à busca de novos caminhos, principalmente com o problema da resistência bacteriana (BERTONCHELI, *et al*, 2008). Nenhuma nova classe de antibióticos foi licenciada desde as décadas de 70, 80 e 90 (WENZEL, R. P., 2004). Em 2000, oxazolidinas (linezolida) e lipopeptídeos cíclicos com novos modelos de ação foram aprovados para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. O foco tem sido, principalmente, nos fatores de virulência e não nos microrganismos, onde a biologia molecular e a genômica tem sido utilizada com frequência (KHARDORI, N., 2006).

A química orgânica, através de novos planejamentos e modificações moleculares tem contribuído em grande parte das pesquisas mais recentes, observando-se um crescimento considerável de compostos sintéticos com potencial de uso clínico (VERÇOZA *et al.*, 2009; CAVALCANTI AMORIM *et al.*, 1992).

3.3 Uso na clínica de antibióticos de origem sintética X microrganismos testes

Os antibióticos diferem acentuadamente nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e nos mecanismos de ação (GOODMAN &

GILMAN, 2003). Quimioterápicos e antibióticos podem ter ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e ainda antituberculosa. Esta ação pode levar à inibição do crescimento, à inativação ou à morte do agente infeccioso. A estrutura química dos quimioterápicos e antibióticos é bastante variada pelo fato de serem compostos orgânicos cíclicos. Os principais grupos são: betalactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifamicinas, macrolídeos, polipeptídeos, clorafenicol, quinolonas, sulfonamidas, trimetopim e metronidazol (SILVA, P., 2010).

3.3.1 Tiazolidinas

As tiazolidinas representam uma classe de compostos de grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e ao extenso espectro de atividades, havendo um grande número de análogos estruturais. As mais importantes atividades são: antibacteriana, antifúngica, antidiabética, cardiotônica, analgésica, anticonvulsivante e atividades inibitórias sobre lipoxigenases (TUNÇBILEK, et al., 1999). As diferentes atividades biológicas podem ser atribuídas a grupos substituintes nas posições 2, 3 e 5 do anel oxazolidinona, que promovem modificações nos parâmetros físico-químicos e estruturais (lipofílicos, eletrônicos, polares e esféricos) das moléculas (LIESEN *et al*, 2008).

Bonde et al. 2004 descreveram a síntese, a atividade antimicrobiana e os estudos hemolíticos de pirazina contendo tiazolidinas e derivados tiazolidínicos, sendo realizado testes com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *Mycobacterium tuberculosis*.

Kavitha et al. 2006 relataram que 4-tiazolidinonas substituídas em N-3 contendo o grupo 1-[2-amino-1-(4-metóxi-fenil)-etil]-ciclo-hexanol apresentam atividade significativa para *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma spp*. Os compostos

apresentaram menores valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) quando comparados com fármacos padrões, como estreptomicina e nistatina.

Os testes antimicrobianos realizados com derivados 4,1, tiazolidinas, onde o anel oxazolidinona teve o átomo de oxigênio trocado pelo átomo de enxofre, obtiveram eficientes resultados de atividade antibiótica, maiores que a ampicilina, usada como referência (PIRNAU et al., 2008).

Os compostos 4-tiazolidinonas, contendo o grupo ácido acético na posição 5, bem como com uma função aril-hidrazona substituída na posição 2 do anel tiazolidinônico, possuem consideráveis atividades antibióticas para várias bactérias e fungos (TENÓRIO et al., 2004; AQUINO et al., 2008).

3.3.2 Imidazolidinas

A imidazolidina-2,4-diona foi descoberta em 1861 por Bayer durante um trabalho com ácido úrico. Em 1875 Bayer sintetizou a imidazolidina-2,4-diona pela primeira vez através do aquecimento do bromo-acetiluréia com amônia alcoólica, mais tarde Harries e Weiss em 1900 obtiveram a imidazolidina-2,4-diona a partir do éter etílico de glicina e cianato de potássio em presença do ácido clorídrico (ELDERFIELD et al., 1957; FINKBEINER, 1965).

Em 1899, Ruhemann e Cunnington obtiveram derivados do 5-benzilideno imidazolidínicos pelo aquecimento do fenil proprionato de etila com uréia em solução alcoólica na presença de etóxido de sódio, onde substituiu a uréia pela tioúreia e guanidina, obtendo o 5-benzilideno-2-tioxo-imidazolidin-2-ona e o 2-amino-5-benzilideno-imidazolidin-4-ona (Figura 2) (JOHNSON et al., 1915).

As imidazolidinas ou hidantoínas e seus derivados são uma classe de substâncias que despertam grande interesse, por apresentarem importantes atividades

farmacológicas, tais como anticonvulsivante, antiarrítmico e no tratamento de complicações diabéticas crônicas. Estes compostos também promoveram agregação de plaquetas e inibição da aldose redutase. As imidazolidinas possuem um grupo metilênico muito reativo no carbono-5, o que permite a síntese de inúmeros derivados a partir da condensação com aldeídos aromáticos (ROSSI, 2005).

A partir de modificações estruturais no anel imidazolidínico, foi observado que a 5,5-difenil-imidazolidina-2,4-diona e a 5-(*p*-clorofenil)-5-metil-imidazolidina-2,4-diona (Figura 2) apresentava atividade frente a vermes adultos em *Schistosoma mansoni* de ratos infectados (ALBUQUERQUE et al., 1999).

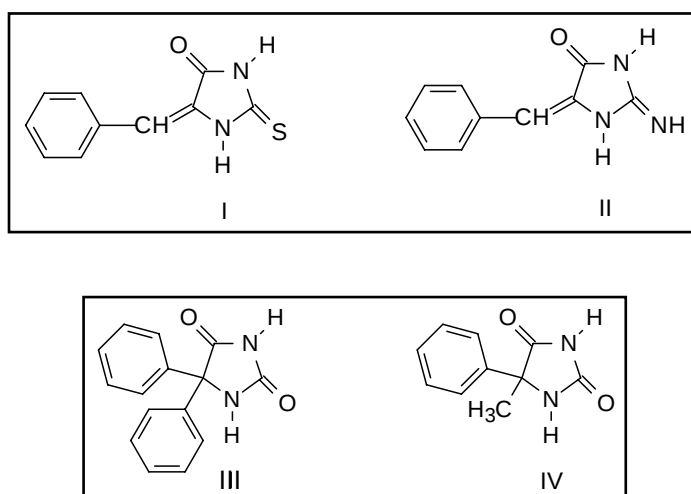


Figura 2. Estrutura química das imidazolidinas: (I) 5-benzilideno-2-tioxo-imidazolidina-4-ona, (II) 2-amino-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona, (III) 5,5-difenil-imidazolidina-2,4-diona e (IV) 5-(*p*-clorofenil)-5-metil-imidazolidina-2,4-diona.

Derivados imidazolidínicos, sintetizados por nossa equipe no Grupo de Pesquisa em Inovações Terapêuticas (GPIT), ressaltam a contribuição química do núcleo imidazolidínico. Os resultados já obtidos com derivados imidazolidinônicos-3,5-substituídos revelam que estas moléculas apresentam significativa atividade esquistossomicida. Alguns desses derivados já se encontram patenteados pelo CNPq sob

o número de depósito 000362/03 em 02/10/2003, e vários em fase de desenvolvimento (OLIVEIRA et. al., 2004; ALBUQUERQUE et. al., 2005; GÓES et al., 1991; LIMA et al., 1992).

Este mesmo grupo publicou em 2008 um trabalho de revisão que abordou a relação estrutura, reatividade e propriedades biológicas da hidantoína (imidazolidina-2,4-diona), que é um 2,4-dicetotetrahidroimidazol descoberto por Bayer em 1861. As tiohidantoínas e derivados foram preparados, tendo propriedades químicas similares correspondendo aos compostos carbonil. Algumas atividades biológicas como anticâncer, antimicrobiana, anticonvulsivante, esquistossomicida são atribuídas à reatividade química e consequente afinidade dos anéis hidantoínicos à biomacromoléculas. Ademais, o conhecimento sobre a química das hidantoínas têm aumentado muito nas investigações científicas (OLIVEIRA et al., 2008).

Os complexos contendo ligantes hidantoínicos tem sido reportados por possuir atividade citotóxica/antitumoral. Alguns derivados hidantoínicos tais como ditienilhidantoína, 5,5-dipiridilhidantoína, espirohidantoínas e hidantoínas 3,5-substituídas exibem atividades antiviral, anticonvulsivante e citotóxica (RAJIC et al., 2006; BAKALOVA. et al., 2005).

El-Shariel et al. 2009 relataram atividades antibacteriana e antifúngica de novos tipos de imidazolidinas, realizando testes com *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*.

3.4 Antibióticos de origem sintética frente à bactérias

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterápicos eficazes a serem utilizados por via sistêmica na prevenção e na cura de infecções bacterianas em seres humanos. A considerável importância de sua descoberta para a medicina e a saúde e sua

ampla utilização subsequente refletiram-se rapidamente no acentuado declínio observado nos índices de morbidade das doenças infecciosas tratáveis. O advento da penicilina e, posteriormente, de outros antibióticos diminuiu a utilidade das sulfonamidas, de modo que, no momento, ocupam um lugar relativamente pequeno no arsenal terapêutico médico. A introdução da combinação de trimetoprim e sulfametoxazol, em meados da década de 1970, resultou em maior utilização das sulfonamidas na profilaxia e/ou no tratamento de infecções microbianas específicas (SILVA, P., 2010).

As sulfonamidas possuem ampla faixa de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Entretanto, nos últimos anos, tornou-se comum o desenvolvimento de cepas resistentes, de modo que a utilidade desses fármacos declinou correspondentemente. Em geral, as sulfonamidas só exercem efeito bacteriostático, e os mecanismos de defesa celular e humoral do hospedeiro são indispensáveis para a erradicação final da infecção (BELDA JÚNIOR et al., 2005).

O termo sulfonamida é utilizado como nome genérico para referir-se a derivados da para-aminobenzenossulfonamida (sulfanilamida). A Figura 3 apresenta a fórmula da sulfanilamida e os principais derivados que, de acordo com as substituições, podem gerar compostos mais ativos de maior ou menor absorção e eliminação (SPRINGHOUSE, C. 2010). A maioria é relativamente insolúvel em água, porém os sais de sódio são rapidamente solúveis. Todos os requisitos estruturais mínimos para ação antibacteriana estão reunidos na própria sulfanilamida. O grupo $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ não é essencial em si, mas tem a importante característica de o enxofre estar diretamente ligado ao anel benzeno. O grupo para- NH_2 é essencial e só pode ser substituído por radicais capazes de serem convertidos *in vivo* em grupo amino livre. As substituições efetuadas no grupo amida NH_2 exercem efeitos variáveis sobre a atividade

antibacteriana da molécula. Todavia, a substituição dos núcleos aromáticos heterocíclicos produz compostos altamente potentes (GOODMAN & GILMAN, 2003).

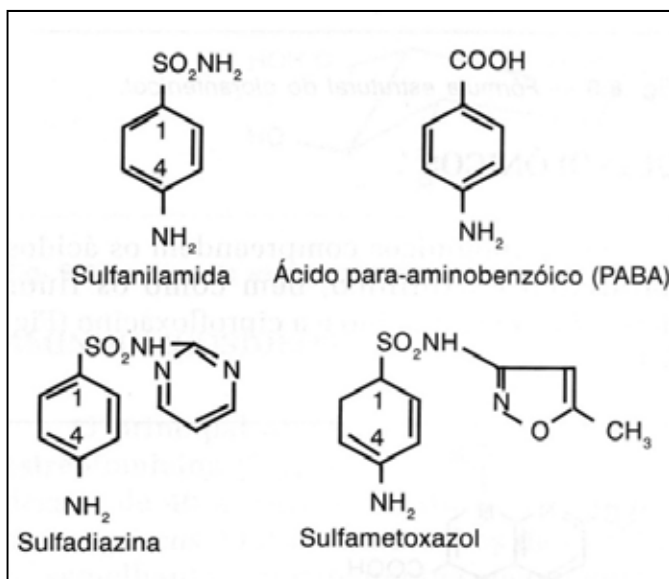


Figura 3. Fórmula estrutural do ácido para-amino-benzóico e de algumas sulfonamidas.
Fonte: Batista et al., 2003.

A resistência às sulfonamidas está sendo cada vez mais um problema, mas *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Calymmatobacterium granulomatis* e *Chlamydia trachomatis* ainda continuam sensíveis *in vitro* às sulfonamidas. Embora tenham sido utilizadas com sucesso no tratamento de infecções meningocócicas durante muitos anos, a maioria das cepas isoladas de *Neisseria meningitidis* dos sorogrupos B e C nos EUA e os isolados do grupo A de outros países tornaram-se resistentes. Prevalece uma situação semelhante com relação ao gênero *Shigella*. As cepas de *E. coli* isoladas de pacientes com infecções do trato urinário (adquiridas na comunidade) são frequentemente resistentes às sulfonamidas, de modo que estas não constituem mais a terapia de escolha para essas infecções (BELDA JÚNIOR et al., 2002).

O trimetoprim, usado em associação com as sulfas, é um derivado diaminopirimidínico, cuja fórmula pode ser vista na Figura 4 (SPRINGHOUSE, C. 2010). A introdução da combinação constituiu um importante progresso no desenvolvimento de antimicrobianos clinicamente eficazes, tendo como resultado um efeito sinérgico. Os microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos são, em sua maioria, sensíveis ao trimetoprim; todavia, pode-se verificar o desenvolvimento de resistência quando o fármaco é utilizado isoladamente. Em geral, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis* e o gênero *Enterococcus* spp. mostram-se resistentes. Tem-se verificado uma variação significativa na sensibilidade das *Enterobacteriaceae* ao trimetoprim, devido à disseminação da resistência mediada por plasmídeos e transposomas (SILVA, P., 2010).

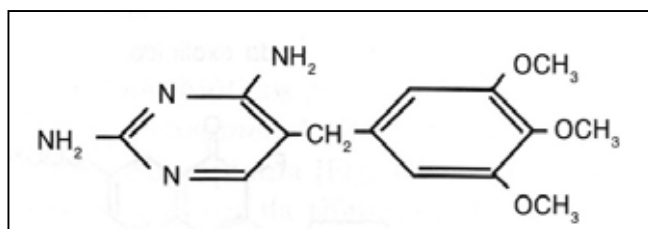


Figura 4. Fórmula estrutural da trimetoprim. Fonte: SPRINGHOUSE, C. 2010.

As quinolonas (Figura 5), os membros mais antigos da classe dos antimicrobianos sintéticos, em virtude de seu amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bacilos Gram-negativos aeróbicos, estafilococos e cocos Gram-negativos e de sua biodisponibilidade oral, constituem uma classe muito importante de antibióticos. As aplicações terapêuticas incluem o tratamento das infecções do trato urinário, da prostatite, de várias doenças sexualmente transmissíveis, da osteomielite e da diarreia bacteriana (GOODMAN & GILMAN, 2003).

A introdução das 4-quinolonas fluoradas, como ciprofloxacina e ofloxacina, representaram um avanço terapêutico importante, visto que esses fármacos mostram-se eficazes após administração oral no tratamento de uma grande variedade de doenças infecciosas. Os compostos quinolônicos disponíveis para uso clínico contêm um ácido carboxílico na posição 3 da estrutura em anel básica. As fluoroquinolonas mais recentes também contêm um substituinte flúor na posição 6 e muitos desses compostos possuem uma porção de piperazina na posição 7. São potentes bactericidas contra *Escherichia coli* e várias espécies de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacteri* spp., *Campylobacter* spp. e *Neisseria* spp. Várias novas fluoroquinolonas possuem atividade contra bactérias anaeróbicas, incluindo trovafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, clinafloxacino e sitafloxacino (CASTRO et al., 2002; CLEELAND et al., 1986).

Pode-se verificar o desenvolvimento de resistência às quinolonas durante a terapia em decorrência de mutações nos genes cromossômicos bacterianos que codificam a DNA girase ou a topoisomerase IV, ou devido ao transporte ativo do fármaco para fora da bactéria (OETHINGER et al., 2000). Não foi identificada nenhuma atividade de modificação ou inativação das quinolonas nas bactérias (OKUSN et al., 1996). A resistência aumentou após a introdução das fluoroquinolonas, especialmente, em *Pseudomonas* spp. e estafilococos (PEGUES et al., 1998; PETERSON et al., 1998). Além disso, está sendo observada uma resistência crescente às fluoroquinolonas em *Clostridium jejuni*, *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Streptococcus pneumoniae* (SMITH et al., 1999).

Novas fluoroquinolonas promissoras estão sendo introduzidas e apresentam maior espectro de atividade antimicrobiana, incluindo, em alguns casos, eficácia contra infecções por microrganismos Gram-positivos e anaeróbicos. A melhor atividade das novas quinolonas contra cepas de pneumococos resistentes à penicilina e às

cefalosporinas e contra os microrganismos atípicos da pneumonia é responsável pelo papel cada vez mais importante desses agentes no tratamento empírico da pneumonia (GUSATTI et al., 2009).

