



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA GENERALISTA

CAYQUE DE SOUZA FARIAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS
E FENILACRILATOS**

CAMPINA GRANDE-PB
2018

CAYQUE DE SOUZA FARIAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS
E FENILACRILATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a. MSc. Zilka Nanes Lima

CAMPINA GRANDE – PB
2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F224a Farias, Cayque de Souza.
Atividade antimicrobiana de derivados N-acilidrazônicos e Fenilacrilatos [manuscrito] / Cayque de Souza Farias. - 2018.
76 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.
"Orientação : Profa. Ma. Zilka Nanes Lima, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."
1. Atividade antimicrobiana. 2. Antibióticos. 3. Moléculas sintéticas. 4. Concentração Inibitória Mínima. I. Título
21. ed. CDD 615.19

CAYQUE DE SOUZA FARIAS

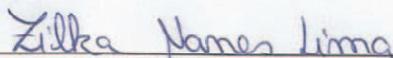
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS
E FENILACRILATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Bacharelado de Farmácia da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Microbiologia

Aprovado em: 14/11/18

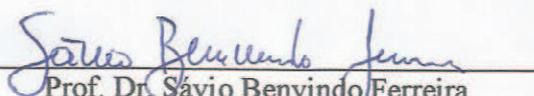
BANCA EXAMINADORA



Prof. Me. Zilka Nanes Lima (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Sávio Benvindo Ferreira
Faculdade Nova Esperança (FACENE/FAMEME)

Dedico este trabalho a Deus, sem o qual nada disso teria sido possível em minha existência. Que tem todo o meu caminho traçado em sua infinita sabedoria!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tem me proporcionado dia após dia a realização de novos sonhos.

A minha orientadora e acima de tudo amiga, Zilka Nanes Lima, uma pessoa enviada por Deus para me ajudar a construir a minha vida acadêmica, minha orientadora de toda a minha graduação, desde projetos de pesquisa até o Trabalho de Conclusão do Curso (TCC).

Aos meus pais, José de Farias Filhos e Terezinha de Souza Farias, que sempre me apoiaram em todas as minhas conquistas pessoais e acadêmicas e me deram forças para superar os obstáculos encontrados pelo caminho. Eles sempre me sustentaram com tão grande empenho, apesar das dificuldades que apareceram.

Ao meu irmão mais velho, Camilo de Souza Farias, que foi o primeiro dos filhos a escrever uma história brilhante profissionalmente e pessoalmente, o que veio a facilitar a escrita da minha vida.

À minha namorada, Rhayssa Renally, que vem, ano após anos, me apoiando, me incentivando e tendo acima de tudo, bastante paciência comigo quando os problemas pessoais e acadêmicos surgem.

A todos os meus amigos, dentro e fora da universidade, os quais também são responsáveis pelas minhas conquistas e por quem hoje eu sou. Espero levar todos comigo pelo resto da minha vida.

Também agradeço bastante a Ronnie Tenório da Fonseca, esposo da Professora Zilka, por ter tido confiança em mim e me apoiado durante todo este tempo; e ao técnico do laboratório de microbiologia básica, Luiz Augusto Pereira Silva, que me auxiliou demais durante minha vida acadêmica.

A minha banca examinadora, por ter aceitado prontamente fazer parte desta conquista tão almejada em minha vida, que Deus possa abençoar infinitamente cada um deles.

Agradeço de coração à UEPB, instituição que ofereceu recursos para que o meu Trabalho de Conclusão de Curso pudesse ser realizado, através de 2 anos de realização de Trabalhos de Iniciação Científica, e onde tanto busquei a aprendizagem e a todos os meus professores da universidade, que compartilharam seus conhecimentos em sala de aula.

Por fim agradeço a todos aqueles que esqueci de mencionar aqui.

“Eu tenho uma porção de coisas grandes para conquistar e eu não posso ficar aí parado.”

Raul Seixas

RESUMO:

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS E FENILACRILATOS

Os antibióticos são substâncias naturais ou sintéticas que têm a capacidade de inibir o crescimento e/ou destruir micro-organismos, e, assim, tratar uma infecção ou preveni-la. O uso racional de antimicrobianos é de extrema importância para a saúde da população em geral. A prescrição de antibióticos nos consultórios e pronto-atendimentos, muitas vezes de forma falha e incorreta, bem como o uso indiscriminado em humanos e animais, vem acelerando o processo de resistência microbiana e contribuindo para que o mundo entre em uma “era pós-antibiótica”, que será muito semelhante à “era pré-antibiótica”, antes da descoberta da penicilina, quando infecções que hoje são consideradas simples eram intratáveis e levavam a óbito. A busca de novos fármacos que possam substituir os já existentes vem sendo motivada, uma estratégia eficaz e muito utilizada é a modificação molecular de agentes antimicrobianos pré-existentes, mantendo seu grupo farmacofórico e se obtendo compostos análogos ou homólogos, sem perdas das suas propriedades, restaurando e potencializando o seu efeito. Este trabalho de conclusão de curso (TCC) teve como objetivo, através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de Eliza estéreis, se determinar a Concentração Inibitória Mínima de derivados N-acilidrazônicos: JR-05 (2-ciano-N'-(2-nitrobenzilideno) - acetato hidrazida); JR-06 (2-ciano-N'-(4-clorobenzilideno) - acetato hidrazida) ; JR-07 (2-ciano-N'-(4-bromobenzilideno) – acetato hidrazida) e JR-08 (2-ciano-N'-(4-nitrobenzilideno) – acetato hidrazida); e acrilatos: AL-01 (Etil 2-ciano-3-fenil acrilato); AL-02 (Etil 2-ciano-3-(4-clorofenil)-acrilato); AL-09 (Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato) e AL-10 (Etil 2-ciano-(2,4-diclorofenil)3- acrilato) frente a diferentes cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e espécies de *Candida* spp. Foram encontrados importantes resultados para ambas as classes de compostos testadas, tanto para bactérias quanto para leveduras, entre estes estão os representados pelas moléculas JR-05 e JR-08 frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, de 128 µg/mL para ambas as moléculas, e os resultados determinados para JR-08, AL-01 e AL-02 frente à espécie *Candida glabrata*, obtendo todas elas CIM de 32 µg/mL. Sugere-se a realização de outros testes a fim de se confirmar os resultados encontrados, como a Determinação da Concentração Bactericida Mínima e Fungicida Mínima e a associação das moléculas mais promissoras com antimicrobianos conhecidos clinicamente, a fim de se verificar as atividades alcançadas por estes.