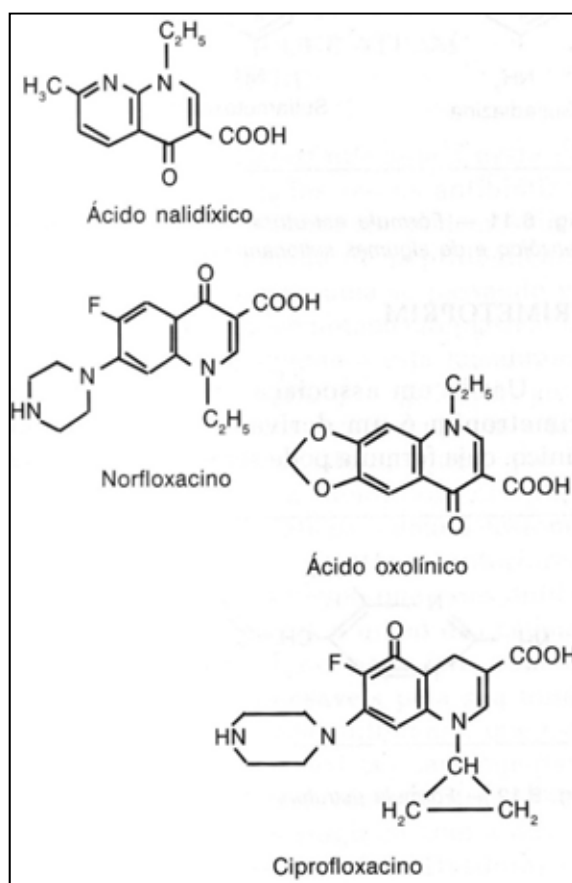


Figura 5. Fórmula estrutural de alguns derivados quinolônicos. Fonte: Batista et al., 2003.

3.5 Antibióticos de origem sintética frente a fungos

Os antifúngicos azólicos, compostos totalmente sintéticos, são notáveis como classe de fármacos pelo seu amplo espectro, pela biodisponibilidade oral e pela baixa toxicidade (SILVA, P., 2010). O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da esterol-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e

levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo. Os azóis causam menos reações adversas que a anfotericina B, mas são menos potentes que a mesma e podem ter ação fungistática ou fungicida. O uso excessivo dos azóis levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis, além disso, os azóis ainda apresentam a desvantagem da resistência cruzada (LEMKE, 2002).

Os azóis incluem duas grandes classes: os imidazólicos e os triazólicos, ambos com o mesmo espectro antifúngico e o mesmo mecanismo de ação. Os triazólicos sistêmicos são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeito sobre a síntese de esteróis humanos do que os imidazólicos (GOODMAN & GILMAN, 2003). Devido a essas vantagens, os novos congêneres em desenvolvimento são, em sua maioria, triazólicos, e não imidazólicos. Entre os fármacos comercializados, o clotrimazol, o miconazol, o cetoconazol, e econazol, o butoconazol, o oxiconazol e o sulconazol são imidazólicos; o terconazol, o itraconazol, o fluconazol (GONÇALVES et al., 2007).

Os testes de sensibilidade com antifúngicos azólicos não são úteis para prever quais espécies de fungos irão responder à terapia. Embora os fármacos individuais tenham seu próprio espectro de utilidade, os azólicos, com um todo, apresentam atividade contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e dermatófitos. Os *Aspergillus* spp. exibem sensibilidade intermediária. A *Candida krusei* e os agentes causadores da antiparasitária útil, com a possível exceção do seu efeito antiprotozoário contra *Leishmania major*.

A resistência aos antifúngicos azólicos surgiu gradualmente durante a terapia prolongada e foi responsável por fracassos clínicos em pacientes com infecção avançada

pelo HIV e candidíase orofaríngea ou esofágica. O mecanismo primário de resistência em *Candida albicans* consiste no acúmulo de mutações no ERG 11, o gene que codifica a C14- α esterol desmetilase. Essas mutações parecem proteger o heme na bolsa enzimática de sua ligação ao azol, mas permite o acesso do substrato natural da enzima, o lanosterol. Ocorre resistência cruzada a todos os azólicos. O aumento do efluxo dos azólicos através de cassete de ligação ao ATP e os transportadores da superfamília de facilitadores principais podem contribuir para a resistência de *Candida albicans* e *C. glabrata* ao fluconazol (SILVA, P., 2010).

3.6 Mecanismos de ação

Os antibióticos e os quimioterápicos interferem com diferentes atividades da célula bacteriana, causando a sua morte ou somente inibindo o seu crescimento (Figura 6). Podem atuar no nível da parede celular, na membrana citoplasmática, à nível dos ribossomos, à nível de DNA e sobre o metabolismo intermediário (TORTORA et al., 2005).

Os mais empregados são os betalactâmicos, que interferem na parede celular, impedindo a união das cadeias peptídicas. As proteínas fixadoras de penicilinas (*protein binding penicilin* ou PBP) na parte externa da membrana citoplasmática, que participam da síntese da camada de peptideoglicano, possuem a capacidade de se fixar tanto às penicilinas quanto às cefalosporinas. Os antibióticos betalactâmicos interferem com a síntese de peptideoglicano através de vários mecanismos que não são idênticos para todos eles. Por exemplo, se tratarmos uma cultura de *Escherichia coli* com cefalexina (uma cefalosporina), as células que proliferam em presença do antibiótico formam grandes filamentos porque são incapazes de sofrer o processo de divisão normal (MURRAY et al., 2006; KONEMAN et al., 1997).

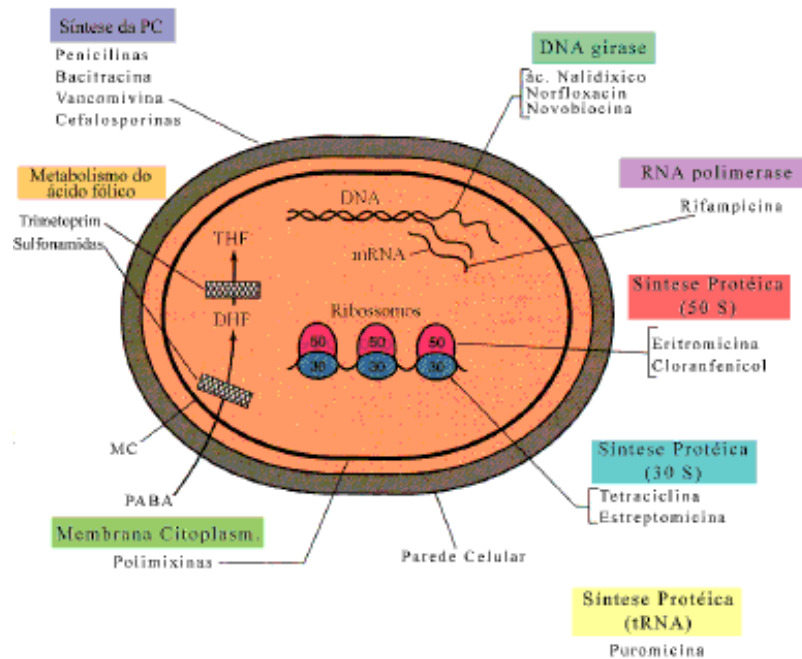


Figura 6. Etapas metabólicas afetadas por antibióticos (Adaptado de Madigan et al., Brock Biology of Microorganisms, 2003).

De uma maneira geral, os betalactâmicos inibem o crescimento do peptideoglicano, interferindo com a função de várias enzimas que participam da sua síntese final (Figura 7). Indiretamente, estes antibióticos aumentam também a atividade das autolisinas, enzimas que participam da formação do peptideoglicano, através da abertura de espaços, onde são adicionadas novas unidades de ácido N-acetil murâmico e N-acetilglicosamina sintetizadas pela célula (TORTORA et al., 2005).

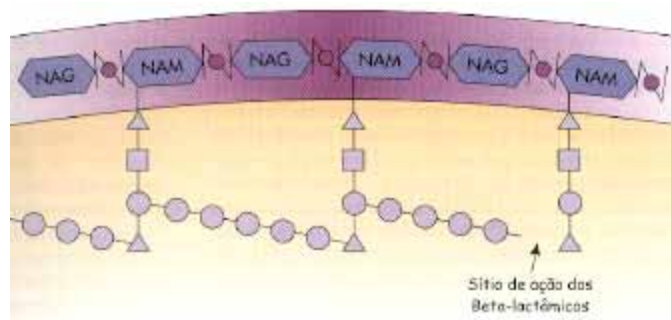


Figura 7. Mecanismo de ação dos antibióticos betalactâmicos (adaptado de Atlas, R.M., Principles of Microbiology, 1997)

Os antimicrobianos que atuam no nível da membrana citoplasmática assemelham-se aos detergentes catiônicos, graças à presença, em sua molécula, de grupamentos básicos (NH_3^+) e de uma cadeia lateral de ácido graxo. Quando alcançam a membrana citoplasmática, o ácido graxo mergulha na sua parte lipídica e a porção básica permanece na superfície (Figura 8).

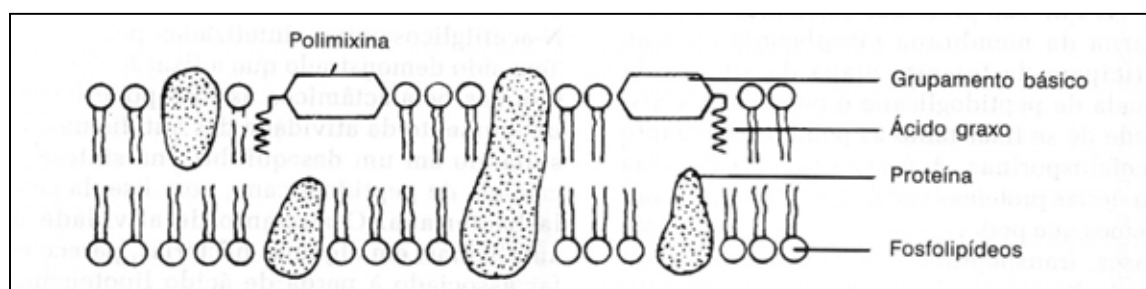


Figura 8. Mecanismo de ação da polimixina. Fonte: Batista et al., 2003.

A intercalação das moléculas do antibiótico na membrana provoca sua desorganização, com saída dos componentes celulares e morte da bactéria. Não obstante a semelhança das membranas citoplasmáticas, em geral, as polimixinas são mais ativas contra as bactérias porque não reagem com os fosfatídeos de colina, presentes apenas na célula animal. (BUTEL et al., 2008)

Embora a síntese protéica seja muito semelhante nas bactérias e nas células do hospedeiro, existem diferenças entre seus ribossomos, sendo que em uma delas os coeficientes de sedimentação são, respectivamente, 70S e 80S. Estas diferenças explicam a ação seletiva dos aminoglicosídeos. (TORTORA et al., 2005; MURRAY et al., 2006)

Aminoglicosídeos, tetraciclina, clorafenicol, eritromicina, lincomicina e clindamicina atuam no nível dos ribossomos. Os aminoglicosídeos e as tetraciclina se

fixam às subunidades 30S e os outros antibióticos, às subunidades 50S. Ao se fixarem, inibem a síntese protéica por diferentes mecanismos (Figura 9).

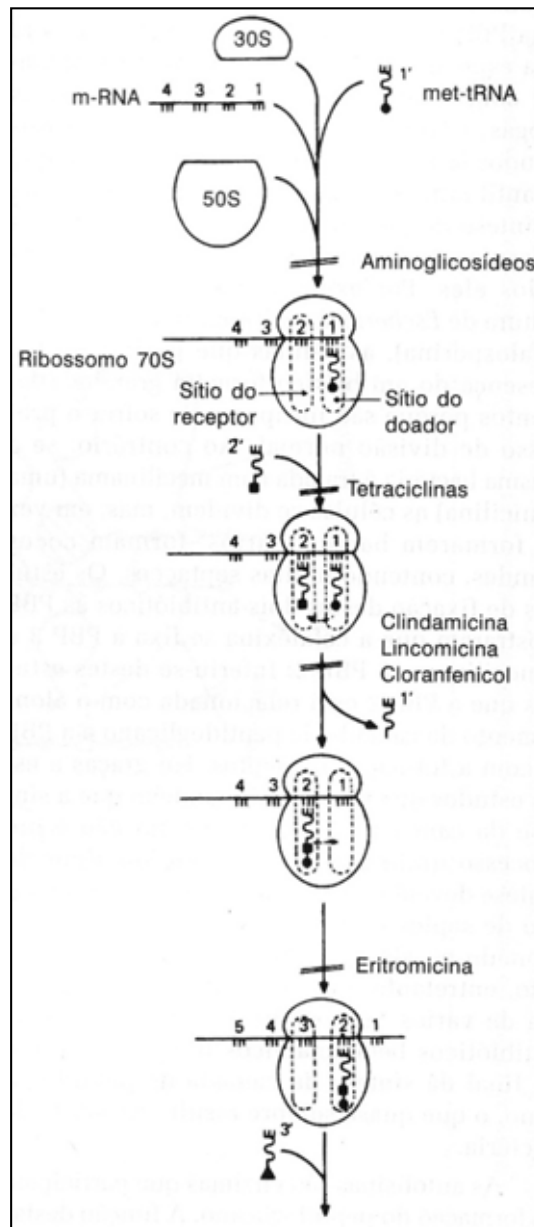


Figura 9. Etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação de antibióticos. Fonte: Batista et al., 2003.

Os aminoglicosídeos provocam vários tipos de alteração, sendo a mais importante a formação de ribossomos não-funcionais. A estreptomicina se fixa apenas a uma proteína da fração 30S do ribossomo, enquanto que a canamicina, gentamicina e, provavelmente, os demais fixam-se a várias proteínas. Esta característica explica a elevada taxa de mutação para resistência à estreptomicina.

As tetraciclinas bloqueiam a síntese protéica porque, quando fixadas à subunidade 30S, impedem a fixação dos RNA transportadores (t-RNA) ao ribossomo. Desta maneira não ocorre incorporação de novos aminoácidos e a cadeia peptídica não se forma. Enquanto que a eritromicina bloqueia a síntese protéica porque, quando fixada à subunidade 50S, impede os movimentos de translocação (TORTORA et al., 2005).

Clorafenicol, lincomicina e clindamicina, aparentemente, possuem o mesmo mecanismo de ação, que seria impedir a união dos aminoácidos pela inibição da peptidiltransferase (MURRAY et al., 2006).

O metronidazol, os derivados quinolônicos e as rifampicinas atuam no nível do DNA. O metronidazol, ao entrar na célula bacteriana, é reduzido e se transforma em produtos tóxicos, que se intercalam na molécula de DNA quebrando-a. Deste modo, o metronidazol pode ser considerado um quimioterápico que impede a síntese de DNA sendo, portanto, bactericida.

As rifampicinas combinam-se de maneira irreversível com as RNA-polimerases, bloqueando a transcrição do DNA. Como esta combinação é irreversível, estes antibióticos são bactericidas e sua ação seletiva é explicada pelas diferenças existentes entre as RNA-polimerases de bactérias e do hospedeiro.

Os derivados quinolônicos também interferem com a síntese de DNA, inibindo a ação das girases. A função destas enzimas é promover o enrolamento das moléculas de

DNA, para que ocupem um menor espaço dentro da célula. (TORTORA et al., 2005; MURRAY et al., 2006)

As sulfonamidas e o trimetoprim atuam no nível do metabolismo intermediário. O segundo interfere com a síntese do ácido tetraidrofólico, sendo que as primeiras bloqueiam a transformação do ácido paraminobenzóico (PABA) em ácido diidropteróico e, o trimetoprim, a transformação do ácido diidrofolico em ácido tetraidrofólico (Figura 10). Este último é necessário para a síntese de purinas, metionina, timina e serina. Este ácido é a coenzima que promove o transporte de unidades de um só carbono, de uma molécula para outra, nos processos metabólicos. (BUTEL et al., 2008)

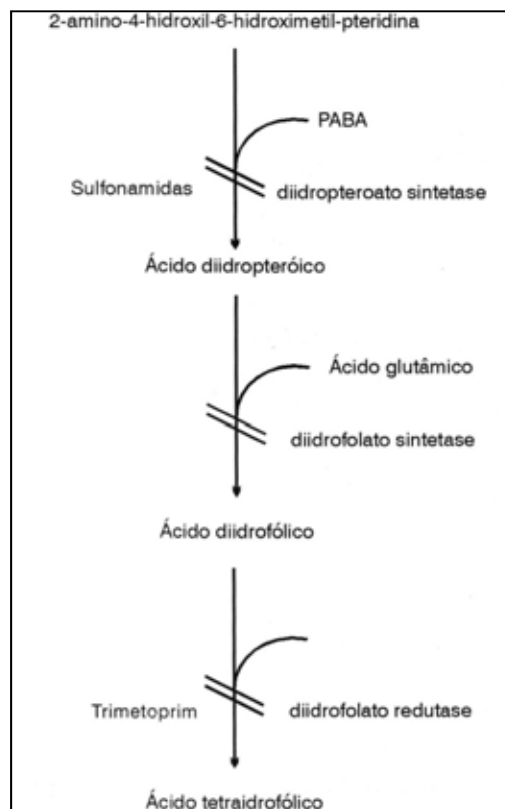


Figura 10. Etapas da síntese protéica bloqueadas pela ação de antibióticos. Fonte: Batista et al., 2003.

3.7 Microrganismos

3.7.1 Bactérias

3.7.1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* apresentam a forma esférica e se coram de violeta pelo método de Gram, com reação positiva. São importantes patógenos humanos, causando um amplo espectro de doenças sistêmicas potencialmente fatais; infecções cutâneas, de tecidos moles, ossos e das vias urinárias; e infecções oportunistas (MURRAY et al., 2006). Um das espécies mais comumente associadas a doença humana é o *Staphylococcus aureus*, tendo seu nome em virtude da formação de colônias douradas em consequência dos pigmentos carotenóides que formam durante o crescimento (TORTORA et al., 2005).

O *Staphylococcus aureus* faz parte da microbiota natural, principalmente da pele, podendo tornar-se patogênico em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. Os traumas que comprometem a integridade da barreira cutânea constituem-se na principal causa de mudança de comportamento deste microrganismo (BARRAVIERA, 1994; FERREIRA et al., 1995).

As infecções mais comuns envolvem a pele (celulite, impetigo) e feridas em sítios diversos, algumas infecções são agudas, piogênicas e podem disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais, são também encontrados frequentemente. Portadores nasais e pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* têm sido descritos como fator de risco para o desenvolvimento de infecções, e 11% a 43% dos pacientes colonizados

adquirem infecção. O aspecto do processo infeccioso depende dos fatores de virulência do patógeno e de mecanismos de defesa do hospedeiro (LOWY, 1998).