Palavras-chaves: Concentração Inibitória Mínima. Moléculas Sintéticas. Atividade Antimicrobiana.

Fomento: CNPq (PIBIC/UEPB)

Autor: Cayque de Souza Farias Email: cayque.farias@gmail.com

Orientadora: Professora MSc. Zilka Nanes Lima Email: zilkananeslima@gmail.com

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF N-ACYLIDRAZONIC DERIVATIVES AND PHENYLACRYLATES

Antibiotics are natural or synthetic factors that have the ability to inhibit growth and / or destroy microorganisms, and thus treat an infection or prevent it. Rational use of antimicrobials is of utmost importance to the health of the general population. The prescription of antibiotics in the offices and emergency rooms, often in a flawed and incorrect way, as well as the indiscriminate use in humans and animals, has been accelerating the microbial process and contributing to the world entering a post-antibiotic era ", which is very similar to the "pre-antibiotic era," prior to the discovery of penicillin, when they were as simple as intractable and leading to death, the search for new drugs that can replace the initial viral antimicrobial drugs is an effective strategy and it is very applied to molecular antimicrobials of antiparasitics, being its pharmacological group and its results more complete or homologous, restoring and potentializing its effect. This work of course completion (CCT) had as its theme, through the technique of microdilution in broth, the sterile Eliza plates, determining a Minimum Inhibitory Concentration of N-acylhydrazonic derivatives: JR-05 (2-cyano-N' - (2 -nitrobenzylidene) -acetate hydrazide); JR-06 (2-cyano-N' - (4-chlorobenzylidene) acetate hydrazide); JR-07 (2-cyano-N' - (4-bromobenzylidene) acetate hydrazide) and JR-08 (2-cyano-N' - (4-nitrobenzylidene) acetate hydrazide); and acrylates: AL-01 (Ethyl 2-cyano-3-phenyl acrylate); AL-02 (Ethyl 2-cyano-3-(4-chlorophenyl) acrylate); AL-09 (Ethyl 2-cyano-3- (2,6-dichlorophenyl) acrylate) and AL-10 (Ethyl 2-cyano- (2,4-dichlorophenyl) 3-acrylate) against several Gram-positive bacteria, Gram -negative and species of *Candida* spp. The results were presented as compound classes tested for both yeast, between JR-05 and JR-08 cells against a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, of 128 µg / ml for both as molecules. for JR-08, AL-01 and AL-02 compared to the *Candida glabrata* group, obtaining all MICs of 32 µg / mL. Further testing is suggested and is an effective process for the determination of Minimal Bactericide and Minimal Fungicide concentration and an association of more promising molecules with clinically known antimicrobials as a check of activities by them.

Keywords: Minimum inhibitory concentration. Synthetic molecules. Antimicrobial activity.

Promotion: CNPq (PIBIC/UEPB)

Author: Cayque de Souza Farias Email: cayque.farias@gmail.com

Advisor: Teacher MSc. Zilka nanes Lima Email: zilkananeslima@gmail.com

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Diferença Entre as Paredes das Bactérias Gram Positivas e Gram Negativas	19
Figura 02 - Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana.....	24
Figura 03 - Principais Antibióticos de Origem Sintética.....	28
Figura 04 - Principais Classes de Antibióticos em Uso Clínico.....	30
Figura 05 - Principais Mecanismo de Ação dos Antibióticos	31
Figura 06 - Esqueleto Hidrazônico	35
Figura 07 - Reação Geral da Formação de uma N-acilidrazona.....	36
Figura 08 - Rota Sintética da Série JR.....	36
Figura 09 - Reação de Esterificação de Fischer.....	39
Figura 10 - Obtenção da Série AL: Reação de Condensação de 2-Cianoacetato de Etila com Diferentes Aldeídos.....	40
Figura 11 - Macrodiluição e Microdiluição.....	47
Figura 12 - Reação de redução da Resazurina.....	52
Figura 13 - Disposição dos Testes na Microplaca para Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	54
Figura 14 - Atividade das Moléculas JR-05 e JR-08 Frente a <i>S. epidermidis</i>	62
Figura 15 - Atividade da Molécula AL-09 Frente à Levedura <i>Candida tropicalis</i>	67