Os isolados de *Staphylococcus aureus* que apresentam resistência à meticilina são denominados MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), e representam um importante patógeno nosocomial. Vários fatores de risco estão relacionados com aquisição deste microrganismo: internação em unidade de tratamento intensivo, prolongada hospitalização, doença de base grave, procedimentos invasivos e exposição prolongada ou repetida aos antimicrobianos. A resistência à meticilina é determinada pelo *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec), que carrega o gene *mecA*, o qual apresenta baixa afinidade por todos os antimicrobianos betalactâmicos (ITO et al., 2004).

Tradicionalmente, as infecções causadas por este patógeno estavam limitadas aos hospitais, porém, a partir da década passada, infecções foram descritas em todo o mundo, de forma crescente em crianças e adultos provenientes da comunidade, sem os tradicionais fatores de risco, e foram denominados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associados ou adquiridos na comunidade (CA-MRSA). As síndromes clínicas causadas por estes isolados se estendem de infecções de pele e partes moles até pneumonia e sepse grave (MONACO et al., 2005).

Os isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associados ou adquiridos na comunidade apresentam características fenotípicas e genéticas distintas, quando comparadas às cepas típicas isoladas nos hospitais. Duas importantes características genéticas estão associadas com os isolados comunitários: a presença do SCCmec do tipo IV ou V, os quais são elementos genéticos menores e na grande maioria carregam apenas resistência aos antimicrobianos betalactâmicos. No entanto,

Staphylococcus aureus resistentes à meticilina isolados em infecções hospitalares são, na maioria, resistentes a várias drogas e apresentam SCCmec I, II ou III (GRAHAM et al., 2006; NAIMI et al., 2003). A presença de genes codificadores da exotoxina leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) é outra importante característica observada nos isolados comunitários. A presença desta toxina causa necrose tecidual e destruição de leucócitos, através da formação de poros na membrana celular. A maioria dos isolados portadores deste gene está associada a infecções de pele, principalmente furúnculos e abscessos, mas pode também causar pneumonia e sepse grave (GELATTI et al., 2009).

3.7.1.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies das quais a *Escherichia coli* é a mais comum e clinicamente importante. Trata-se de um membro da família *Enterobacteriaceae* extremamente heterogênea e complexa, sendo o habitante mais comum do intestino de humanos e animais e o principal agente de infecções hospitalares e na comunidade por bactérias Gram-negativas (BAUM et al., 2005). Esse microrganismo está associado a uma variedade de doenças incluindo sepse, Infecções do Trato Urinário (ITU), meningite e gastroenterite. A profusão das cepas capazes de causar doença reflete-se na sua diversidade antigênica. Foram descritos muitos antígenos O, H e K, e eles são utilizados para classificar os microrganismos isolados para fins epidemiológicos. Sorogrupos antigênicos específicos estão também associados a uma virulência aumentada (MURRAY et al., 2006).

E. coli possui uma ampla variedade de fatores de virulência, com cepas responsáveis por doenças como ITU e a gastroenterite e apresentam fatores de virulência especializados, entre adesinas e exotoxinas (TORTORA et al., 2005).

A *E. coli* comensal difere evolutivamente da patogênica e não apresenta em seu genoma os genes que codificam os fatores de virulência presentes nos diferentes patótipos. Usualmente a *E. coli* comensal só causa infecção em indivíduos imunodeprimidos ou quando encontra situações não fisiológicas, como uso de cateteres implantados nas vias urinárias. O indivíduo normal raramente ou nunca se deixa infectar pela *E. coli* comensal (VERONESI et al., 2010).

As *E. coli* associadas às infecções intestinais, conhecidas por DEC (*Diarrheagenic Escherichia coli*), são divididas em seis patótipos: EPEC (*E. coli* enteropatogênica); EHEC (*E. coli* enterohemorrágica); ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); EAEC (*E. coli* enteroagregativa); EIEC (*E. coli* enteroinvasora); e DAEC (*E. coli* que adere difusamente). A patogênese das infecções intestinais varia de um patótipo para outro (VERONESI et al., 2010).

A resistência dos antimicrobianos a *E. coli* tem sido reportada em todo mundo, com pelo menos duas classes de agentes antimicrobianos, sendo comum em humanos e na medicina veterinária e tem aumentado, significativamente, quando se avaliam as opções terapêuticas. A ocorrência de patógenos e o perfil de sensibilidade, no entanto, mostra variações geográficas significativas, em relação às populações e ambientes. Normalmente, os níveis de resistência são altos frente a penicilinas e trimetoprim e baixa para cefalosporinas de terceira geração e nitrofurantoína (BAUM et al., 2005).

As infecções do trato urinário são usualmente tratadas com quinolonas e fluoroquinolonas. No entanto, por causa das propriedades farmacocinéticas e a emergência de isolados resistentes, o uso na clínica tem diminuído, embora elas continuem sendo usadas em alguns centros médicos do Brasil para tratamento de infecções urinárias da população pediátrica. A ocorrência de bactérias resistentes à fluoroquinolonas foi observada imediatamente após a introdução destes antimicrobianos

na prática clínica para o tratamento de infecções em pacientes hospitalizados e na comunidade em infecções causadas por *Escherichia coli* (ITO et al., 2008).

3.7.1.3 O gênero *Klebsiella* spp.

Os membros do gênero *Klebsiella*, também pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são encontrados comumente no solo e na água. Muitos isolados são capazes de fixar nitrogênio da atmosfera, sendo uma vantagem nutricional em populações isoladas com pouco nitrogênio protéico em sua dieta (TORTORA et al., 2005; PINTO et al., 2004).

Possuem uma cápsula proeminente que é responsável pela aparência mucóide das colônias isoladas e pela virulência aumentada dos microrganismos *in vivo*. O membro mais comumente isolado desse gênero é a *Klebsiella pneumoniae*, que pode causar pneumonia lobar primária adquirida na comunidade. Os alcoólatras e as pessoas com as funções pulmonares comprometidas apresentam maior risco de desenvolver pneumonia devido à sua incapacidade de remover secreções orais aspiradas das vias aéreas inferiores. A pneumonia devida a espécies de *Klebsiella* frequentemente envolve a destruição necrótica dos espaços alveolares, a formação de cavidades e a produção de escarro sanguinolento. Essas bactérias também causam infecções de ferimentos, dos tecidos moles e infecções do trato urinário (MURRAY et al., 2006).

A produção das enzimas betalactamases de espectro estendido (ESBLs) tem sido a maior causa de resistência deste gênero microbiano frente aos antimicrobianos das classes das penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, com uma alta prevalência no Brasil (SUPERTI et al., 2009).

A ocorrência de espécies de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs correspondem a um dos patógenos mais isolados em infecções nosocomiais em todo mundo, onde as cepas e seus genes podem permanecer em hospitais, causando surtos e colonização. Já há mais de 300 ESBLs descritas até o momento (DROPA et al., 2009). Vários estudos recentes relatam uma alta prevalência das ESBLs na família *Enterobacteriaceae* nos centros de saúde do Brasil e na comunidade, especialmente em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (NOGUEIRA et al., 2006; MINARIN et al., 2007; MINARIN et al., 2008; SILVA DIAS et al., 2008).

3.7.1.4 O gênero *Salmonella* spp.

A bactéria *Salmonella* (denominadas em homenagem a seu descobridor, Daniel Salmon) são bastonetes Gram-negativos, anaeróbicos facultativos e não-formadores de esporos. Seu habitat normal é o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais. Todas as salmonelas são consideradas patogênicas em algum grau, causando salmonelose ou gastroenterite (TORTORA et al., 2005).

Quase todos os membros do gênero *Salmonella* são potencialmente patogênicos. Consequentemente existem muitos testes sorológicos e bioquímicos para testar isolados clínicos e identificar salmonelas. As salmonelas são habitantes comuns do trato intestinal de vários animais, principalmente, em aves domésticas e em bovinos. Em condições sanitárias precárias, elas podem contaminar alimentos (VERONESI et al., 2010).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* é incomum. Ao invés de múltiplas espécies, os membros do gênero *Salmonella*, que são infecciosos para animais de sangue quente, podem ser considerados por razões práticas como uma única espécie, *Salmonella enterica*. Essa espécie é dividida em mais de 2.400 sorovares, isto é,

variedades sorológicas. A sorotipagem está baseada em um documento formulado por Kauffmann-White e consiste em uma caracterização, geralmente por testes de aglutinação, baseados nos antígenos somático e flagelar (FERNANDES et al., 2006). A febre tifóide, causada pela *Salmonella typhi*, é a doença mais grave causada por membros do gênero *Salmonella*. Uma doença gastrointestinal menos grave causada por outras salmonelas é denominada salmonelose, sendo uma das mais comuns infecções de origem alimentar (TORTORA et al., 2005).

Desde 1940, tem aumentado o isolamento de sorotipos não tifóides, sendo um dos principais agentes de contaminação alimentar em todo mundo, destacando-se a *Salmonella typhimurium* como uma das causas mais comuns de salmonelose humana (FERNANDES et al., 2006).

O gênero *Salmonella* representa um grupo de bactérias que pode causar doença diarréica e, geralmente, é encontrada em alimentos de origem animal, como carnes, leite e derivados, ovos, entre outros. O período de incubação varia, em geral, de 12 até 72 horas após consumo de alimentos contaminados. Os sintomas principais são: diarréia, febre, cefaléia, cólica abdominal e costumam durar de quatro a sete dias. A *Salmonella typhimurim* é um dos principais sorotipos isolados em casos esporádicos ou surtos no Brasil e está associada a meningites, especialmente em crianças. Representa um risco para a população que consome alimentos contaminados por ela devido ao seu potencial invasivo e, portanto, eminentemente patogênico. Diante dos vários sorotipos diferentes de *Salmonella* spp. encontrados, a *Salmonella typhimurium* fagotipo DT 104 é considerada um patógeno emergente e altamente virulento, resistente a vários antibióticos (CVE/CCD-SES, 2005).

Juntamente com a espécie *E. coli* e o gênero *Shigella* spp., está entre as bactérias enteropatogênicas mais isoladas em infecções ocorridas em enfermarias e pediatrias de

unidades hospitalares. Um outro destaque nosocomial refere-se aos casos de pacientes com febre tifóide que apresentam abscesso esplênico, onde o gênero *Salmonella* é responsável por cerca de 2 a 20% dos casos relatados na literatura médica, sendo o sorotipo *typhi* o mais comumente associado (HERKENHOFF et al., 2006).

3.7.1.5 O gênero *Shigella* spp.

Ao contrário do gênero *Salmonella*, a classificação da *Shigella* é muito simples. Foram descritas quatro espécies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*, sendo esta última a causa mais comum de shigelose no mundo industrial, e *Shigella flexneri* a causa mais comum nos países em desenvolvimento, com uma estimativa anual de 150 milhões de casos anualmente em todo mundo (MURRAY et al., 2006).

A shigelose é principalmente uma doença infantil, pois 70% de todas as infecções ocorrem em crianças com idade inferior a 15 anos. A doença endêmica em adultos é comum em homens homossexuais e em contatos domiciliares com crianças infectadas. Surtos epidêmicos da doença ocorrem em creches, berçários e instituições de custódia. A shigelose é transmitida pela via fecal oral, principalmente por pessoas com mãos contaminadas, e menos comumente pela água ou alimento. Considerando que cerca de 200 bacilos podem estabelecer a doença, a shigelose se dissemina rapidamente em comunidades onde os padrões sanitários e o nível de higiene pessoal são baixos (VERONESI et al., 2010). Enquanto a *Shigella flexneri* e a *Shigella dysenteriae* são mais comuns em áreas com saneamento inadequado, a *Shigella sonnei* prevalece relatada em alimentos e bebidas contaminados (NOGUEIRA et al., 2008).

A *Shigella* causa doença por invadir e se replicar nas células que revestem a mucosa do colon intestinal. As proteínas codificadas por genes estruturais medeiam a

aderência dos microrganismos às células, bem como a sua invasão, replicação intracelular e disseminação célula a célula. Esses genes são transportados em um grande plasmídeo de virulência que são regulados por genes cromossômicos. A shigelose é caracterizada por cólicas abdominais, diarreia, febre e fezes sanguinolentas. Os sinais e sintomas clínicos da doença aparecem 1 a 3 dias após os bacilos serem ingeridos. Inicialmente, os bacilos colonizam o intestino delgado e começam a se multiplicar nas primeiras 12 horas, sendo o primeiro sinal da infecção a diarreia aquosa profusa sem evidência histológica de invasão da mucosa e é mediado pela enterotoxina (TORTORA et al., 2005).

Disenterias causadas por *Shigella* constituem um importante problema de saúde em países industrializados e em desenvolvimento. Apesar de ser usualmente autolimitada, a antibioticoterapia efetiva nessa enfermidade reduz a duração e a gravidade da disenteria, podendo diminuir os índices de morbidade e mortalidade. Até os anos noventa, a terapêutica preconizada para o tratamento das shigeloses era à base de ampicilina, mas, atualmente, observa-se um aumento significativo de amostras de *Shigella flexneri* resistentes a este antimicrobiano (SIDRIM et al., 2008). Níveis altos de resistência tem sido observados também frente a trimetoprim/sulfametoxazol, penicilina e amicacina, com resistência a múltiplos antimicrobianos (NOGUEIRA et al., 2008).

3.7.1.6 O gênero *Proteus* spp.

O gênero *Proteus* pertence à família *Enterobacteriaceae* e constituem bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, sendo encontrados, principalmente, no trato gastrointestinal. Causa infecções urinárias, pulmonares e de feridas, sendo as espécies *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* as espécies de maior interesse (SHABBIRI et al., 2010).

O desenvolvimento de colônias de bactérias do gênero *Proteus* spp. em ágar exibe um tipo de crescimento como um enxame. As células “enxameadoras” com muitos flagelos movem-se para fora da colônia e reverterem para células normais com apenas alguns flagelos e motilidade limitada. Periodicamente, novas gerações de células “enxameadoras” altamente móveis se desenvolvem, e o processo se repete. Como resultado, uma colônia de *Proteus* spp. tem a aparência distinta de uma série de anéis concêntricos. Esse gênero de bactéria está implicado em muitas infecções do trato urinário e em feridas (VERONESI et al., 2010).

A infecção das vias urinárias por *Proteus mirabilis* constitui a doença mais comum produzida por esse gênero. Esta bactéria produz grande quantidade de urease, que cliva a uréia em dióxido de carbono e amônia. O processo aumenta o pH da urina e facilita a formação de cálculos renais. O aumento da alcalinidade da urina é também tóxico para o epitélio urinário. Apesar da diversidade sorológica desses microrganismos, a infecção não foi associada a qualquer sorogrupo específico. Além disso, em contraste com *E. coli*, a presença de pili em *Proteus mirabilis* pode diminuir sua virulência por intensificar a fagocitose dos bacilos (MURRAY et al., 2006).

3.7.1.7 O gênero *Pseudomonas* spp.

Constituem bastonetes Gram-negativos aeróbicos, não fermentadores de glicose, muito comuns no solo e em outros ambientes naturais. Muitas espécies de pseudomonas excretam pigmentos extracelulares solúveis em água que difundem no seu próprio meio. Uma das espécies, *Pseudomonas aeruginosa*, produz uma pigmentação solúvel, azul-esverdeada, a piocianina. Sob certas condições, particularmente em hospedeiros enfraquecidos, este organismo pode infectar o trato urinário, queimaduras, e feridas, e

causar infecções sanguíneas (septicemia), abscessos e meningite (TORTORA et al., 2005).

Em hospitais e em outros locais em que agentes farmacêuticos são preparados, a habilidade das pseudomonas de se desenvolverem com quantidades mínimas de fontes incomuns de carbono, como resíduos de sabão, ou adesivos de revestimento de tampas encontrados em uma solução, tem sido um problema inesperado. As pseudomonas são até capazes de crescer em alguns anti-sépticos, como compostos quaternários de amônio. Sua resistência à maioria dos antibióticos também tem sido uma fonte de preocupação médica (VERONESI et al., 2010). Essa resistência está provavelmente relacionada a características das porinas da parede celular, que controlam a entrada de moléculas através da parede celular. O genoma das pseudomonas é grande e também codifica diversos sistemas de bombeamento de efluxo que são muito eficientes, ejetando os antibióticos da célula antes deles fazerem efeito. São responsáveis por uma em cada dez infecções nosocomiais, especialmente infecções em pacientes nas unidades de queimados (KONG et al., 2005).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno dominante em pacientes com fibrose cística, uma doença pulmonar obstrutiva crônica, frequente em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva, estando a presença deste organismo associada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade (MCGOWAN, 2006). O tratamento de escolha inclui uma combinação de antibióticos betalactâmicos e aminoglicosídeos. No entanto, a resistência à primeira classe de fármacos citada é comum, com a neutralização dos Betalactâmicos através de bombas de efluxo, alteração na permeabilidade das membranas, dentre outros mecanismos. A resistência aos betalactâmicos devido à expressão das betalactamases tem sido o mecanismo mais encontrado (JEAN et al., 2009).

3.7.1.8 O gênero *Acinetobacter* spp.

Trata-se de um gênero composto por bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose, destacando-se as espécies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii* e *Acinetobacter haemolyticus* (KONEMAN et al., 1997).

São isoladas na natureza e em hospitais, sobrevivendo em superfícies úmidas, incluindo equipamentos de terapia respiratória, e em superfícies secas como a pele humana. Essas bactérias também fazem parte da microbiota normal da orofaringe de um pequeno número de pessoas saudáveis e são capazes de proliferar durante a hospitalização (MURRAY et al., 2006).

Os *Acinetobacter* são patógenos oportunistas que causam infecções no trato respiratório, no trato urinário e em ferimentos; também causam septicemia. O tratamento das infecções causadas por *Acinetobacter* é problemático, uma vez que esses microrganismos, particularmente *Acinetobacter baumannii*, são frequentemente resistentes aos antibióticos. Terapia específica deve ser orientada por testes de sensibilidade *in vitro*, entretanto o tratamento empírico para infecções graves deve consistir em antibióticos betalactâmicos (por exemplo, ceftazidima, imipenem) e um aminoglicosídeo (VERONESI et al., 2010).

Lyons (1995), reviu uma variedade de infecções humanas causadas por espécies de *Acinetobacter*, incluindo pneumonia (relacionada com mais frequência a tubos endotraqueais ou traqueostomias), endocardites, meningites, infecções de pele e feridas, peritonites (em pacientes submetidos a diálise peritoneal) e infecções do trato urinário. Também foram publicados casos esporádicos de conjuntivite, osteomielite e sinovite. As espécies de *Acinetobacter* spp. têm um papel importante na colonização e infecção de pacientes hospitalizados. Esses microrganismos foram relacionados a uma variedade de infecções nosocomiais, incluindo bacteremia, infecções do trato urinário e meningite

secundária, mas o papel principal dos mesmos é o de agentes de pneumonias nosocomiais, em particular as associadas a respiradores em pacientes internados em unidades de terapia intensiva. *Acinetobacter baumannii* é a espécie prevalente em amostras biológicas e é a bactéria mais encontrada nas infecções adquiridas em hospitais (GONÇALVES et al., 2000).

As espécies de *Acinetobacter* tendem a ser resistentes a uma variedade de antibióticos, embora uma espécie, a *Acinetobacter lwoffii*, possa ser mais sensível que as outras (SUPERTI et al., 2009). Existe resistência quase universal à penicilina, à ampicilina e à cefalotina, e a maioria das cepas é resistente ao clorafenicol. Observamos uma tendência ao aumento da resistência a aminoglicosídeos das espécies de *Acinetobacter* nos últimos anos. Verificou-se sensibilidade variável a cefalosporinas de segunda e terceira geração; devem ser realizados antibiogramas individuais para determinar as variações de cepas. A sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprima também é variável. O tratamento combinado com um aminoglicosídeo e ticarcilina ou piperacilina é sinérgico e pode ser eficaz em infecções graves (GUSATTI et al., 2009).

3.7.2 Fungos

Ao longo dos últimos dez anos, a incidência de infecções importantes causadas por fungos tem aumentado. Essas infecções estão ocorrendo como infecções hospitalares e em indivíduos com sistema imunológico comprometido. Além disso, milhares de doenças causadas por fungos afetam plantas economicamente importantes, custando anualmente, mais de um bilhão de dólares (TORTORA et al., 2005).

A maioria dos fungos relacionados aos processos patológicos humanos é de vida livre. Em geral, os indivíduos apresentam um alto nível de imunidade inata aos fungos.

A pele intacta serve como uma barreira primária contra qualquer infecção causada por fungos que colonizam principalmente as camadas superficiais, cutâneas e subcutâneas da pele. Alguns fungos podem causar doenças em pessoas saudáveis. Quando estabelecida, a infecção pode ser classificada em micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas, profundas e sistêmicas (MURRAY et al., 2006).

O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes. Entre as espécies que compõem esse gênero, a *Candida albicans* apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença. Essa levedura está amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats, ao contrário de outras espécies do gênero, de distribuição limitada. As leveduras do gênero *Candida*, em particular a *C. albicans*, são patógenos oportunistas frequentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais (VERONESI et al., 2010). Estão muito bem adaptadas ao corpo humano, por isso podem colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica. Colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena. O delicado balanço entre o hospedeiro e esse fungo comensal pode-se transformar em uma relação parasitária, com o desenvolvimento de infecções denominadas candidíases. Essas infecções fúngicas variam desde lesões superficiais em pessoas saudáveis até infecções disseminadas em pacientes neutropênicos. *C. albicans* é um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastosporângios) no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática; ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em

processos patogênicos. Além disso, sob condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode ocorrer a formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular) (ALVARES et al., 2007).

Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, a rigor, um organismo “pleomórfico”. O microrganismo cresce melhor em superfícies quentes e úmidas, sendo essas infecções as manifestações usuais da doença e, embora normalmente não apresentem ameaça à vida, representam um problema de considerável importância socioeconômica (WITZEL et al., 2008).

A *Candida* é diretamente introduzida no sangue por acessos intravenosos, cateteres, diálise peritoneal, cirurgia cardíaca ou abuso de drogas intravenosas. Essas observações sugerem que tanto as células fagocíticas quanto a resposta imune mediada por células específicas participam na defesa do hospedeiro contra o microrganismo. Antes da era dos antibióticos e corticóides, o número de infecções por fungos era bastante reduzido. Isso é particularmente verdade para as infecções por *Candida*, especialmente por *C. albicans*, que se apresentava como comensal, mas que, com as defesas comprometidas do indivíduo, se instala, invade tecidos e provoca danos (LEMOS et al., 2009).

Uma categoria de doença fúngica que adquiriu importância foi quando da sua associação com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e ao uso aumentado da terapia imunossupressora. Essas doenças podem resultar de infecção com organismos de baixo potencial patogênico e produzir doença somente em circunstâncias incomuns, a maioria envolvendo a debilitação do hospedeiro (WINGETER et al., 2007).

A maioria dos indivíduos infectados por *Candida* spp. cura com terapia antifúngica. A ausência de resposta ao tratamento é uma característica de portadores da candidíase

mucocutânea caracterizada pela presença de múltiplas lesões cutâneas e mucosas e está associada a poliendocrinopatias e doenças auto-imunes. Por outro lado, episódios repetidos de infecção por *Candida albicans* são observados na candidíase recorrente que é caracterizada pela ocorrência de, no mínimo, quatro episódios de vaginites no período de um ano. Dentre as mais de 180 espécies de *Candida* descritas, a *Candida albicans* é responsável por 90% das infecções em pacientes com candidíase recorrente e é a espécie isolada na grande maioria dos casos de candidíase mucocutânea. A forma mais comum de candidíase de repetição é a candidíase vaginal recorrente, que acomete cerca de 6% das mulheres sadias em idade reprodutiva (CARVALHO et al., 2003).

3.8 Resistência microbiana

A introdução dos agentes antimicrobianos na prática clínica representou um dos grandes avanços na medicina para o tratamento dos mais diversos tipos de doenças infecciosas. No entanto, desde a introdução do primeiro antimicrobiano, a resistência bacteriana a estes agentes vem sendo descrita e emergindo em ampla variedade de patógenos tanto de origem nosocomial quanto comunitária (POWERS, 2004). A emergência e disseminação de inúmeros microrganismos resistentes resultam da combinação de múltiplos fatores, tais como: mutações dos genes de resistência que aumentam seu espectro de atividade; troca de informações genéticas nas quais os genes de resistência são transferidos para novos microrganismos; pressão seletiva exercida pelas condições do meio que favorece a emergência e disseminação de microrganismos resistentes; proliferação e disseminação de clones multirresistentes as quais podem ocorrer em nível global (TENOVER, 2001).

A resistência bacteriana pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estão sendo

expostas (LIVERMORE, 1995). Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos é a produção de betalactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel betalactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo assim, que ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (BUSH, 1988; LIVERMORE, 1995; ROSSOLINI, 2005).

Mais recentemente, um aspecto que vem sendo cada vez mais levado em consideração refere-se à ocorrência dos biofilmes e sua importância na terapêutica antimicrobiana, pois o conhecimento sobre os biofilmes microbianos em nosso organismo levou a uma quebra do paradigma de tratamento das doenças infecciosas. Certamente, para que alguns dos antibióticos possam ser empregados de forma mais eficaz, será necessário um maior conhecimento acerca dos biofilmes formados naturalmente em nosso organismo (AOKI et al., 2005).

Todas as especialidades médicas que envolvem o manejo direto de pacientes são reféns da possibilidade de uma intercorrência infecciosa, principalmente em pacientes hospitalizados. Durante os primeiros anos da era dos antibióticos, o desenvolvimento de novas classes de agentes antimicrobianos acompanhou ou até ficou à frente da capacidade das bactérias clinicamente importantes no desenvolvimento de resistências (ROSSI, 2005; ENA et al., 1993).

O avanço da medicina nas diferentes áreas clínicas e cirúrgicas tem sido acompanhado por um desenvolvimento tecnológico impressionante nos últimos anos, o que tem contribuído para o favorecimento da longevidade dos pacientes em muitos casos (FISH et al., 1995). As unidades de terapia intensiva se multiplicaram e sofisticaram, recebendo e tratando pacientes em situações cada vez mais críticas. Um dos grandes desafios, no entanto, tem sido o manejo adequado das intercorrências

infecciosas bacterianas e fúngicas que frequentemente acometem esses pacientes (ARCHIBALD et al., 1997).

Apesar da disponibilização de novos antibióticos, o ritmo do desenvolvimento de resistência bacteriana nos diferentes patógenos, Gram-positivos e negativos, representa um constante desafio terapêutico, fenômeno observado em todo mundo. Nos anos 70 e início dos anos 1980, as bactérias Gram-negativas resistentes eram o principal obstáculo terapêutico. No novo milênio, as bactérias Gram-positivas resistentes também ocupam papel de destaque (ROSSI, 2005).

Para que haja uso racional de antibióticos, é recomendável que as condutas terapêuticas sejam baseadas em evidências locais, sem negligenciar tendências de perfis de resistência bacteriana de maneira mais abrangente. As infecções bacterianas, não-hospitalares, do trato respiratório e trato urinário são também responsáveis por grande parte das prescrições de antibióticos. Na maioria das vezes, os pacientes não são encaminhados ao laboratório de microbiologia para identificação do agente etiológico e seu respectivo perfil de sensibilidade, sendo a seleção do antibiótico feita de forma empírica, baseada no tipo de infecção, topografia, gravidade, sexo, idade e dados epidemiológicos (OBER, 1998).

O número de antibióticos em pesquisa diminuiu drasticamente nos últimos anos, enquanto a resistência às drogas antimicrobianas tem crescido de forma inexorável. Nos anos 1960 e 1970, o uso indiscriminado de penicilinas semi-sintéticas, penicilinas resistentes e cefalosporinas favoreceu a emergência de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), e, nessa mesma época, o uso extenso de ampicilina favoreceu o aparecimento de cepas ampicilina-resistentes, entre o grupo de *Nessseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* e *Escherichia coli* (KAYE et al., 2000).

A emergência de cepas de *Streptococcus pneumoniae* penicilina-resistentes (PRSP), por alterações progressivas das proteínas ligadoras de penicilina (PBP), inicialmente foi descrita na África do Sul e foi seguida de inúmeros relatos mundiais com proporções alarmantes, principalmente em alguns países da Ásia, que já alcançam níveis superiores a 80% de alta resistência à penicilina (KLUGMAN, 1990). No Brasil, temos relatos de trabalhos de vigilância microbiológica que apontam índices de *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) que variam de 10% a 20% de resistência intermediária e até 5% para altos níveis de resistência (CRITCHELEY, et al., 2000).

Endocardites por *Enterococcus* spp. têm sido um desafio, com opções terapêuticas cada vez mais limitadas, pela condição natural de resistência dessas cepas em relação às cefalosporinas e pela emergência de resistência aos glicopeptídeos, documentada a partir dos anos 1980. No início dos anos 1960, o uso de penicilina e estreptomicina nas infecções graves por *Enterococcus* spp. foi minimizado pelo aparecimento de resistência a esse aminoglicosídeo em altos níveis – *HLR* (*High Level Resistance*), e a gentamicina permanecia como opção. Em 1979, cepas *HLR* a gentamicina passaram a ser descritas em todo mundo, limitando as drogas disponíveis para o tratamento de infecções graves. A partir de 1973, cepas de *Enterococcus* spp. com resistência à vancomicina (VRE), passaram a ser cada vez mais prevalentes nos Estados Unidos, principalmente nos ambientes de terapia intensiva, demandando implementação de vigilância epidemiológicas nesses ambientes (ENA et al., 1993). O uso prévio de vancomicina tem sido identificado como um dos principais fatores de risco para o aparecimento de cepas VRE, mas essa relação nem sempre é claramente demonstrada, e outros fatores devem ser considerados. O uso de glicopeptídeos no ambiente veterinário (frangos e suínos) pode favorecer a transmissão de cepas resistentes, selecionadas nesses animais, através de alimentos contaminados, epidemiologia documentada

principalmente na Europa. Em hospitais americanos, o VRE aparece como um dos agentes mais prevalentes no ambiente de terapia intensiva (SHABERG, 1991). No Brasil, a taxa de VRE ainda se encontra baixa, cerca de 3,7% (CEREDA et al., 1998).

Hiramatsu, em 1997, descreveu no Japão, pela primeira vez no mundo, cepas de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina até então universalmente sensíveis a essa droga. Esse tipo de resistência, agora denominada GISA (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídeos), passou a ser exhaustivamente monitorado e descrito em outros países, como Estados Unidos (TENOVER et al., 1998), França (PLOY et al., 1998) e Brasil (OLIVEIRA et al., 2001). Um espessamento da parede bacteriana é apontado como uma das causas principais da não-atividade dos glicopeptídeos, mas o mecanismo genético envolvido nessa mudança ainda não foi esclarecido (ROSSI, 2005).

Entre as bactérias Gram-negativas, cepas de enterobactérias e bacilos não-fermentadores começaram a apresentar níveis de resistência cada vez mais expressivos diante das cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração. Essa situação dificulta o tratamento desses agentes nos diferentes processos infecciosos. A resistência aos antibióticos betalactâmicos é mediada pelas betalactamases, que inativam os antimicrobianos pela hidrólise do anel betalactâmico.

Ambler et al. (1991) propagou uma classificação química das betalactamases baseada nas sequências dos aminoácidos. Bush et al. (1995) classificou essas enzimas com base em suas propriedades funcional e estrutural e definiu quatro classes de acordo com a sua estrutura primária e podem também ser classificadas dentro de dois grupos com base no seu mecanismo catalítico, isto é, serina-betalactamases (Classes A, C e D) e metalo-betalactamases (Classe B).

As metalo-betalactamases utilizam íons divalentes, comumente o zinco, como co-fator para sua atividade catalítica e é uma das classes que mais merece destaque, devido à sua capacidade de hidrolisar todos os antimicrobianos betalactâmicos, incluindo os carbapenens. Estes antimicrobianos são utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes e conseguem se manter estáveis frente às serina-betalactamases (BERTONCHELI et al., 2008).

Até o momento, centenas de betalactamases têm sido descritas (BAUM et al., 2005) e as enzimas de espectro ampliado, conhecidas como ESBL (*extended spectrum betalactamases*), capazes de inativar cefalosporinas de terceira e quarta geração, passaram a ser uma preocupação mundial, implicando, inclusive, em mudanças na abordagem terapêutica. No Brasil, a prevalência das cepas ESBL é bastante expressiva em diferentes centros, podendo exceder 50% quando relacionada às espécies de *Escherichia coli* e ao gênero *Klebsiella spp.* As enterobactérias produtoras de ESBL correspondem à um dos maiores desafios dos laboratórios de microbiologia clínica devido a sua dificuldade de identificação e seus procedimentos padrões de diagnóstico (ESSACK, 2000). Além disso, tem sido causa de múltiplas infecções hospitalares com alto impacto na mortalidade dos pacientes (QUALE et al., 2002).

A resistência pela produção de carbapenamases associadas a problemas de permeabilidade e efluxo são mecanismos complexos e que se apresentam em frequência cada vez maior no ambiente hospitalar, principalmente nas bactérias Gram-negativas não-fermentadoras de glicose. (ROSSI, 2005).

O uso inadequado dos antimicrobianos pode estar relacionado a fatores como: doses subterapêuticas, falta de atividade da droga escolhida, esquemas terapêuticos curtos, baixa penetração no local da infecção, idade, imunidade do paciente e não-adesão ao tratamento, além do conhecimento inadequado dos conceitos de

farmacocinética e farmacodinâmica de cada droga escolhida (QUINTILIANI et al., 1994), sendo necessário a otimização na utilização do arsenal terapêutico orientado por dados locais e a ação integrada de equipes de saúde (COURVALIN, 1999).

O custo financeiro de uma terapia fracassada por conta de microrganismos resistentes é muito grande, onerando ainda mais os sistemas públicos de saúde. Bactérias resistentes geram nova consulta, novos exames diagnósticos, nova prescrição, sem contar a provável internação e ocupação de leitos hospitalares. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, o custo com resistência bacteriana está em torno de 4 a 5 bilhões de dólares anualmente. O grande responsável pela disseminação dos genes de resistência e, por conseguinte de microrganismos resistentes, é sem dúvida o próprio homem; seja pela atitude inconsequente ou pela falta de informação, o uso irracional de antimicrobianos tem aumentado, a despeito de todas as publicações, campanhas e informações acerca do fato (SÁ DEL FIOL et al., 2010).

3.9 Sinergismo

Uma alternativa para uso frente à microrganismos resistentes são as interações medicamentosas que possam levar a tratamentos mais eficazes (FAYAZ et al., 2010; CHANG et al., 2005; SATO et al., 2004). O uso de plantas com princípios antimicrobianos eficazes tem sido investigado, sendo utilizadas para análise do efeito sinérgico sobre antibióticos de uso corrente. A terapia de sinergismo antimicrobiano é usada para descrever a atividade aditiva de antibióticos quando usados em combinação com outros compostos (HEMAISWARYA et al., 2009; GYONGYI et al., 2000).