LISTA DE TABELA

Tabela 01 - Estrutura Molecular dos Compostos N-acilidrazônicos Testados.....	37
Tabela 02 - Estrutura Molecular dos Compostos Fenilacrilatos Testados.....	41
Tabela 03 - Características Observadas nas Moléculas Testadas.....	54
Tabela 04 - Controle de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Antibiótico para as Bactérias Testadas.....	55
Tabela 05 - Controle de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Antifúngico para as Leveduras Utilizadas.....	56
Tabela 06 - Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N- acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	58
Tabela 07 - Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N-acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Leveduras.....	61
Tabela 08 - Concentração Inibitória Mínima dos Derivados Fenilacrilatos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias.....	62
Tabela 09 - Concentração Inibitória Mínima dos Derivados Fenilacrilatos Frente às Diferentes Espécies de Leveduras.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMEs	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IAL	Instituto Adolpho Lutz
ITU	Infecção do Trato Urinário
LaRMiCC	Laboratório de Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular
LogP	Coeficiente de Partição
LPS	Lipopolissacarídeos
MH	<i>Mueller Hinton</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	N-acetilmurâmico
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PBP	Proteínas Ligadoras da Penicilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
R a NOV	Resistente à Novobiocina
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos Gerais	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Bactérias Patogênicas e Leveduras.....	18
3.1.1 Espécies Bacterianas e Leveduriformes com Potencial Patogênico.....	20
3.2 Resistência Bacteriana: Um Grave Problema de Saúde Pública.....	22
3.3 Antibióticos.....	27
3.3.1 Históricos dos Antibióticos.....	27
3.3.2 Classificações e Mecanismos de Ação dos Antibióticos.....	30
3.4 Principais Antifúngicos Utilizados Clinicamente e Resistência Leveduriforme Encontrada.....	33
3.5 Desenvolvimento de Fármacos.....	35
3.6 Derivados N-Acildrazônicos	37
3.7 Ésteres.....	40
3.7.1 Derivados Fenilacrilatos.....	41
3.8 Testes de Atividade Antimicrobiana	44
3.8.1 Métodos de Difusão.....	44
3.8.2 Método de Diluição em Caldo.....	45
3.8.2.1 Macrodiluição.....	46
3.8.2.2 Microdiluição.....	46
4 METODOLOGIA	46
4.1 Período das Pesquisas, Local de Realização e Origem dos Compostos.....	46
4.2 Preparo das Soluções a Serem Testadas	46
4.3 Bactérias e Leveduras Utilizadas.....	47
4.4 Cultura e Preparo das Suspensões Bacterianas e Leveduriformes.....	48
4.5 Testes de Sensibilidade <i>In Vitro</i> Para Bactérias e Leveduras.....	49
4.6 Leitura dos Experimentos	50
4.7 Derivados Sintéticos	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

5.1 Características Observadas nos Compostos Testados	53
5.2 Controle de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Antimicrobianos	54
5.3 Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N- acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	58
5.4 Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N-acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Leveduras.....	60
5.5 Concentração Inibitória Mínima dos Derivados Fenilacrilatos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas Testadas.....	61
5.6 Concentração inibitória mínima dos derivados Fenilacrilatos frente às diferentes espécies de leveduras.....	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

Desde longo tempo o homem busca soluções para a cura de infecções, através da experiência com plantas medicinais, ou com produtos animais ou derivados destes, e certamente nesta época não se conhecia seu valor terapêutico, mas com conhecimentos primários da época acreditava-se no seu poder de cura. O desenvolvimento dos antibióticos revolucionou o tratamento médico, levando à redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. (BAIL et al. 2006).

A cada dia aumenta a necessidade da produção em larga escala de antimicrobianos que antes eram obtidos apenas por processos naturais, o que pode vir a contribuir, por exemplo, no aperfeiçoamento das características físico-químicas destas moléculas, expansão de seus espectros de ação, diminuição de suas propriedades de toxicidade, bem como com o aumento da rapidez e facilidade com estas moléculas são obtidas. (WOLF et al., 2007).

Porém, embora os antimicrobianos constituam uma das classes de medicamentos mais prescrita mundialmente, muitas vezes são indicados sem necessidade ou com imprecisão, ou o paciente utiliza de forma incorreta ou incompleta, facilitando o desenvolvimento de resistência bacteriana e fúngica, conseqüentemente impedindo a ação de outros medicamentos (KADOSAKI; SOUSA; BORGES, 2012), levando à manutenção ou agravamento das doenças infecciosas por selecionar estirpes multirresistentes, aumentando a probabilidade do surgimento de reações adversas e estimulando o uso de alternativas antibióticas cada vez mais onerosas, o que pode acarretar sérias conseqüências econômicas e clínicas.

Devido a este rápido processo de desenvolvimento da resistência microbiana, que pode vir a tornar os antimicrobianos obsoletos rapidamente, o número de empresas farmacêuticas que investem em pesquisa para novos antibióticos vem caindo ao longo dos anos e isso é motivo de preocupação. Ao mesmo tempo em que antibióticos antigos deixam de ser produzidos por falta de interesse da indústria, não há pesquisa e desenvolvimento para novos antibióticos. (BERMUDEZ, 2017).

É importante a busca de novos fármacos que possam substituir os já existentes, a fim de se buscar enfrentar esta resistência imposta por os micro-organismos.(CACHIBA et al., 2012). Uma estratégia eficaz e muito utilizada é a modificação molecular de agentes antimicrobianos pré-existentes, mantendo seu grupo farmacofórico e se obtendo compostos análogos ou homólogos, sem perdas das suas propriedades, como é o caso da adição ou

substituição de algum grupamento químico, restaurando e potencializando o seu efeito.(MANDINGAN et al., 2010).

Existem várias metodologias que podem ser utilizadas para se fazer *screening* destes novos candidatos a drogas com atividade antimicrobiana sintetizados, entre estas estão as consideradas padrão-ouro como a de microdiluição em caldo, que fornece resultados quantitativos (concentração inibitória mínima [CIM] e que está descrito pelo documento M7-A6 do NCCLS (2012).