O uso simultâneo de dois ou mais antimicrobianos tem sido recomendado em situações especificamente definidas (MUROI et al., 2004). A seleção de uma combinação apropriada exige o conhecimento do potencial de interação entre os

antimicrobianos. Essas interações podem afetar tanto o microrganismo quanto o paciente (MIGLIOLI et al., 1998). Os antibióticos, ao atuarem em diferentes alvos microbianos, podem potencializar ou reduzir a atividade antimicrobiana global. Por mais de 20 anos foi reconhecido e demonstrado suscetibilidade do gênero *Enterococcus* spp. para altas concentrações de aminoglicosídeos, o que não vem mais ocorrendo. Desta maneira, terapias antimicrobianas consistindo de aminoglicosídeos em combinação com ampicilina para tratamento de infecções sérias por *Enterococcus* spp. tem sido utilizadas (DRESSEL et al., 1999). Determinada combinação de fármacos pode ter toxicidade aditiva ou superaditiva no paciente. Por exemplo, a vancomicina, quando administrada isoladamente, costuma exibir nefrotoxicidade mínima. Entretanto, quando administrada com um aminoglicosídeo, a toxicidade do último aumenta (SILVA, 2010).

O trimetoprim é um dos agentes mais ativos que exerce efeito sinérgico quando utilizado com uma sulfonamida. Trata-se de um poderoso inibidor competitivo seletivo da diidrofolato redutase microbiana, a enzima que reduz o diidrofolato em tetraidrofolato. Essa forma reduzida do ácido fólico é necessária para as reações de transferência de um carbono. Por conseguinte, a administração simultânea de sulfonamida e trimetoprim induz bloqueios sequenciais na via de síntese do tetraidrofolato do microrganismo a partir de moléculas precursoras (PARK et al., 2004; PARK et al., 2004, GOODMAN & GILMAN, 2003).

Hardy et al., 2009 investigaram a atividade *in vitro* da combinação tobramicina/claritromicina sobre biofilmes de isolados clínicos de infecções pulmonares contendo *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*. A administração pulmonar direta das drogas representou um aumento real e um tratamento mais efetivo das

infecções envolvendo biofilmes bacterianos, permitindo uma alta concentração dos antibióticos no sítio infecciosos.

Em relação às interações entre as quinolonas, o ácido nalidíxico pode potencializar a ação de drogas com elevada afinidade pelas proteínas plasmáticas, como anticoagulantes orais, fenitoína, hipoglicemiantes orais e drogas antiinflamatórias. A nitrofurantoína inibe a ação antibacteriana do ácido nalidíxico. A administração concomitante dos quinolônicos com antiinflamatórios não-esteróides pode potencializar os efeitos estimulantes centrais dos quinolônicos. Em geral, os antagonistas dos receptores H₂ e os inibidores da bomba de prótons não apresentam interferência importante na absorção das quinolonas, com exceção da ranitidina, que pode reduzir a absorção da trovafloxacin em 17%. A administração concomitante de quinolônico com sulfato ferroso e complexos multivitamínicos contendo zinco pode reduzir a absorção do quinolônico (REESE et al., 2002).

Fluoroquinolonas possuem alta capacidade frente a prostatites e são muito utilizadas. Embora o efeito sinérgico das sulfonamidas com trimetoprim na erradicação das bactérias seja comprovado, sua eficácia tem sido baixa por causa da formação de biofilmes compostos por agregados de microcolônias localizados nos ductos prostáticos. Contudo, terapias antibióticas longas tem sido recomendadas para erradicar os organismos causadores de prostatites recorrentes, principalmente quando os sintomas persistem. Recentemente, a fitoterapia e outros tratamentos alternativos tem chamado atenção da comunidade científica (GUNICS et al., 2000). O licopeno, extraído do tomate, tem sido descrito como um potente antiinflamatório em função de sua ação antioxidante e seu efeito preventivo na redução da incidência de doenças crônicas tais como o câncer de próstata doenças cardiovasculares tem sido observado. Hee Han et al., 2008 observaram a redução da contagem de colônias bacterianas quando o licopeno foi

utilizado em associação com o composto quinolônico ciprofloxacina. Ratos tratados com licopeno/ciprofloxacina mostraram redução significativa da quantidade de bactérias quando comparado com os ratos tratados apenas com ciprofloxacina ou licopeno isoladamente. Este achado sugere que o licopeno tenha ação sinérgica quando utilizado em associação com o antibiótico.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J. F. C.; ROCHA FILHO, J. A.; BRANDÃO, S. S. F.; LIMA, M. C. A.; XIMENES, E. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; CHANTEGREL, J.; PERRISSIN, M.; LUU-DUC, C., *II Fármaco*, 54, 77-82, 1999.

ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; SILVA, A. C. A.; SILVA, P. G.; MALAGUENO, E.; SANTANA, J. V.; WANDERLEY, A. G.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; BARBE, J.; PITTA, I. R. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. *Pharmazie*. 60:1, 13-17. 2005.

ALVARES, C. A., ESTIVALET, T. I., CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *J Bras Patol Med Lab*, 43(5): 319-327, 2007;

AMBLER, R.P., COULSON, A.F., FRERE, J.M., A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem. J.* 276, 269–270, 1991;

AOKI, E. E., PIZZOLITTO, A. C., GARCIA, L. B., PIZZOLITTO, E. L., *Staphylococcus aureus* biofilms on central venous haemodialysis catheters, *Braz. J. Microbiol.*, 36(4), 342-346, 2005;

AQUINO, T. M.; LIESEN, A. P.; SILVA, R. O. E.; LIMA, V. T.; CARVALHO, C. S.; FARIA, A. R.; ARAÚJO, J. M.; LIMA, J. G.; ALVES, A.J.; MELO, E. J. T.; GÓES, A. J. S. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 446, 2008.

ARCHIBALD, L.K., PHILLIPS, L., MONNET, D. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 24(2):211-215, 1997;

BAKALOVA, A., R. BUYUKLIEV, G. MOMEKOV, D. IVANOV, D. TODOROV, S. KONSTANTINOV, M. KARAIVANOVA. Synthesis, physicochemical and in vitro

pharmacological investigation of new platinum (II) complexes with some cycloalkanespiro-5'-hydantoins. Eur. J. Med. Chem 40, 590–596. 2005.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico das estafilococcias. Jornal Brasileiro de Medicina 67:160-192, 1994;

BATISTA, R.S.; GOMES, A.P.; SANTOS, S.S.; ALMEIDA, L.C.; FIGUEIREDO, C.E.S.; PACHECO, S.J.B. Manual de Infectologia, Rio de Janeiro – RJ: Revinter, 2003;

BAUM, H. V., MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. International Journal of Medical Microbiology, 295, 503–511, 2005;

BELDA JÚNIOR, W., SIQUEIRA, L. F. G., NICO, M. M. S., FAGUNDES, L. J. Atividade *in vitro* de cinco drogas antimicrobianas contra *Neisseria gonorrhoeae*. An. Bras. Dermatol. 77(6): 661-667, 2002;

BELDA JÚNIOR, W., FAGUNDES, L. J., SIQUEIRA, L. F. G., *Neisseria gonorrhoeae*: resistência cromossômica à tetraciclina em São Paulo, Brasil An. Bras. Dermatol. 80(1): 37-40, 2005;

BERTONCHELI, C. M.; HORNER, R. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 44 n. 4, 577-599, 2008.

BONDE, C. G., GAIKWAD, N. J. Bioorganic & Medicinal Chemistry 12, 2151-2161, 2004;

BUSH, K.; β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. Clin. Microbiol. Ver., v. 1, n.1, p. 109-123, 1988.

BUSH, K., JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A., A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother, 39, 1211–1233, 1995;

BUTEL, J. S., CARROLL, K. C., BROOKS, G. F. Microbiologia Médica, Porto Alegre – PR, Artmed, 2008;

CASTRO, M. S., PILGERA, D., FERREIRA, M. B. C., KOPITTEKA, L. Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário, 1990-1996, 36(5), p. 553-558, 2002;

CARVALHO, L. P., BACELLAR, O., NEVES, N. A., CARVALHO, E. M., JESUS, A. R. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 36(5): 571-576, 2003;

CAVALCANTI AMORIM, E. L.; FERREIRA BRANDÃO, S. S.; MORAIS CAVALCANTI, C. O.; LINS GALDINO, S.; ROCHA PITTA, I.; LUU DUUC, C., Ann. Pharm. Fr. 2, 103, 1992.

CEREDA, R. F., MEDEIROS, E. A., VINAGRE, A., REGO, S. T., HASHIMOTO, A. Epidemiologic analysis for acquisition of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) in na intensive care unit in Brazil, In: Proceedings of the Eighth Annual Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America; 1998; São Paulo, Brazil;

CESTARI, A. L., VILELA, R. KUNISAWA, J., LOPES, C. E. Síndrome hemolítico-urêmica relacionada à infecção invasiva pelo *Streptococcus pneumoniae*. Rev. paul. pediatr. 26(1): 88-92, 2008;

CHANG, Y. Z., CHU, W. B., SHENG, Y. X., QIANG, W., LIANG, R. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 41: 79-81, 2005;

CLEELAND, E.; GRUNBERG, E. Laboratory evaluation of new antibiotics in Laboratory Medicine, Baltimore, Williams and Wilkins, 825-876, 1986;

COURVALIN, P. Combination approach of bacterial to antibiotic resistance. Res Microbial 150: 367-373, 1999;

CRITCHELEY, I. A., THOMSBERRY, C., ROSSI, F. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from five centers in Brazil, 1997-1998. *Diagnostic Microbiol and Infect Dis* 6: 178-184, 2000;

CVE/CCD-SES, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004, *Rev. Saúde Pública*, 39(3): 515-518, 2005;

DRESSEL, D. C., TORNATORE-REUSCHER, M. A., BOSCHMAN, C. R., STOSOR, V., ZEMBOWER, T., POSTELNICK, M. J., NOSKIN, G. A., PETERSON, L. R. Synergistic effect of gentamicin plus ampicillin on Enterococci with differing sensitivity to gentamicin: a phenotypic assessment of NCCLS guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 35: 219-225, 1999;

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V. C.; FRANCO, F.; GUIDA, S. M.; BALABAKIS, L. F.; SANTOS, S. R.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 51(4):203-209, 2009;

EL-SHARIEF, A. M. SH., MOUSSA, Z. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44, 4315-4334, 2009;

ENA, J., DICK, R. W., JONES, R. N. The epidemiology of intravenous vancomycin usage in a university hospital. *JAMA* 269: 598, 1993;

ESSACK, S. Y., Laboratory detection of extended-spectrum-beta-lactamases (ESBLs) – the need for a reliable, reproducible method. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 293–295, 2000;

FAYAZ, A. M., BALAJI, K., GIRILAL, M., MTECH, R. Y., KALAICHELVAN, P. T., VENKETESAN, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6: 103-109, 2010;

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; DIAS, A.M.G.; ALMEIDA, I.A.Z.C. & MELO, L.C.V. - *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 48(4): 179-184, 2006;

FERREIRA, M. S., GONÇALVES, E. G., ASSIS, V. P. Como diagnosticar e tratar infecções estafilocócicas. Revista Brasileira de Medicina 42:179-189, 1995;

FISH, D.N.; PISCITELLI, S.C.; DANZIGER, L.H. Development of resistance during antimicrobial therapy: a review of antibiotic classes and patients characteristics in 173 studies. Pharmoterapy 15:279-291, 1995;

GELATTI, L. C., SUKIENNIK, T., BECKER, A. P., INOUE, F. M., CARMO, M. S., CASTRUCCI, F. M. S., PIGNATARI, A. C. C., RIBEIRO, L. C., BONAMIGO, R. R. AZEVEDO, P. A. Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina adquirida na comunidade no sul do Brasil, Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 42(4), 458-460, 2009;

GÓES, A. J. S.; LIMA, M. C. A., GALDINO, S. L., PITTA, I. R., LUU-DUC, C., J. Pharm. Belg. 46, 236, 1991.

GOLAN, D. E., TASHJIAN, A. H., ARMSTRONG, E. J. Princípios de Farmacologia, Rio de Janeiro – RJ, Guanabara Koogan, 2009;

GONÇALVES, C. R.; VAZ, T. M. I., ARAUJO, E., BONI, R. F., LEITE, D. IRINO, K. Biotyping, serotyping and ribotyping as epidemiological tools in the evaluation of *Acinetobacter baumannii* dissemination in hospital units, Sorocaba, São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 42(5): 277-282, 2000;

GONÇALVES, A. Q., VIANA, J. C., PIRES, E. M., BÓIA, M. N., COURA, J. R. SILVA, E. F. The use of the antifungal agent miconazole as an inhibitor of *Blastocystis hominis* growth in *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* cultures. Rev. Inst. Med. trop. 49(3): 201-202, 2007;

GOODMAN & GILMAN, A., HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E. As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro – RJ: McGraw-Hill, 2003;

GRAHAM, P.L., LIN, S. X., LARSON, E. L. A U.S population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization. *Annals of Internal Medicine* 144:318-325, 2006;

GUNICS, G., MOTOHASHI, N. AMARAL, L., FARKAS, S., MOLNAR, J. Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bactéria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14: 239-242, 2000;

GUSATTI, C. S., FERREIRA, A. E. FUENTEFRIA, D. B., CORÇÃO, G. Resistência em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42(2): 183-187, 2009;

GYONGYI, G., MOTOHASHI, N., AMARAL, L., FARKAS, S., MOLNÁR, J. Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14: 239-242, 2000;

HADADI, A., RASOULINEJAD, M., MALEKI, Z., YONESIAN, M., SHIRANI, A., KOURORIAN, Z. Antimicrobial resistance pattern of Gram-negative bacilli of nosocomial origin at 2 university hospitals in Iran. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60: 301–305, 2008;

HARDY, M. T., MACÉ, C., MANSSOURI, N. E., VANDERBIST, F., TRAORE, H., DEVLEESCHOUWER, M. J. Effect of antibiotic co-administration on young and mature biofilms of cystic fibrosis clinical isolates: the importance of the biofilm model. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 40-45, 2009;

HEE HAN, C., YANG, C. H., SOHN, D. W., KIM, S. W. KANG, S. H., CHO, Y. H. Synergistic effect between lycopene and ciprofloxacin on a chronic bacterial prostatitis rat model. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31S: S102-S107, 2008;

HEMAISWARYA, S., DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16: 997-1005, 2009;

HERKENHOFF, B. V. G., FERREIRA, L. G. S., CAVEDAGNE, M., SALOMÃO, R. M. MAIA, A. M., IGLESIAS, A. C. Abscesso esplênico causado por Salmonella. Rev. Col. Bras. Cir. 33(3): 169-173, 2006;

ITO, T., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. Identification of a novel staphylococcal cassette chromosome *mec* (type V) driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48:2637-2651, 2004;

ITO, C. A. S., GALES, A. C., TOGNIM, M. C. B., MUNERATO, P., COSTA, L. M. D. Quinolone-resistant *Escherichia coli*, Braz J Infect Dis, 12(1) 05-09, 2008;

JEAN, S. S., HSUEH, P. R., LEE, W. S., CHANG, H. T., CHOU, M. Y., CHEN, I. S., WANG, J. H., SHYR, J. M., KO, W. C., JONGWU, J., LIU, Y. C., HUANG, W. K., TENG, L. J., LIU, C. Y., Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among non-fermentative Gram-negative bacteria in Intensive Care Units in Taiwan: SMART programme data 2005. International Journal of Antimicrobial Agents 33: 266–271, 2009;

KAVITHA, C. V.; BASAPPA, N. S. S.; MANTELINGU, K.; DORESWAMY, S.; SRIDHAR, M. A.; PRASAD, J. S.; RANGAPPA, K. S. Bioorg. Med. Chem. 14 2290, 2006.

KAYE, S. K., FRAIMOW, H. S., ABRUTYN, E. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. In: Kaye D. Anti-bacterial Therapy 14:2, 2000;

KESTER, M., VRANA, K. E., KARPA, K. D. QURAISHI, S. A. Farmacologia, São Paulo – SP, Elsevier, 2008;

KHARDORI, N. Med Clin N Am 90 1049-1076, 2006;

KLUGMAN, K. P. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev 3: 171-196, 1990;

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WINN JR., W. C. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas, Rio de Janeiro – RJ, Medsi, 1997;

KONG, K. K., JAYAWARDENA, S. R., PUERTO, A. D., WIEHLMANN, L., LAABS U., TUMMLER, B., MATHEE, K. Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene* 358: 82–92, 2005;

LEMOS, J. A., COSTA, C. R., ARAÚJO, C. R., SOUZA, L. K. H., SILVA, M. R. R. Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of HIV⁺ patients to fluconazole, amphotericin B and Caspofungin. Killing kinetics of caspofungin and amphotericin B against fluconazole resistant and susceptible isolates. *Braz. J. Microbiol.* 40(1): 163-169, 2009;

LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A.J. *Química Nova* 31, 369, 2008.

LIMA, M. C. A.; COSTA, L. B.; GÓES, A. J. S.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; LUU-DUC, C., *Pharmazie* 47, 182, 1992.

LIVERMORE, D. M. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 339:520-532, 1998;

LULLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L. *Farmacologia*, Porto Alegre – PR, Artmed, 2007;

LYONS, R. W. Ecology, clinical significance and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* and *Moraxella*. In Gilard GL (ed): *Nonfermentative Gram-negative Rods*:

Laboratory Identification and Clinical Aspects, pp 159-179. New York, Marcel Dekker, 1995;

MARTON, J.; ENISZ, J., HOSZTAFI, S., TIMAR, T., J. Agric. Food Chem. 41, 148, 1993;

MCGOWAN, J. E. Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance to the Maximum. The American Journal of Medicine, 119 (6A): S29–S36, 2006;

MIGLIOLI, P. A., ALLERBERGER, F., WALDERBERG, I., HASSE, J. Antibacterial activity of human pleural fluid: alone and in combination with antibiotics. International Journal of Antimicrobial Agents 10: 317-319, 1998;

MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; PALAZZO, I.C.V. & DARINI, A.L.C. - Prevalence of community-occurring extended-spectrum b-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. Curr. Microbiol., 54: 335-341, 2007;

MINARINI, L.A.R.; CLÍMACO, E.C.; GUIMARÃES, D.B. *et al.* - Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. **Curr. Microbiol.**, **56**: 587-591, 2008;

MONACO, M., ANTONUCCI, R., PALANGE, P., VENDITTI, M., PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia. Emerging Infectious Disease 11:1647-1648, 2005;

MUROI, H., NIHEI, K., TSUJIMOTO, K., KUBO, I., Synergistic effects of anacardic acids and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 12: 583-587, 2004;

MURRAY, P. R., PFALLER, M. A. Microbiologia Médica, São Paulo – SP, Elsevier, 2006;

NAIMI, T. S., LEDELL, K. H., COMO-SABETTI, K., BORCHARDT, S. M., BOXRUD, D. J., ETIENNE, J., JOHNSON, S. K., VANDENESCH, F., FRIDKIN, S., O'BOYLE, C., DANILA, R. N., LYNFIELD, R. Comparison of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. The Journal of the American Medical Association 290:2976-2984, 2003;

NOGUEIRA, K.S.; HIGUTI, I.H.; NASCIMENTO, A.J. *et al.* - Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. Braz. J. infect. Dis., 10: 390-395, 2006.