É essencial citar que a atividade antibacteriana de derivados acilidrazônicos e derivados acrilatos já foi relatada frente a diferentes espécies de bactérias. Pereira em 2016, fazendo uso da técnica de microdiluição em caldo, encontrou uma atividade bastante apreciável para a molécula AL-09 (Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato), frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 determinou CIM de 16 µg/mL. Moura em 2016, fazendo uso da mesma metodologia encontrou atividade perante *Escherichia coli* ATCC 25922 para a molécula JR-08 (2-ciano-N'-(4-nitrobenzilideno) – acetato hidrazida) obtendo CIM de 256 µg/mL. A atividade antifúngica também já foi constatada para derivados acilidrazônicos. Malik em 2012 e Cachiba, no mesmo ano, detectaram atividade de outros derivados destas mesmas classes frente a diferentes espécies do gênero *Candida* sp.

Porém, é de suma importância que o teste de atividade antimicrobiana seja realizado com outras estirpes bacterianas de referência e isolados clínicos, que não sejam *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922; e com outra estirpe de levedura que não seja *Candida albicans*; já que estes micro-organismos são considerados protótipos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, respectivamente. Por este motivo, este trabalho se propôs a testar derivados N-acilidrazônicos e acrilatos frente a outras cepas de bactérias e fungos através do método de microdiluição em caldo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

-Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilidrazônicos e fenilacrilatos, visando obter novos agentes terapêuticos eficazes contra micro-organismos.

2.2 Objetivos Específicos

-Analisar a atividade antibacteriana sobre linhagens de referência e obtidas clinicamente, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM);

- Examinar a atividade antifúngica sobre linhagens de referência através da caracterização da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Bactérias Patogênicas e Leveduras

A infecção hospitalar (IH) é o evento adverso que mais mata nos serviços de Saúde em todo o mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo um risco enorme para a segurança do paciente. Para o paciente, a IH prolonga o tempo de hospitalização e o uso de outros antibióticos com mais efeitos colaterais. Para o hospital, há o custo do leito que fica ocupado, da compra de materiais e, às vezes, até da dedicação de um enfermeiro em um quarto de isolamento, afirmou Ana Cristina Gales, em 2017, professora de infectologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e consultora da Sociedade Brasileira de Infectologia.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2010, no Brasil, a taxa de infecções hospitalares atinge 14% das internações. Cerca de 234 milhões de pacientes são operados por ano em todo o mundo. Destes, um milhão morre em decorrência de infecções hospitalares e sete milhões apresentam complicações no pós-operatório. O que torna a utilização racional de antimicrobianos crucial para o tratamento destas. (FADLI et al., 2012).

Dentre os micro-organismos que provocam as infecções oportunistas estão as bactérias e os fungos, sendo que a maior preocupação da OMS em relação a estas infecções é o fato de que são provocadas por cepas resistentes. Estas são mais virulentas e não se enquadram no espectro de medicamentos atuais.

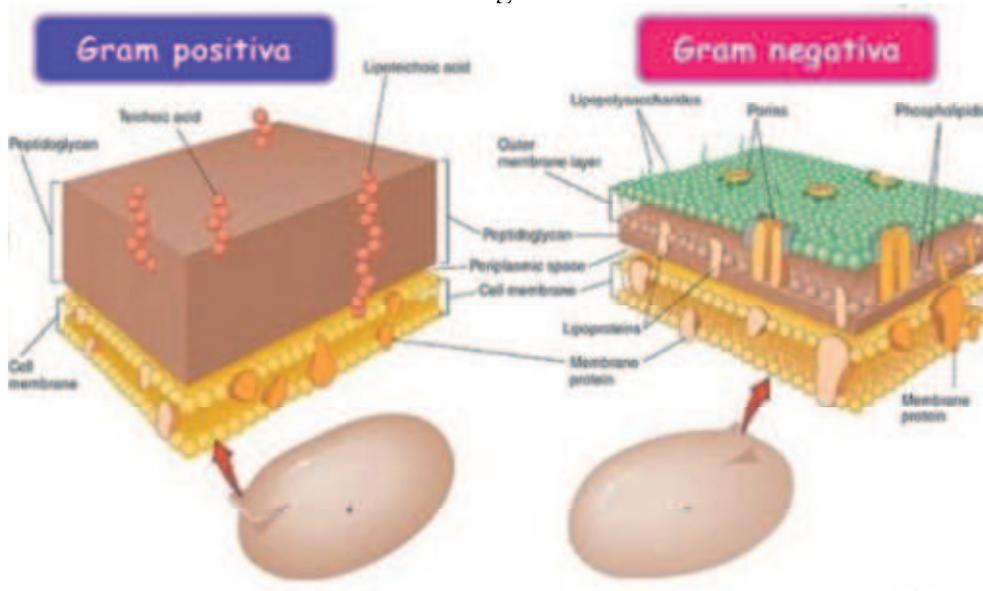
As bactérias são organismos unicelulares. Como não possuem núcleo envolto por uma membrana, as células são descritas como procarióticas. As três formas básicas de bactérias são os bacilos, os cocos e os espirilos. Dividem-se por fissão binária e muitas delas possuem flagelos. As bactérias podem utilizar uma grande variedade de substâncias químicas para a sua nutrição. (TORTORA et al., 2010).