NOGUEIRA, P. A., SILVA, T., MAGALHÃES, G. F., GRAVA, A. F., PEREIRA DA SILVA, L. H., ORLANDI, P. P. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of *ipa* genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 103(7): 731-733, 2008;

NWOBIKE, J. C. Empresas farmacêuticas e acesso a medicamentos nos países em desenvolvimento: o caminho a seguir. Sur, Rev. int. direitos human. 3(4): 126-143, 2006;

PINTO, U. M., CARDOSO, R. R., VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. Ver. Nutr. Campinas 17(3): 319-326, 2004;

OETHINGER, M., KERN, W. V. JELLEN-RITTER, A. S., MCMURRY, L. M., LEVY, S. B. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant efflux pump. Antimicrob. Agents Chemother, 44:10-13, 2000;

OBER, N. Antibiotics for adult respiratory tract infections: clinical considerations and management pitfalls. Drug Benefit Trends 10:10-16, 1998;

OKUSU, H., MA, D., NIKAIDO, H., AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance mutants. J. Bacteriol. 178: 306-308, 1996;

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J.B.P.; HERNANDES, M.Z.; LIMA, M. C. A., GALDINO, S. L.; PITTA, I.R. Estrutura, Reatividade e Propriedades Biológicas de Hidantoínas. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 3, 614-622. **2008**.

OLIVEIRA, S. M.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; PITTA, M. G. R.; MALAGUENO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L. Behavior of *Schistosoma mansoni* adult worms maintained in vitro towards imidazolidinone derivatives. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23,3 ; 343-348. 2004.

OLIVEIRA, G. A., DELLÁQUILA, A. M., MASIERO, R. L., LEVY, C. E., GOMES, M. S., CUI, L., HIRATMATSU, K., MAMIZUKA, E. M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control and Hosp Epidemiol* 22: 443-448, 2001;

OLSON, J. M.; LANGELOH, A. *Farmacologia Clínica Ridiculamente Fácil*, Porto Alegre – PR, Artmed, 2009;

PARK, Y., KIM, H. J., HAHM, K. S. Antibacterial synergism of novel antibiotic peptides with chloramphenicol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321: 109-115, 2004;

PARK, Y., PARK, S. N., PARK, S. C., PARK, J. Y., PARK, Y. H., HAHM, J. S., HAHM, K. S. Antibiotic activity and synergistic effect of antimicrobial peptide against pathogens from a patient with gallstones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321: 631-637, 2004;

PEGUES, D. A., COLBY, C., HIBBERD, P. L. COHEN, L. G. AUSUBEL, F. M. CALDERWOOD, S. B., HOOPER, D. C. The epidemiology of resistance to ofloxacin and oxacillin among clinical coagulase-negative staphylococcal isolates: analysis of risk factors and types. *Clin. Infect. Dis.*, 26:72-79, 1998;

PETERSON, L. R., POSTELNICK, M., POZDOL, T. L. REISBERG, B., NOSKIN, G. A. Management of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – outcome of monitored use in a referral hospital. Int. J. Antimicrob. Agents, 10:207-214, 1998;

PIRNAU, A.; CHIS, V.; ONIGA, O.; LEOPOLD, N.; SZABO, L.; BAIAS, M.; COZAR, O. Vibrational Spectroscopy 48, 289-296, 2008;

PLOY, M. C., GRELAUD, C., MARTIN, C. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 351: 1212, 1998;

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 10, suppl. 4, p. 23-31, 2004;

QUALE, J.M., LANDMAN, D., BRADFORD, P.A., VISALLI, M., RAVISHANKAR, J., FLORES, C., MAYORGA, D., VANGALA, K., ADEDEJI, A., Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. Clin. Infect. Dis. 35, 834–841, 2002;.

QUINTILIANI, R., NIGHTINGALE, C. H., FREEMAN, C. D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in antibiotic selection, with particular attention to oral cephalosporin. Infect Dis Clin Pract 3:1-7, 1994;

RAJIC, Z., B. ZORC, S. RAIC-MALIC, K. ESTER, M. KRALJ, K. PAVELIC, J. BALZARINI, E. DE CLERCQ, M. MINTAS. Hydantoin derivatives of L- and D-amino acids: synthesis and evaluation of their antiviral and antitumoral activity. Molecules. 11, 837. 2006.

REESE, R. E., BETTS, R. F., GUMUSTOP, B. Manual de Antibióticos, Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2002;

ROSSI, F., ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma, São Paulo – SP: Atheneu, 2005;

ROSSOLINI, G. M. Acquired metallo- β -lactamases: na increasing clinical threat. Clin. Infect. Dis., v. 41, p. 1557-1558, 2005;

SÁ DEL FIOL, F., LOPES, L. C., TOLEDO, M. I., BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 43 (1), 68-72, 2010;

SATO, M., TANAKA, H., YAMAGUCHI, R., KATO, K., ETOH, H. Sinergistic effects of mupirocin and isoflavanone isolated from *Erythrina variegata* on growth and recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents 24: 43-48, 2004;

SHABERG, R. W. Antimicrobial resistance in long term care facilities. Inf Control and Hosp. Epidemiol 17: 129-139, 1991;

SHABBIRI, K., AHMAD, W., SYED, Q., ADNAN, A. Isolation and purification of complex II from *proteus mirabilis* strain ATCC 29245. Braz. J. Microbiol. 41(3): 796-804, 2010;

SIDRIM, J. J. C., MOREIRA, J. L. B., PAIXÃO, G. C., LIMA, S. B. M.FILHO, R. E., ROCHA, M. F. G., LIMA, A. A. M. Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 31(3): 263-270, 2008;

SILVA DIAS, R.C.; BORGES-NETO, A.A.; FERRAIUOLI, G.I.D. *et al.* - Prevalence of AmpC and other β -lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. Diagn. Microbiol. infect. Dis., 60: 79-87, 2008;

SILVA, P. Farmacologia, Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2010;

SMITH, K. E., BESSER, J. M., HEDBERG, C. W., LEANO, F. T., BENDER, J. B., WICKLUND, J. H., JOHNSON, B. P., MOORE, K. A., OSTERHOLM, M. T.

Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. N. Engl. J. Med. 340:1525-1532, 1999;

SOUZA, H. P.; VILHORDO, D. W.; BREIGEIRON, R.; ALESSANDRETTI, M. B.; DOTTI, E.; BARBOSA E SILVA, T. G. Auditoria no uso de antimicrobianos em enfermaria cirúrgica.

Rev. Col. Bras. Cir., 35(4), 216-222, 2008.

SPRINGHOUSE, C. Farmacologia Clínica Incrivelmente Fácil, Rio de Janeiro – RJ, Guanabara Koogan, 2010;

SUPERTI, S. V.; MARTINS, D. S.; CAIERÃO, J.; SOARES, F. S.; PROCHNOW, T.; ZAVASCKI, A. P. Case Report: indications of carbapenem resistance evolution through heteroresistance as na intermediate stage in *Acinetobacter baumannii* after carbapenem administration. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v.51(2): 111-113, 2009;

SUPERTI, S. V.; AUGUSTI, G.; ZAVASCKI, A. P. Risk factors for and mortality of extended-spectrum-b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v.51(4): 211-216, 2009;

TENÓRIO, R. P.; LIMA, J. G.; SANTOS, D. M. S.; ALVES, A.J.; FARIA, A.R.; ARAÚJO, J. M.; GÓES, A. J. S. Resumos do I Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, Recife, Brasil, 2004.

TENOVER, F. C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. Clin. Infect. Dis., v. 33, suppl. 3, p. S108-S115, 2001.

TENOVER, F. C., LANCASTER, M. V. HILL, B. C. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol 36: 1020-1027, 1998;

TORTORA, G., FUNKE, B. R., CASE, C. Microbiologia, Porto Alegre – PR, Artmed, 2005;

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia, São Paulo - SP: Atheneu, 1999;

TUNÇBILEK, M., ALTANLAR, N. II Farmaco 54 475-478, 1999;

VERÇOZA, G. L.; FEITOZA, D. D.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M.; LIMA, J. G.; ARAÚJO, J. M.; CUNHA, I. G. B.; GÓES, A. J. S., Química Nova, 32 n. 6, 1405-1410, 2009;

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia, São Paulo – SP, Atheneu, 2010;

WENZEL, R. P. The antibiotic pipeline – challenges, costs, and values. N Engl J Med 2004; 351 (6): 523-6;

WINGETER, M. A., GUILHERMETTI, E., SUINOBU, C. S., TAKAKI, I., SVIDZINSKI, T. I. E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 40(3): 272-276, 2007;

WITZEL, A. L., SILVEIRA, F. R. X., PIRES, M. C. P., LOTUFO, M. A. Oral candidiasis in HIV+ patients under treatment with protease inhibitors. Braz. oral res. 22(4): 371-377, 2008;

5. CONCLUSÕES

- Todos os compostos tiazolidínicos e imidazolidínicos mostraram valores de CMI entre 64 e 32 µg/ml frente a bactérias Gram-negativas;
- Não houve inibição antifúngica significativa dos compostos testados frente às espécies de *Candida* spp;
- Em relação às tiazolidinas LYSO-3, LYSO-5, LYSO-6, foram obtidos valores de CMI de 32 µg/ml, frente às espécies *Acinetobacter baumannii* e *Shigella sonnei*;
- Os melhores efeitos antibacterianos, com valores de CMI de 32 µg/ml, em relação às imidazolidinas, foram observados da seguinte maneira: NN-19B e NN-41 contra *Escherichia coli*, *Escherichia coli* resistente, *Shigella sonnei* e *Acinetobacter baumannii*; NN-52 frente à *Escherichia coli* resistente e NN-56, NN-100 e NN-177 contra *Acinetobacter baumannii*;
- Em relação à cepa de *Escherichia coli* resistente (ATCC 35218), os melhores resultados foram observados diante dos compostos imidazolidínicos, NN-19B, NN-41 e NN-52, que mostraram CMI de 32 µg/ml;
- A combinação do derivado imidazolidínico NN-41 com o antibiótico ampicilina mostrou efeito inibitório sinérgico frente à bactéria *E. coli* resistente (ATCC 35218);
- Foram observadas alterações na morfologia da parede celular, formação de vacúolos e edemas intracelulares, quando avaliada a ação antimicrobiana do composto imidazolidínico NN-41 sobre a bactéria *E. coli* resistente (ATCC 35218).

Capítulo 2

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVAS TIAZOLIDINAS E IMIDAZOLIDINAS

Artigo a ser submetido ao periódico:

REVISTA QUÍMICA NOVA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVAS TIAZOLIDINAS E IMIDAZOLIDINAS

Sibele Ribeiro de Oliveira, Norma Buarque de Gusmão, Ivan da Rocha Pitta, Maria do Carmo Alves de Lima, Suely Lins Galdino

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária, 50670-901 Recife-PE, Brasil

SYNTHESIS AND ASSESSMENT OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEW TIAZOLIDINE AND IMIDAZOLIDINE

Abstract

The reduction of the antibiotics sensitivity increased in several microorganisms. The search for new drugs to bring further success in the treatment of the infections are target of research. The tiazolidine and imidazolidine are compounds of large scientific interest due to chemistry properties and the biologic activities. This paper considered the antimicrobial activity of new tiazolidine and imidazolidine in front the sensitive and resistant Gram-negative bacteria. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined *in vitro* using Mueller-Hinton broth and agar. Serial dilutions of each drug are prepared in Dimetilformamide(DMF), of concentrations changing to 128-0,5µg/ml. Antimicrobial *in vitro* activity was determined on some compounds, with MIC of 32µg/ml.

Keywords: tiazolidine, imidazolidine, antimicrobial activity

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são responsáveis por um grande número de mortes na população mundial. A redução da sensibilidade aos agentes antimicrobianos de uso corrente tem aumentado em uma grande variedade patógenos e a resistência à múltiplas drogas tem sido comum a vários microrganismos. A diminuição da resposta aos agentes antimicrobianos de uso corrente tem aumentado significativamente quando se avalia, por exemplo, o perfil de sensibilidade de bacilos Gram-negativos como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* frente aos β -lactâmicos, classe de antibióticos muito utilizada clinicamente, composta por: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos^{1,2}. Os carbapenens apresentam amplo espectro de atividades e constituem a terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para aquelas infecções causadas por microrganismos resistentes. A resistência a esta classe de fármacos acontece pela produção de enzimas capazes de hidrolisar os β -lactâmicos disponíveis comercialmente³.

A busca por novos medicamentos que possam trazer maior sucesso nos tratamentos de doenças infecciosas, principalmente, minimizando os casos de resistência bacteriana tem aumentado significativamente. Nesse contexto, a química orgânica, através dos planejamentos e modificações moleculares tem contribuído em grande parte das descobertas, observando-se um crescimento considerável de compostos sintéticos no uso clínico⁴.

Dentre as classes de substâncias, as tiazolidinas e imidazolidinas representam compostos de grande interesse científico devido as suas propriedades químicas e ao extenso espectro de atividades biológicas. O anel 4-tiazolidinona possui vários sítios de substituição, o que leva a um grande número de análogos estruturais, podendo-se, desta

maneira, obter diferentes atividades biológicas. E nas posições 2, 3 e 5 do anel, podem ser atribuídas modificações nos parâmetros físico-químicos e estruturais (lipofílicos, eletrônicos, polares e esféricos) das moléculas⁵.

Kavitha *et al.*⁶ relataram que 4-tiazolidinonas substituídas em N-3 contendo o grupo 1-[2-amino-1-(4-metóxi-fenil)-etil]-ciclo-hexanol apresentam atividade significativa para *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma spp.* Os compostos apresentaram menores valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) quando comparados com fármacos padrões, como estreptomicina e nistatina.

Tenório *et al.*⁷ e Aquino *et al.*⁸ demonstraram que 4-tiazolidinonas contendo grupo ácido acético na posição 5, bem como com uma função aril-hidrazona substituída na posição 2 do anel tiazolidinônico, possuem consideráveis atividades antibióticas para várias bactérias e fungos.

Em relação às imidazolidinas, compostos contendo o sistema hidantoínico, possuem propriedade antifúngica e antibacteriana: a iprodiona [3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioxo-imidazolidina-1-carboxiamida] constitui o fungicida hidantoínico mais importante, inibindo ao mesmo tempo a germinação de esporos e o crescimento de micélios de fungos. Por outro lado, as moléculas 5-(aril-metileno)-hidantoínas e 5-(aril-metileno)-2-tio-hidantoínas, obtidas pela condensação de aldeídos aromáticos com hidantoínas ou tio-hidantoínas, apresentam atividade fungicida e bactericida⁹.

Góes e colaboradores,¹⁰ em 1991, relataram a ação antibacteriana apresentada por derivados 5-benzilideno-3-fenil-imidazolidinônicos frente ao *Enterococcus faecalis* e *Mycobacterium smegmatis*, tendo sido também observada a ação antifúngica de alguns derivados desta série frente aos fungos *Candida albicans* e *Neurospora crassa*.

Em 1992, Lima e colaboradores¹¹ estudaram a atividade antimicrobiana de derivados 3-(4-cloro-benzil)-5-benzilideno-imidazolidinônicos e observaram, através da

determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI), que o derivado com o substituinte NO₂ em posição 4 no grupo benzilideno foi ativo contra *Candida albicans* e *Neurospora crassa* e também frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*.

Cavalcanti Amorim e colaboradores¹², em 1992, determinaram a atividade antimicrobiana de compostos da série 3-(4-bromo-benzil)-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona. Os resultados mostraram uma atividade antifúngica variando de 30 a 50 µg/mL para os compostos testados para *Candida albicans* e *Neurospora crassa*, enquanto a CMI para o *Mycobacterium smegmatis* ficou entre 10 e 50 µg/mL.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido buscando sintetizar novos derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos e testá-los acerca da atividade antimicrobiana frente à bactérias Gram negativas bastante isoladas na clínica médica atual com potencial de resistência aos fármacos de uso corrente.

PARTE EXPERIMENTAL

Derivados tiazolidínicos utilizados

Foram utilizados os seguintes compostos derivados tiazolidínicos: GQ-81 (3-(Dichloro-benzyl)-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione; LYSO-3 (5-Biphenyl-4-ylmethylene-3-(4-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione), LYSO-5 (3-(4-Chloro-benzyl)-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione, e LYSO-6 (3-(4-Chloro-benzyl)-5-(4-dimethylamino-benzylidene)-thiazolidine-2,4-dione).