A parede celular circunda a membrana plasmática e protege a célula das alterações na pressão de água. Consiste de peptídeoglicano, um polímero composto de N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM) e cadeias curtas de aminoácidos. A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por muitas camadas de peptídeoglicanos e também contém ácidos teicoicos e lipoteicoicos, enquanto que a das bactérias Gram negativas possuem uma membrana externa de lipoproteína -

lipopolissacarídeo-fosfolípido circundando uma fina camada de peptídeoglicano. A membrana externa protege a célula da fagocitose, penicilina, lisozima e de outras substâncias químicas. O componente lipopolissacarídico da membrana externa consiste de açúcares (polissacarídeos O) que atuam como antígenos e de lipídeo A, que é a endotoxina.(TORTORA et al. 2010).

As infecções por micro-organismos Gram negativos são menos frequentes, mas apresentam maior mortalidade quando comparadas aos Gram positivos. Dentre estes as espécies mais relevantes destacam-se: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Alguns fungos, em especial os leveduriformes, também podem estar associados a esse processo. (OPLUSTIL et al. 2010). Abaixo, na **Figura 01** está representada a diferença básica entre as paredes celulares das bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Figura 01 - Diferença entre as Paredes Celulares das Bactérias Gram Positivas e Gram Negativas



Fonte: Disponível em: <https://abcdamedicina.com.br>. Acesso em: novembro de 2018.

As leveduras são organismos unicelulares de brotamento. Elas não produzem micélios. As colônias são geralmente visíveis nas placas entre 24 e 48 horas. Suas colônias macias, úmidas, se assemelham a culturas bacterianas ao invés de mofo. Há vários gêneros de leveduras que podem ser patogênicas para os humanos (DISAVIO, 2017), entre eles o de maior destaque é o gênero *Candida* que constitui o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas no ser humano. Este gênero compõe-se de cerca de 150-200 espécies, muitas das quais podem habitar o trato gastrointestinal, sistema urogenital, pele, e mucosa do

trato respiratório de seres humanos. Elas se tornam patogênicas em pacientes com o sistema imunológico comprometido e, nestas circunstâncias, podem causar doença em praticamente todos os órgãos e tecidos, resultando em infecção superficial, invasiva e sistêmica.(DIGNAMI, MC, et al. 2009). Portanto, estão emergindo como agentes de infecções principalmente em neonatos, imunocomprometidos, idosos, diabéticos, pós-operados, uso prolongado de antibióticos, pacientes internados, uso de corticoides, transplantados, uso de catéteres, nutrição parenteral, gravidez e uso de anticoncepcionais.(PFALLER; MA; DIEKEMA, DJ, 2007, DIGNAMI; MC, et al., 2009).

3.1.1 Espécies Bacterianas e Leveduriformes com Potencial Patogênico

Staphylococcus epidermidis: espécie de bactéria firmicute, caracterizada por ser coagulase negativa. Pertence ao gênero *Staphylococcus*. É uma bactéria Gram-positiva arranjada em cachos e tétrades. Por muito tempo foi considerada uma espécie comensal, porém sabe-se, hoje, que ela é um patógeno oportunista responsável principalmente por infecções hospitalares, através de cateteres, sondas (material de plástico) bem como próteses devida sua capacidade de formar biofilmes.(TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os biofilmes dificultam a chegada de drogas antimicrobianas e até mesmo de células fagocíticas ao foco de infecção. A espécie *S. epidermidis* não produz toxinas e uma vez que faz parte da microbiota endógena humana, as infecções causadas por esta espécie são geralmente oportunistas e de origem hospitalar (nosocomiais). Identificação da espécie pode ser feito após prova de catalase e coagulase com um antibiograma evidenciando a sua sensibilidade a novobiocina. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Staphylococcus saprophyticus: espécie bacteriana cocoide (esférica), Gram-positiva, anaerobia facultativa, imóvel, não esporuladora, não encapsulada medindo entre 0,5 a 1 mm de diâmetro. Possui atividade ureásica e carece de coagulase. É o segundo agente mais comum de infecção urinária em mulheres na faixa de 20 a 40 anos. A patogenicidade está relacionada com a sua capacidade de poder aderir às células do aparelho urinário devido a presença de proteína com propriedade de adesina/hemaglutinina. (HIRZEL, 2004).

S. saprophyticus é tido agente patogênico oportunista, principalmente em mulheres jovens, sexualmente ativas. Sendo as infecções mais frequentes as cistites e pielonefrites. (HIRZEL, 2004).

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae*: espécie bacteriana em forma de bacilo Gram-negativo, membro da família Enterobacteriaceae, encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto.(PODSCHUM; ULLMANN, 1998). Sua colonização em seres humanos provavelmente ocorre por contato com as diversas fontes ambientais e pode ser encontrada colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis, já no organismo de pessoas imunocomprometidas esta bactéria encontra um ambiente propício para seu crescimento, levando aos quadros de infecção. (DESIMONI et al., 2004; MARTINEZ et al., 2004).

Candida albicans: É um fungo dimórfico que é conhecido pela sua forma leveduriforme (blastocónídeos) no estado saprofítico, que está associado com a colonização assintomática; ou em formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) observadas em situações de processos patológicos sob algumas condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode acontecer formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular). Dessa forma, o fungo ganha uma capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos podendo ser então considerado, rigorosamente, um organismo “pleomórfico”. (ALVARES et al., 2007).

De acordo com Rossi e outros (2011) “*C. albicans* pode causar graves infecções em pacientes que estão imunocomprometidos por doenças, por cirurgias ou por terapia imunossupressiva”. Os altos níveis de morbidade e mortalidade resultante de infecções em pacientes hospitalizados comprovam que *C. albicans* tornou-se um patógeno humano de grande relevância clínica.

Candida glabrata: É uma espécie de fungo haplóide. Trata-se de uma espécie de levedura que não forma filamentos e dá resultados negativos tanto para os clamidósporos (esporos de resistência) como para os filamentos. (RODRIGUES, et al., 2014).

Inicialmente, era considerada não-patogênica ao ser humano, no entanto, com o aumento do número de pessoas imunodeficientes, verificou-se que a *C. glabrata* é um fungo agressivo, extremamente oportunista e resistente que ataca principalmente os indivíduos debilitados (p.e. portadores de HIV, doentes oncológicos). A *C. glabrata* tem demonstrado uma grande e rápida capacidade de desenvolver tolerâncias e resistências a fármacos antifúngicos, principalmente azóis e equinocandinas (p.e. fluconazol, clotrimazol, caspofungina, micafungina). Um dos mecanismos mais comuns deste fenômeno é a super expressão de vários genes de resistência. (RODRIGUES et al., 2014).

Candida tropicalis: espécie de fungo pertencente ao gênero *Candida* e a ordem Saccharomycetales. Ao lado de outros membros do gênero, é oportunista, é uma agente freqüente de candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais comumente isolada. A infecção por esse agente pode ocorrer em pacientes de todas as idades, mas acomete pacientes adultos e idosos com maior frequência. (NUCCI; COLOMBO, 2007).

3.2 Resistência Bacteriana: Um Grave Problema de Saúde Pública

Os antibióticos são fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias e reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções microbianas. Entretanto, o mau uso desses fármacos acelera o processo natural de resistência destes micro-organismos contra os antibióticos, devido ao fato de que no ambiente natural esses antimicrobianos são produzidos por populações microbianas como ferramenta de competição por recursos nutricionais e espaço dentro do micro-habitat que ocupam. Sendo preocupante a forma como esses medicamentos são utilizados em ambientes ambulatoriais, hospitalares e domésticos no tratamento ou profilaxia de doenças humanas. (COSTA; SILVA, 2017). São vários os fatores que contribuem para a resistência bacteriana, abaixo serão listados alguns deles:

1) uma característica intrínseca de certas espécies de bactérias que podem resistir à ação de um dado antibiótico como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie (BLAIR et al. 2015);

2) ser adquirida como resultado de mutações que podem ocorrer durante a replicação celular ou serem induzidas por intermédio de agentes mutagênicos como radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (BAPTISTA, 2013);

3) adquirida pela aquisição de material genético exógeno anteriormente presente em outros micro-organismos que contenham genes de resistência que são propagados por meio de mecanismos de transferência gênica horizontal (TAVARES, 2000; COSTA, 2016) como a conjugação bacteriana, a transformação e a transdução. (DZIDIC et al. 2008).

Apresentando os micro-organismos portadores de resistência intrínseca ou de genes de resistência, maior adaptação e tolerância a pressão seletiva que os antibióticos impõem ao meio, devido às capacidades bioquímicas que tais seres podem expressar (KUMAR; VARELA, 2013), que favorecem seu desenvolvimento por reduzir a competição por espaço e nutrientes no meio com as células que não possuem mecanismos de resistência, selecionando

as estirpes resistentes aos agentes antimicrobianos dentro de uma comunidade microbiana. (GUSTAVO, 2008).

Sendo os mecanismos bioquímicos de resistência aos antibióticos reportados em literatura os seguintes:

- **Inativação enzimática do antibiótico:** O mecanismo enzimático de resistência ocorre devido a inativação do fármaco a partir da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Envolvendo três tipos de reações enzimáticas, tais como, hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxirredução. (COSTA, 2016).

O exemplo clássico deste mecanismo de resistência é a produção de β -lactamase que hidrolisa o anel β -lactâmico das penicilinas (KUMAR; VARELA, 2013) e cefalosporinas. Havendo muitas bactérias Gram negativas e Gram positivas que produzem tal enzima, existindo identificadas mais de 200 tipos de β -lactamases pertencentes a diferentes grupos funcionais, que podem ser de origem cromossomal ou de plasmídeos de bactérias diferentes. (KUMAR; VARELA, 2013). Várias bactérias Gram positivas e Gram negativas produzem β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que é um dos tipos de β -lactamases codificadas por genes plasmidiais como o CTX-M, que apresenta muitas variantes e produtos de tradução diversificados que conferem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas de terceira geração, mas não as cefamicinas e carbapenêmicos. (BLAIR et al., 2015).

Na literatura há ocorrência de mais de 180 ESBLs identificadas, que são comumente detectadas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e outras bactérias da família Enterobacteriaceae (BAPTISTA, 2013), e também em bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. (BLAIR et al. 2015).

- **Modificação do alvo do antibiótico:** A maioria dos antibióticos se liga especificamente aos seus alvos com alta afinidade e dessa forma previnem a atividade normal do alvo. Entretanto mudanças estruturais do alvo que previnem a ligação efetiva entre o alvo e o antibiótico, mas que ainda possui sua função normal conferem resistência. (BLAIR et al., 2015). As proteínas ligadoras da penicilina (PBP), que são responsáveis pela ligação cruzada entre os polímeros de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina precursores do peptidoglicano formador da parede celular, quando apresentam mutações nos genes que as codificam, produzem PBPs estruturalmente diferente (as PBP_{a2}) que apresentam afinidade ao fármaco extremamente reduzida, não havendo a lise celular, pois a droga não irá interferir na ligação cruzada dos dois polímeros que formam a parede celular bacteriana. (SIQUEIRA, 2004; GUSTAVO, 2008). Sendo este mecanismo de resistência reportado em *Staphylococcus*