Derivados imidazolidínicos utilizados

Foram utilizados os seguintes compostos derivados imidazolidínicos: NE-1C (3-Benzyl-5-benzylidene-imidazolidine-2,4-dione, FZ-2 (5-Benzylidene-3-(4-chloro-benzyl)-imidazolidine-2,4-dione), FZ-3 3-(4-Chloro-benzyl)-5-(4-chloro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione, FZ-5(F) (3-(4-Chloro-benzyl)-5-(2-fluoro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione, NN-19B 3-(4-Chloro-benzyl)-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one, NN-41 (3-(2-Biphenyl-4-yl-2-oxo-ethyl)-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one, NN-52 (3-(4-Bromo-benzyl)-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one, NN-56 (5-(1*H*-Indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one), NN-100 (5-(1*H*-Indol-3-ylmethylene)-3-(4-nitro-benzyl)-2-thioxo-imidazolidin-4-one), NN-163 3-[2-(4-Bromo-phenyl)-2-oxo-ethyl]-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one) e NN-177 5-(1*H*-Indol-3-ylmethylene)-3-(2-oxo-2-phenyl-ethyl)-2-thioxo-imidazolidin-4-one.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das tiazolidinas GQ-81, LYSO-3, LYSO-5 e LYSO-6 e das imidazolidinas NE-1C, FZ-2, FZ-3, FZ-5(F), NN-19B, NN-41, NN-52, NN-56, NN-100, NN-163 e NN-177 foram avaliadas *in vitro* contra as seguintes bactérias Gram-negativas, sendo algumas cepas ATCC e, outras, obtidas da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414), *Shigella sonnei* (UFPEDA 413), *Proteus vulgaris* (UFPEDA 740), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC

27853), *Acinetobacter baumannii* (UFPEDA 738) e uma cepa de *Escherichia coli* resistente (ATCC 35218), produtora de metalo- β -lactamase.

O caldo e o ágar Mueller-Hinton foram usados para os testes de atividade antimicrobiana¹³. Diluições seriadas de cada composto foram preparadas em Dimetilformamida(DMF), sendo a primeira concentração de 128 μ g/ml e a última de 0,5 μ g/ml. Os microrganismos-testes e concentrações decrescentes dos compostos foram transferidas para microplacas (96 poços) contendo o caldo Mueller Hinton e incubados em estufa bacteriológica (37°C) de 18-24 horas, de acordo com o NCCLS¹⁴.

Depois do período de incubação, 10 μ L de cada poço foi semeado em placas de Petri contendo o ágar Mueller-Hinton, isento das substâncias antimicrobianas. E após 24hs foram realizadas as leituras quanto à presença ou ausência de crescimento, comparada com o controle positivo. A Concentração Inibitória Mínima (MIC)¹⁵ é considerada a menor concentração da droga para a qual não há crescimento microbiano, em caldo, e, a Concentração mínima bactericida determinada pela ausência de crescimento em meio sólido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados da atividade antimicrobiana, os testes utilizando apenas o solvente DMF não apresentaram atividade antimicrobiana. As tiazolidinas testadas mostraram atividade antibacteriana frente aos bacilos Gram-negativos até a concentração de 64 μ g/ml, entretanto, os compostos LYSO-3, LYSO-5 e LYSO-6 mostraram inibição de crescimento até a concentração de 32 μ g/ml para os gêneros *Acinetobacter baumannii* e *Shigella sonnei*. (Tabela 1)

Tabela 1: valores de Concentração Inibitória Mínima (CMI) das novas tiazolidinas testadas frente às bactérias Gram negativas.

Bactérias	CMI (µg/mL)			
	GQ-81	LYSO-3	LYSO-5	LYSO-6
<i>E. coli</i>	64	64	64	64
<i>E. coli</i> resistente	64	64	64	64
<i>Salmonella enteritidis</i>	64	64	64	64
<i>Shigella sonnei</i>	64	32	32	32
<i>Proteus vulgaris</i>	64	64	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	64	64	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64	64	64	64
<i>Acinetobacter baumannii</i>	64	32	32	32

Os compostos NE-1C, FZ-2, FZ-3, FZ-5(F) e NN-163 mostraram resultados de CMI de 64µg/mL, enquanto que NN-19B e NN-41 apresentaram CMI de 32 µg/mL frente às bactérias *Escherichia coli*, *Escherichia coli* resistente, *Shigella sonnei* e *Acinetobacter baumannii*. O NN-52 mostrou CMI de 32 µg/mL frente à *Escherichia coli* resistente e os compostos NN-56, NN-100 e NN-177 mostraram CMI de 32 µg/mL frente ao gênero *Acinetobacter baumannii*. (Tabelas 2 e 3)

Tabela 2: valores de Concentração Inibitória Mínima (CMI) das novas imidazolidinas testadas frente às bactérias Gram-negativas.

Microrganismo	CMI (µg/mL)				
	NE-1C	FZ-2	FZ-3	FZ-5(F)	NN-19B
<i>E. coli</i>	64	64	64	64	32
<i>E. coli</i> resistente	64	64	64	64	32
<i>Salmonella</i> spp.	64	64	64	64	64
<i>Shigella</i> spp.	64	64	64	64	32
<i>Proteus</i> spp.	64	64	64	64	64
<i>Klebsiella</i> spp.	64	64	64	64	64
<i>Pseudomonas</i> spp.	64	64	64	64	64
<i>Acinetobacter</i> spp.	64	64	64	64	32

Tabela 3: valores de Concentração Inibitória Mínima (CMI) das novas imidazolidinas testadas frente às bactérias Gram negativas.

Bactérias	CMI (µg/mL)					
	NN-41	NN-52	NN-56	NN-100	NN-163	NN-177
<i>E. coli</i>	32	64	64	64	64	64
<i>E. coli</i> resistente	32	32	64	64	64	64
<i>Salmonella</i> spp.	64	64	64	64	64	64
<i>Shigella</i> spp.	32	64	64	64	64	64
<i>Proteus</i> spp.	64	64	64	64	64	64
<i>Klebsiella</i> spp.	64	64	64	64	64	64
<i>Pseudomonas</i> spp.	64	64	64	64	64	64
<i>Acinetobacter</i> spp.	32	64	32	32	64	32

CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou a avaliação antimicrobiana de derivados tiazolidínicos e imidazolidínicos. Todos os compostos que foram avaliados *in vitro* contra diferentes espécies de bactérias Gram negativas mostraram atividade antimicrobiana. Contudo, melhores efeitos antibacterianos, com menores valores de CMI foram observados com os compostos LYSO-3, LYSO-5, LYSO-6 frente às espécies *Acinetobacter baumannii* e *Shigella sonnei*, NN-19B e NN-41, contra *Escherichia coli*, *Escherichia coli* resistente, *Shigella sonnei* e *Acinetobacter baumannii*, o NN-52 frente à *Escherichia coli* resistente e os compostos NN-56, NN-100 e NN-177, que apresentaram melhor atividade contra *Acinetobacter baumannii*.

REFERÊNCIAS

- 1 – F.L.Gouveia, R.M.B. Oliveira, T. B. Oliveira, I. M. Silva, S. C. Nascimento, K. X. F. R. Sena, J.F.C.Albuquerque, European Journal of Medicinal Chemistry 44 (2009) 2038-2043.

2 – C.M.Bertoncheli, R.Horner, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 44 n. 4 (2008) 577-599.

3 – R.N.Jones, Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistance. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 51 (2005) 77-84.

4-G.L.Verçoza, D.D.Feitoza, A.J.Alves, T.M.Aquino, J.G.Lima, J.M.Araújo, I.G.B.Cunha, A.J.S.Góes, Química Nova, 32 n. 6 (2009) 1405-1410.

5 – A.P.Liesen, T.M.Aquino, A.J.S.Góes, J.G.Lima, A.R.Faria, A.J.Alves, Química Nova 31 (2008) 369.

6 – C.V.Kavitha, N.S.S.Basappa, K.Mantelingu, S.Doreswamy, M.A.Sridhar, J.S.Prasad, K.S.Rangappa, Bioorg. Med. Chem. 14(2006) 2290.

7 – R.P.Tenório, J.G. Lima, D.M.S. Santos, A.J.Alves, A.J.Alves, A.R.Faria, J.M.Araújo, A.J.S.Góes, Resumos do I Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, Recife, Brasil, 2004.

8 – T.M.Aquino, A.P.Liesen, R.O.E.Silva, V.T.Lima, C.S.Carvalho, A.R.Faria, J.M.Araújo, J.G.Lima, A.J.Alves, E.J.T.Melo, A.J.S.Góes, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008), 446.

9 – Marton, J., Enisz, J., Hosztafi, S., Timar, T., J. Agric. Food Chem. 41 (1993), 148.

10 – Góes, A.J.S., Lima,M.C.A., Galdino,S.L., Pitta,I.R., Luu-Duc,C., J. Pharm. Belg. 46 (1991) 236.

11 – Lima,M.C.A., Costa,L.B., Góes,A.J.S.,Galdino,S.L., Pitta,I.R.,Luu-Duc,C., Pharmazie 47 (1992), 182.

12 – Cavalcanti Amorim, E.L., Ferreira Brandão,S.S., Morais Cavalcanti, C.O., Lins Galdino,S., Rocha Pitta, I., Luu-Duuc,C., Ann. Pharm. Fr. 2 (1992), 103.

13 – R.Cleeland, E.Grunberg, Laboratory evaluation of new antibiotics in Laboratory Medicine, Baltimore, Williams and Wilkins, 1986, 825-876.

14 – National Committee for Clinical Laboratory Standards; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 3rd., Approved Standard, NCCLS publication M7-A3, Villanova, PA, 1993; National Committee for Clinical Laboratory Standards; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Proposed Standard, NCCLS Document M27-P, Villanova, PA, 1992.

15 – J.F.C.Albuquerque, J.A.Rocha Filho, S.S.F.Brandao, M.C.A.Lima, E.A.Ximenes, S.L.Galdino, I.R.Pitta, J.Chantegrel, M.Perrissin, C.Luu-Duc, II Farmaco 54 (1999) 77-82.

Capítulo 3

SYNERGISTIC EFFECT OF THE NEW IMIDAZOLIDINE WITH AMPICILLIN AGAINST RESISTANT *ESCHERICHIA COLI*

Artigo a ser submetido ao periódico:

INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS

**Synergistic effect of the ampicillin with new imidazolidine against resistant
*Escherichia coli***

Sibele Ribeiro de Oliveira, Norma Buarque de Gusmão, Maria do Carmo Alves de
Lima, Ivan da Rocha Pitta, Suely Lins Galdino

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade
Universitária, 50670-901 Recife-PE, Brasil

Resumo

O efeito antimicrobiano sinérgico de um novo derivado imidazolidínico (NN-41), combinado com o antibiótico ampicilina sobre a bactéria *Escherichia coli* resistente (ATCC 35218) foi avaliado através da técnica de microdiluição em caldo. O teste de difusão em meio sólido, realizado com o composto mostrou halo de inibição de 14mm sobre a bactéria resistente e de 20mm quando a imidazolidina foi incorporada ao disco de ampicilina. O derivado mostrou atividade antibacteriana e sua combinação com ampicilina mostrou efeito sinérgico dos antimicrobianos.

1. Introdução

Os agentes antimicrobianos são indispensáveis nos tratamentos das mais diversas patologias causadas por microrganismos. A ocorrência de espécies resistentes aos antibióticos de uso corrente tem levado a comunidade científica a pesquisas em busca de fármacos e/ou interações medicamentosas cada vez mais potentes (1,2). Ampicilina foi a primeira penicilina semi-sintética que mostrou ação contra bacilos Gram-negativos abrindo o campo de penicilinas de amplo espectro, entretanto, atualmente, os casos de resistência limitam sua ação. Espécies de *Escherichia coli* resistentes representam um dos maiores problemas no tratamento de pacientes infectados por este tipo bacteriano (3,4,5,6,7,8).

Os compostos imidazolidínicos representam uma classe de grande interesse pela comunidade científica devido às suas propriedades químicas e ao grande espectro de atividades biológicas. Contendo o sistema hidantoínico, possuem ação antifúngica e antibacteriana: a iprodiona [3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioxo-imidazolidina-1-carboxiamida] constitui um fungicida importante, inibindo a germinação de esporos e o crescimento de micélios de fungos. As moléculas 5-(aril-metileno)-hidantoínas e 5-(aril-metileno)-2-tio-hidantoínas, obtidas pela condensação de aldeídos aromáticos com hidantoínas ou tio-hidantoínas, apresentam atividade fungicida e bactericida (9).

Alguns derivados 5-benzilideno-3-fenil-imidazolidinônicos apresentaram atividade antibacteriana frente ao *Enterococcus faecalis* e *Mycobacterium smegmatis* (10).

A atividade antimicrobiana de derivados 3-(4-cloro-benzil)-5-benzilideno-imidazolidinônicos foi observada contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*, sendo verificada atividade do derivado com o substituinte NO₂ em posição 4 no grupo benzilideno (11).

Uma alternativa na busca de novos componentes antibacterianos é o uso do sinergismo antibiótico, uma terapia antimicrobiana conhecida e aplicada com a combinação de fármacos. Este trabalho buscou estudar a atividade antimicrobiana da ação combinada entre a nova imidazolidina NN-41 e o antibiótico ampicilina sobre a cepa bacteriana resistente de *Escherichia coli* (ATCC 35218).

2. Material e métodos

2.1 Imidazolidina

Foi utilizado o derivado imidazolidínico 3-(2-Biphenyl-4-yl-2-oxo-ethyl)-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one para os testes de análise do efeito sinérgico com o antibiótico ampicilina.

2.2 Preparação bacteriana

A cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 foi obtida do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco. Sua resistência foi determinada de acordo com o guia do National Committee for Clinical Standards (12). O crescimento aconteceu em aerobiose no Agar Mueller-Hinton (Himedia) por 24h em 37°C, depois do qual foi realizada uma suspensão bacteriana de concentração final de 0,5 da escala de McFarland para realização do teste de disco utilizando ampicilina e a imidazolidina NN-41.

2.3 Antibiótico

O antibiótico ampicilina (Sigma Chemical Co.) foi utilizado no estudo.

2.4 Atividade antimicrobiana in vitro

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do composto imidazolidínico NN-41 frente à *E. coli* resistente foi realizada usando a técnica de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 poços. O composto foi diluído em Dimetilformamida (DMF) e realizado diluições seriadas na concentração de 128µg/ml até 0,5µg/ml e após inoculado 10µl de uma suspensão bacteriana, sempre realizadas em duplicata. As microplacas foram incubadas por 24hs em 35°C. Para a determinação da CMB 10 µl do conteúdos dos poços foram transferidos para placas de Petri contendo o agar Mueller-Hinton, a CMB foi definida como a menor concentração do composto que não mostrou crescimento. Os controles, positivo e negativo, foram realizados, sendo o primeiro com a bactéria e o meio de cultura e o segundo, apenas com o meio de cultura. Um controle contendo apenas o solvente foi utilizado para avaliação da interferência do DMF na inibição bacteriana.

O efeito combinado do antibiótico ampicilina com a imidazolidina NN-41 frente ao crescimento da bactéria *E.coli* foi avaliado utilizando a metodologia de difusão em meio sólido com disco de papel preconizada por Bauer e Kirby (1966) modificada, onde quatro discos foram impregnados, o primeiro com o solvente DMF, outro contendo a imidazolidina dissolvida em DMF, outro sendo o disco com o antibiótico ampicilina e o último com ampicilina com a imidazolidina NN-41. A placa foi incubadas por 24hs em 35-37°C para viabilidade do crescimento microbiano.

3. Resultados

3.1 CIM e CBM da imidazolidina

O CIM da NN-41 mostrou-se igual à CBM, de 32µg/mL, frente à bactéria *E. coli* resistente (ATCC 35218). Os controles positivo e negativo mostraram, respectivamente, crescimento e ausência, respectivamente, e, a mistura do solvente com a suspensão bacteriana apresentou crescimento normal, quando semeado no meio de cultura, indicando que o DMF não interferiu na atividade antimicrobiana da imidazolidina.

3.2 Efeito combinado da NN-41 com a ampicilina

Quando o composto imidazolidínico foi combinado ao disco de antibiótico ampicilina, houve aumento do halo de inibição de crescimento da *E. coli* resistente. O disco impregnado com DMF não exibiu inibição de crescimento bacteriano, assim como disco contendo apenas ampicilina. NN-41 presente, isoladamente, no outro disco, mostrou um halo de inibição de crescimento de 14mm. A presença da imidazolidina no disco de ampicilina mostrou aumento do processo inibitório, com formação de um halo de inibição de 20mm (Figura 1).

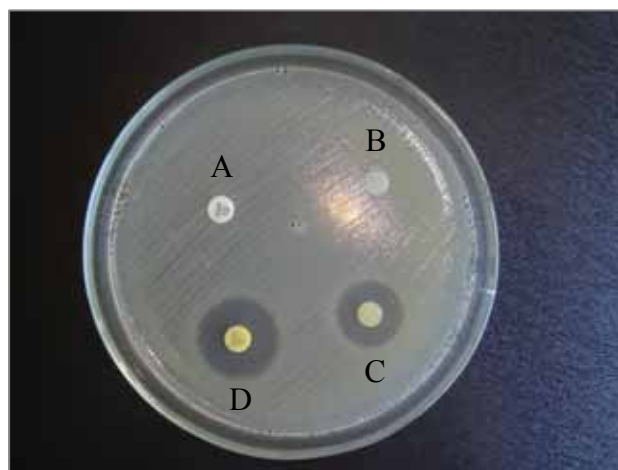


Fig.1 Sinergismo da imidazolidina sobre o antibiótico frente ao crescimento de *E. coli* resistente (ATCC35218). Em A, disco contendo ampicilina, em B, o solvente DMF, em C, disco impregnado com NN-41 e em D, a ação sinérgica do composto imidazolidínico sobre o antibiótico ampicilina.

4. Discussão

A atividade antimicrobiana foi verificada quando a bactéria *E. coli* resistente foi colocada em contato com a imidazolidina sintetizada, sendo maior este efeito inibitório quando o derivado imidazolidínico foi combinado com o disco de ampicilina.