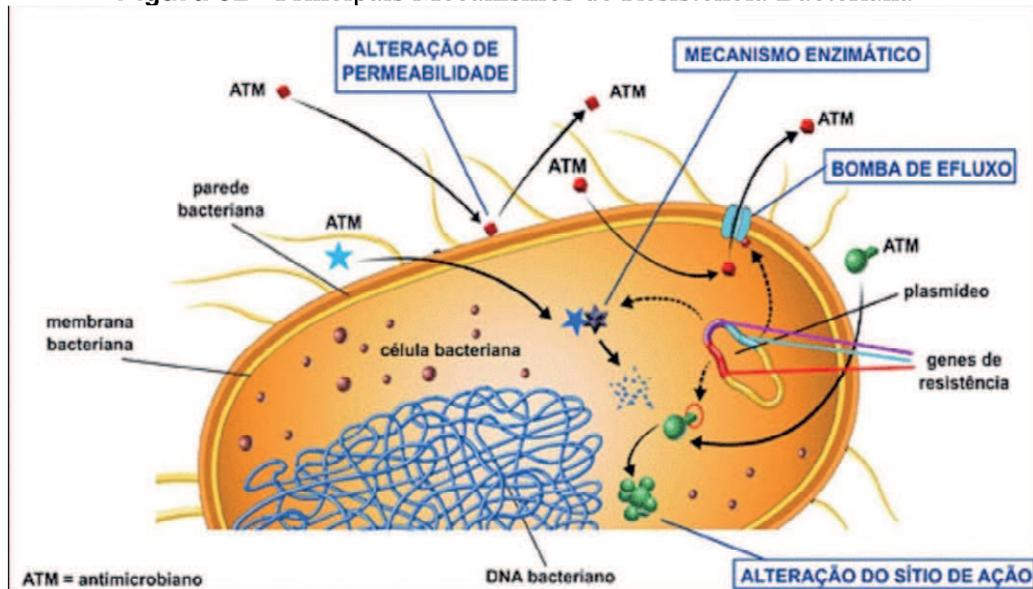
aureus portadores do elemento genético móvel chamado SCC*mec* que possui o gene *mecA*, que confere resistência a meticilina. (DZIDIC et al. 2008).

- **Bombas de efluxo:** Bombas de efluxo são proteínas membranares que exportam os antibióticos para o meio extracelular, mantendo as concentrações intracelulares em baixos níveis. Sendo este um mecanismo de resistência que afeta todas as classes de antibióticos, atingindo principalmente os macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (DZIDIC et al. 2008), podendo ser detectado tanto em bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, podendo também ser associado a este mecanismo de resistência um número significativo de genes que codificam para diferentes transportadores de antibióticos como os genes *mef*, *msr* e *vga* em cocos Gram-positivos resistentes a macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B, o gene TET relacionado à resistência a tetraciclina, o gene *acrR* codificador do sistema de efluxo AcrAB-TolC encontrado em *Escherichia coli* e outras bactérias Gram-negativas e também em Gram-positivas.(BAPTISTA, 2013).

- **Alteração da permeabilidade da membrana:** Os fármacos podem penetrar a membrana celular por meio de três formas 1) **por difusão simples** através da bicamada fosfolipídica; 2) **por difusão facilitada** mediada por proteínas membranares chamadas porinas ou 3) **alta captação promovida** onde a penetração do fármaco nas bactérias depende de características físico-químicas dos antibióticos como a polaridade e o tamanho das moléculas. (BAPTISTA, 2013). Modificações no conteúdo de lipopolissacarídeos (LPS) e estrutura e quantidade de porinas alteram a permeabilidade de fármacos como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol e fluoroquinolonas em bactérias Gram-negativas. (DZIDIC et al., 2008).

- **Formação de biofilmes:** A produção de biofilmes é considerada de acordo com Kuma et al. (2013) um novo modo de resistência, capaz de ocorrer em muitos lugares, incluindo a placa dentária, ambientes aquáticos, catéteres médicos, feridas traumáticas e outros, onde os micro-organismos encontrados nos biofilmes são protegidos contra a entrada de múltiplos agentes antimicrobianos. Na **Figura 02** serão apresentados os principais mecanismos de resistência bacteriana:

Figura 02 - Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana



Fonte: Disponível em: <https://ecitydoc.com>. Acesso em: Setembro de 2018.

Em termos de saúde pública, a resistência bacteriana representa um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos com o avanço da microbiologia, das engenharias, da farmácia e da medicina, comprometendo o orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados, além de intensificar outro problema de saúde pública de grande relevância: as infecções hospitalares. (COSTA; SILVA, 2017).

Segundo Oliveira e Silva (2008), as infecções hospitalares estão associadas a falhas nos procedimentos de biossegurança como a utilização de equipamentos de proteção individual, lavagem das mãos, técnicas de assepsia, ineficiência dos controles microbiológicos e de vigilância de pacientes sob suspeita ou risco de infecção causada por patógenos resistente, assim como o isolamento não apropriado de paciente contaminados, deficiência ou carência do serviço de atenção farmacêutica às prescrições médicas e de atenção farmacêutica ao paciente usuário de antibióticos, que não recebe do profissional farmacêutico as devidas orientações sobre a sua patologia e a prescrição do fármaco, sua concentração, forma de uso, duração do tratamento e forma de armazenamento do medicamento. (GURGEL; CARVALHO, 2008; FERRACINI et al., 2014).

Os fatores acima citados resultam em maiores complicações clínicas na recuperação de pacientes hospitalizados, risco para os pacientes acometidos por doença crônica, imunossuprimidos, propiciando um número maior de óbitos nos hospitais (SANTOS, 2004), que podem se tornar reservatórios de patógenos, expostos a um grande número de indivíduos, passíveis de contrair doenças causadas por eles.