A ampicilina, uma aminopenicilina foi desenvolvida por causa da necessidade de antibióticos com atividade contra bactérias Gram-negativas, sendo utilizada inicialmente contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., e *Neisseria* spp (13,14). Muitas bactérias Gram-negativas, incluindo a família *Enterobacteriaceae* e *Haemophilus influenzae*, são atualmente resistentes às penicilinas por causa da produção de β -lactamases. Inibidores dessas enzimas, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam inibem a ação de β -lactamases de bactérias resistentes, estando disponível, por exemplo, a combinação ampicilina-sulbactam. Atualmente, um grupo de drogas da classe das penicilinas são ineficazes contra bactérias Gram-negativas resistentes, que produzem alguns tipos de β -lactamases, incluindo β -lactamases de espectro estendido (15,16).

Desta maneira, foi demonstrado que o derivado imidazolidínico NN-41 exibe atividade antimicrobiana frente à *E. coli* resistente (ATCC 35218), bem como que a combinação com o antibiótico ampicilina mostrou efeito inibitório sinérgico frente à mesma bactéria. Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização farmacológica deste novo composto como agente antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas resistentes.

Referências

- 1 – Y.Park, S.N.Park, S.C.Park, J.Y.Park, Y.H.Park, J.S.Hahm, K.S.Hahm, Antibiotic activity and synergistic effect of antimicrobial peptide against pathogens from a patient with gallstones, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321 (2004) 631-637;
- 2 – T.Ya-Li, S.Yong-Hui, Z.Wei, H.Gang, L.Guo-Wei, Discovery of a novel antimicrobial peptide using membrane binding-based approach, *Food Control*. 20 (2009) 149-156;
- 3 – S.Hemaiswarya, M.Doble, Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, *Phytomedicine*. 16 (2009) 997-1005;

- 4 – M. Tré-Hardy, C. Macé, N.El Manssouri, F.Vanderbist, H.Traore, M.Jean Devleeschouwer, Effect of antibiotic co-administration on young and mature biofilms of cystic fibrosis clinical isolates: the importance of the biofilm model, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33 (2009) 40-45;
- 5 – Y. Zai-Chang, W.Bo-Chu, Y.Xiao-Sheng, W.Qiang, R.Liang, The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 41 (2005) 79-81;
- 6 – M.Sato, H.Tanaka, R.Yamaguchi, K.Kato, H.Etoh, Synergistic effects of mupirocin and an isoflavanone isolated from *Erythrina variegata* on growth and recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24 (2004) 43-48;
- 7 – H.Muroi, K.I.Nihei, K.Tsujimoto, I.Kubo, Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 12 (2004) 583-587;
- 8 – G.Gunics, N.Motohashi, L.Amaral, S.Farkas, J.Molnár, Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 14 (2000) 239-242;
- 9 – Marton, J., Enisz, J., Hosztafi, S., Timar, T., *J. Agric. Food Chem*. 41 (1993), 148.
- 10 – Góes, A.J.S., Lima,M.C.A., Galdino,S.L., Pitta,I.R., Luu-Duc,C., *J. Pharm. Belg*. 46 (1991) 236.
- 11 – Lima,M.C.A., Costa,L.B., Góes,A.J.S.,Galdino,S.L., Pitta,I.R.,Luu-Duc,C., *Pharmazie* 47 (1992), 182.
- 12 – National Committee for Clinical Laboratory Standards; *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 3rd., Approved Standard, NCCLS publication M7-A3, Villanova, PA, 1993; National Committee for Clinical Laboratory Standards; *Reference Method for Broth Dilution Antifungal*

Susceptibility Testing of Yeasts, Proposed Standard, NCCLS Document M27-P, Villanova, PA, 1992.

13 – A.I.Barnes, I.L.Herrero, I. Albesa, New aspect of the synergistic antibacterial action of ampicillin and gentamicin, International Journal of Antimicrobial Agents. 26 (2005) 146-151;

14 – D.C.Dressel, M.A.Tornatore-Reuscher, C.R.Boschman, V.Stosor, T.Zembower, M.J.Postelnick, G.A.Noskin, L.R.Peterson, Synergistic effect of gentamicin plus ampicillin on *Enterococci* with differing sensitivity to gentamicin: a phenotypic assessment of NCCLS guidelines, Diagn Microbiol Infect Dis. 35 (1999) 219-225.

15 – P.A.Miglioli, F.Allerberger, I.Walderberg, J.Hasse, Antibacterial activity of human pleural fluid: alone and in combination with antibiotics, International Journal of Antimicrobial Agents. 10 (1998) 317-319;

16 – N.Khardori, Antibiotics – Past, Present, and Future, Med Clin N Am. 90 (2006) 1049-1076.

Capítulo 4

ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE UMA NOVA IMIDAZOLIDINA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* RESISTENTE

Artigo a ser submetido ao periódico:

INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES

**Elucidação do mecanismo de ação antimicrobiana de uma nova imidazolidina
sobre *Escherichia coli* resistente**

Sibele Ribeiro de Oliveira*, Norma Buarque de Gusmão*, Maria do Carmo Alves de Lima*, Ivan da Rocha Pitta*, Christina Alves Peixoto**, Suely Lins Galdino*

* Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife-PE, Brasil

** Laboratório de Microscopia do Centro Estratégico de Tecnologias do Nordeste (CETENE)

Resumo

A ocorrência de cepas bacterianas resistentes tem conduzido os pesquisadores a buscarem agentes antimicrobianos mais potentes para o combate às doenças infecciosas. Os antibióticos de uso corrente mostram efeito inibitório por ação sobre o patógeno de duas principais maneiras: destruição da estrutura da parede celular e membrana bacteriana ou pela interferência nos processos fisiológicos da mesma. Este trabalho avaliou a ação antibacteriana de um novo composto imidazolidínico (3-(2-Biphenyl-4-yl-2-oxo-ethyl)-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one) frente à *Escherichia coli* resistente (ATCC 35218) através da análise, via microscopia eletrônica de transmissão, da morfologia microbiana após exposição à imidazolidina por 6 horas de incubação (37°C) em meio de cultura líquido Mueller-Hinton. Os resultados mostraram que a bactéria sofreu alterações morfológicas após exposição ao composto, com formação de vacúolos e edemas intracelulares, sugerindo uma ação antibacteriana a nível de superfície microbiana.

1. Introdução

Os antibióticos tem sido indispensáveis no tratamento das doenças infecciosas modernas. O surgimento das cepas bacterianas resistentes, no entanto, tem conduzido a comunidade científica a pesquisas em busca de agentes antimicrobianos cada vez mais eficientes (1,2,3,4). Os antibióticos tem mostrado ação sobre o patógeno de duas principais maneiras: pela destruição da estrutura da parede celular e membrana bacteriana ou pela interferência nos processos fisiológicos da mesma. Mutações na estrutura da membrana plasmática e variações de enzimas bacterianas estão entre os mecanismos que podem levar à inativação dos antibióticos quando os mesmos encontram microrganismos resistentes (5,6,7,8,9).

Os compostos imidazolidínicos representam uma classe de grande interesse pela comunidade científica devido às suas propriedades químicas e ao grande espectro de atividades biológicas (10,11,12,13). Contendo o sistema hidantoínico, possuem ação antifúngica e antibacteriana: a iprodiona [3-(3,5-diclorofenil)-N-isopropil-2,4-dioxoimidazolidina-1-carboxiamida] constitui um fungicida importante, inibindo a germinação de esporos e o crescimento de micélios de fungos. As moléculas 5-(aril-metileno)-hidantoínas e 5-(aril-metileno)-2-tio-hidantoínas, obtidas pela condensação de aldeídos aromáticos com hidantoínas ou tio-hidantoínas, apresentam atividade fungicida e bactericida (14,15).

A atividade antimicrobiana de derivados 3-(4-cloro-benzil)-5-benzilidenoimidazolidinônicos foi observada contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*, sendo verificada atividade do derivado com o substituinte NO₂ em posição 4 no grupo benzilideno (16, 17, 18).

Espécies de *Escherichia coli* resistentes representam um dos maiores problemas no tratamento de pacientes infectados por este tipo bacteriano (19,21,22,23,24). Este trabalho teve como objetivo elucidar, via microscopia eletrônica de transmissão, a ação da imidazolidina NN-41(3-(2-Biphenyl-4-yl-2-oxo-ethyl)-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one), que mostrou atividade antibacteriana, frente à bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 35218) resistente, produtora da enzima betalactamase.

2. Material e métodos

2.1 Preparação bacteriana

A cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 foi obtida a partir do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco. Sua resistência foi determinada de acordo com o guia do National Committee for Clinical Standards (20). O crescimento aconteceu em caldo Mueller-Hinton (Himedia) por 24 horas em 37°C, depois do qual foi realizada uma suspensão bacteriana de concentração final de 0,5 da escala de McFarland e adicionada a imidazolidina NN-41 para ação sobre o microrganismo por 6 horas.

2.2 Imidazolidina

Foi utilizado o derivado imidazolidínico 3-(2-Biphenyl-4-yl-2-oxo-ethyl)-5-(1H-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one.

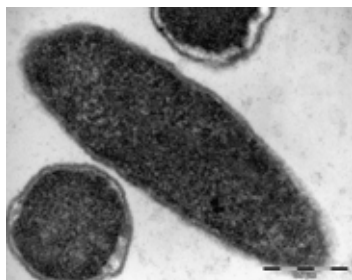
2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após fixação da bactéria tratada com a imidazolidina NN-41 por 6 horas em estufa bacteriológica (35°C-37°C), o material foi fixado com o fixador karnovisy. Após retirada do fixador com T. Cacodilato de sódio, por 3 vezes, ao longo de 10 minutos, foi colocado o pós- fixador com ósmo (OsO₄), acrescido de fenk durante 1 hora. O pós-fixador foi reatirado com T. Cacodilato de sódio por 10 minutos por 2 vezes e 1 vez com água destilada, depois do qual foi realizada contração em bloco (uranila 5%) por 1 hora). Passado esse tempo, foi realizado uma lavagem em água destilada 3 vezes de 10 minutos cada. A desidratação foi feita com acetona por 15 minutos 30% 50% 70% 90% (3 vezes de 100%). A infiltração aconteceu com EPON e Acetona (2:1; 1:1; 2:1) seguido do emblocamento e polimerização 60°C.

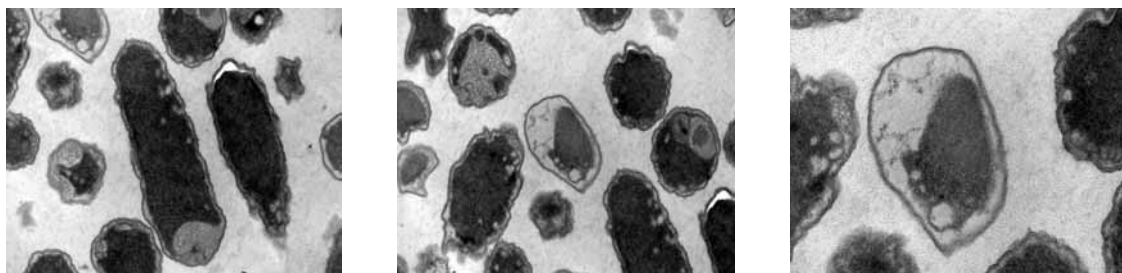
Foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão fabricado pela FEI, Morgagni 268D com as seguintes características: voltagem de aceleração desde 40 até 100 kV, resolução de ponto de 0.45 nm, resolução de linha de 0.34 nm, magnificação de até 180.000x e câmera CCD.

3. Resultados

Os resultados (Figuras 3, 4 e 5) mostraram que a bactéria *E. coli* resistente (ATCC 35218) sofreu várias alterações morfológicas após exposição da mesma ao composto imidazolidínico NN-41, com formação de vacúolos e edemas intracelulares. O controle (Figuras 1 e 2), contendo apenas o microrganismo e o meio de cultura, mostrou os bacilos íntegros, sem modificações estruturais.



Figs.1 e 2. Bactéria *E. coli* resistente (ATCC 35218) em meio de cultura Mueller-Hinton líquido após 6 horas de incubação em 37°C.



Figs.3, 4 e 5. Bactéria *E. coli* resistente (ATCC 35218), após tratamento com o derivado imidazolidínico NN-41, em meio de cultura Mueller-Hinton líquido após 6 horas de incubação em 37°C.

4. Discussão

O composto imidazolidínico NN-41 mostrou atividade antimicrobiana quando exposto a bactéria *E. coli* resistente (ATCC 35218) por 6 horas de incubação em estufa bacteriológica. De uma maneira geral, os antimicrobianos usualmente ativos contra as bactérias tem mostrado ação sobre a parede celular, síntese protéica ou inibição a nível de material genético. Semelhante a ação observada neste trabalho, os antibióticos da classe dos betalactâmicos inibem as bactérias pela ação sobre a superfície externa bacteriana (25). A ação das betalactamases limitando o uso desta classe de fármacos, por ação inibitória no anel betalactâmico dos compostos que o possuem (23) indica a necessidade constante de busca por novas drogas que possam mostrar ação para os microrganismos resistentes frequentemente isolados na clínica médica.

Referências

- 1 - Gutschmann, U. Seydel, Impact of the glycostructure of amphiphilic membranecomponents on the function of the outer membrane of Gram-negative bacteria as a matrix for incorporated channels and a target for antimicrobial peptides or proteins, *European Journal of Cell Biology*, 89 (2010) 11–23;
- 2 – T. Ya-Li, S. Yong-Hui, Z. Wei, H. Gang, L. Guo-Wei, Discovery of a novel antimicrobial peptide using membrane binding-based approach, *Food Control* 20 (2009) 149–156;
- 3 – I. Rasooli, M. B. Rezaei, A. Allameh, Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Infectious Diseases* (2006) 10, 236—241;
- 4 – A. P. F. Nunes, L. M. Teixeira, N. L. P. Iorio, C. C. R. Bastos, L. S. Fonseca, T. S. Padron, K. R. N. Santos, Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening, *International Journal of Antimicrobial Agents* 27 (2006) 307–315;
- 5 – H. D. Chen, G. Frankel, Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis, *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 83–98;

6 – J. M. Fleckenstein, P. R. Hardwidge, G. P. Munson, D. A. Rasko, H. Sommerfelt, H. Steinsland, Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection, *Microbes and Infection* 12 (2010) 89-98;

7 – K. V. Santos, C. G. Diniz, L. C. Veloso, H. M. Andrade, M. S. Giusta, S. F. Pires, A. V. Santos, A. C. M. Apolônio, M. A. R. Carvalho, L. M. Farias, Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam, *Research in Microbiology* (2010) 1-8;

8 - Joel D. Schilling, Scott J. Hultgren, Recent advances into the pathogenesis of recurrent urinary tract infections: the bladder as a reservoir for uropathogenic *Escherichia coli*, *International Journal of Antimicrobial Agents* 19 (2002) 457-460;

9 – Y.Park, S.N.Park, S.C.Park, J.Y.Park, Y.H.Park, J.S.Hahm, K.S.Hahm, Antibiotic activity and synergistic effect of antimicrobial peptide against pathogens from a patient with gallstones, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321 (2004) 631-637;

10 – Y. Park, H. J. Kim, K. S. Hahm, Antibacterial synergism of novel antibiotic peptides with chloramphenicol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 321 (2004) 109-115;

11 – S.Hemaiswarya, M.Doble, Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, *Phytomedicine*. 16 (2009) 997-1005;

12 – M. Tré-Hardy, C. Macé, N.El Manssouri, F.Vanderbist, H.Traore, M.Jean Devleeschouwer, Effect of antibiotic co-administration on young and mature biofilms of cystic fibrosis clinical isolates: the importance of the biofilm model, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33 (2009) 40-45;

13 - Y. Zai-Chang, W.Bo-Chu, Y.Xiao-Sheng, W.Qiang, R.Liang, The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two

different strains of *Staphylococcus aureus*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 41 (2005) 79-81;

14 – M.Sato, H.Tanaka, R.Yamaguchi, K.Kato, H.Etoh, Synergistic effects of mupirocin and an isoflavanone isolated from *Erythrina variegata* on growth and recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, International Journal of Antimicrobial Agents. 24 (2004) 43-48;

15 – H.Muroi, K.I.Nihei, K.Tsujimoto, I.Kubo, Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 12 (2004) 583-587;

16 – G.Gunics, N.Motohashi, L.Amaral, S.Farkas, J.Molnár, Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria, International Journal of Antimicrobial Agents. 14 (2000) 239-242;

17 – Marton, J., Enisz, J., Hosztafi, S., Timar, T., J. Agric. Food Chem. 41 (1993), 148;

18 – Góes, A.J.S., Lima,M.C.A., Galdino,S.L., Pitta,I.R., Luu-Duc,C., J. Pharm. Belg. 46 (1991) 236;

19 – Lima,M.C.A., Costa,L.B., Góes,A.J.S.,Galdino,S.L., Pitta,I.R.,Luu-Duc,C., Pharmazie 47 (1992), 182;

20 – National Committee for Clinical Laboratory Standards; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 3rd., Approved Standard, NCCLS publication M7-A3, Villanova, PA, 1993; National Committee for Clinical Laboratory Standards; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Proposed Standard, NCCLS Document M27-P, Villanova, PA, 1992;

21 – A.I.Barnes, I.L.Herrero, I. Albasa, New aspect of the synergistic antibacterial action of ampicillin and gentamicin, International Journal of Antimicrobial Agents. 26 (2005) 146-151;

22 – D.C.Dressel, M.A.Tornatore-Reuscher, C.R.Boschman, V.Stosor, T.Zembower, M.J.Postelnick, G.A.Noskin, L.R.Peterson, Synergistic effect of gentamicin plus

ampicillin on *Enterococci* with differing sensitivity to gentamicin: a phenotypic assessment of NCCLS guidelines, *Diagn Microbiol Infect Dis.* 35 (1999) 219-225;

23 – P.A.Miglioli, F.Allerberger, I.Walderberg, J.Hasse, Antibacterial activity of human pleural fluid: alone and in combination with antibiotics, *International Journal of Antimicrobial Agents.* 10 (1998) 317-319;

24 – N.Khardori, Antibiotics – Past, Present, and Future, *Med Clin N Am.* 90 (2006) 1049-1076;

25 – P. SILVA. Farmacologia, Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2010.