3.3 Antibióticos

Os antibióticos são uma classe de fármacos utilizados para o tratamento de doenças infecciosas, que diferem uns dos outros quanto as suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, no espectro e mecanismo de ação. (BAPTISTA, 2013). Havendo critérios muito importantes que devem ser considerados para que a terapia de doenças bacterianas com antibióticos venha a ser eficaz, como a necessidade de que um alvo exista dentro da célula bacteriana, a concentração do antibiótico alcance o alvo em quantidade suficiente, não podendo ocorrer inativação ou modificação estrutural do fármaco. (COSTA, 2016).

Sendo assim, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada em características do agente etiológico e no mecanismo de ação do medicamento, uma vez que são formulados para agir especificamente em determinado alvo e que existem diferenças estruturais e metabólicas entre os micro-organismos. Um bom exemplo desta diferença é a classificação dos micro-organismos em Gram positivo ou Gram negativo que é baseada na estrutura de sua parede celular e que é de fundamental importância na escolha do antibacteriano, onde drogas que tenham baixa lipossolubilidade não conseguem atravessar a parede celular de micro-organismos Gram-negativos. (COSTA, 2016).

3.3.1 Históricos dos Antibióticos

Após a segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram micro-organismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide. Nessa época, as pesquisas eram conduzidas na busca de agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica. O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia foi responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de micro-organismos, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro. (PATRICK, GL, 2005). Em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, salvarsan, usado contra sífilis. Poucos progressos foram conseguidos nos 20 anos seguintes para o desenvolvimento de antibióticos, até a introdução da proflavina, em 1934, agente amplamente utilizado na Segunda Guerra Mundial, principalmente contra infecções de feridas profundas. Entretanto, este composto era muito tóxico para ser usado em infecções bacterianas sistêmicas, o que evidenciava a necessidade de agentes mais eficazes. (PATRICK, GL, 2005).

Em 1935, um marco na quimioterapia antibacteriana ocorreu com a descoberta de Gerhard Domagk de que o corante vermelho prontossil apresentava atividade *in vivo* contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus*. O prontossil é um pró-farmaco que originou uma nova classe de antibióticos sintéticos, as sulfas ou sulfonamidas, que constituem a primeira classe de agentes efetivos contra infecções sistêmicas introduzida no início dos anos 1940. (PATRICK, GL, 2005). Entretanto, as sulfas apresentam espectro de ação limitado e são pouco usadas atualmente.

Apesar destes avanços, o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928. (Nicolaou, K. C; Montagnon, T, 2008). A atividade da penicilina era superior à das sulfas e a demonstração que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos: a prospecção em culturas de microorganismos, especialmente fungos e actinobactérias.

A penicilina G, ou benzilpenicilina, foi descrita em 1929 como agente antibiótico, porém somente foi introduzida como agente terapêutico nos anos 1940. Após o processo de industrialização da penicilina, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial (PROJAN, S. J; SHLAES, D. M, 2004), foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos.

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivo: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetropim e metronidazol (FERNANDES, P, 2006).

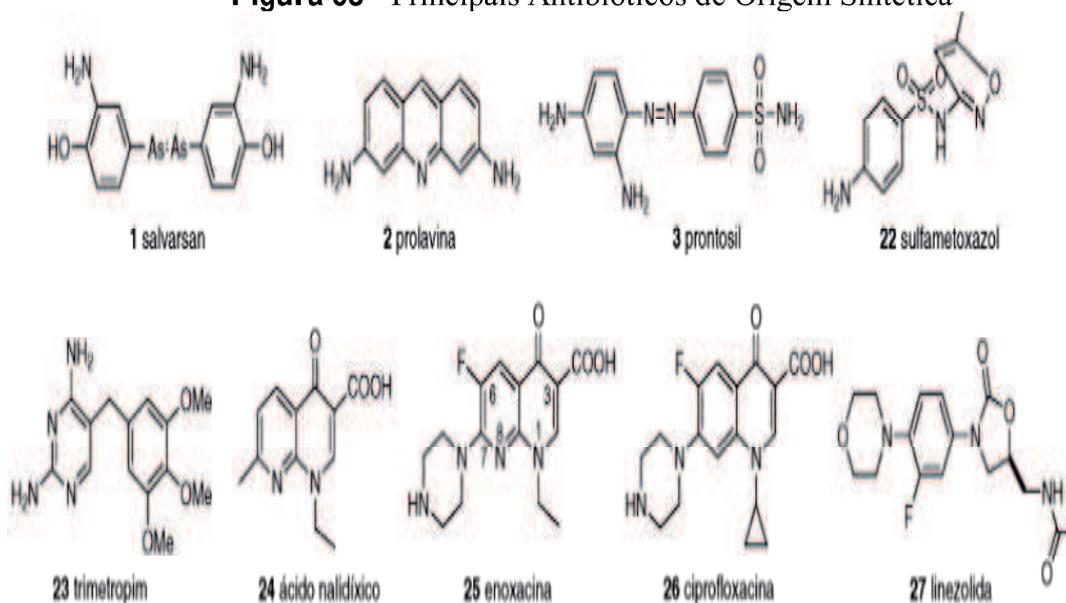
Entre os anos 1960-1980 foram introduzidos no mercado antibióticos semi-sintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram positivo e Gram negativo, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, amicacina). (FERNANDES, P, 2006).

Entre os anos 1980-2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução dramática na

identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana. Este período é marcado pela modificação do mercado de antibióticos pela introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos 1980, desenvolvidas a partir do ácido nalidíxico. Alguns antibióticos baseados em protótipos naturais, como imipenem (derivado β -lactâmico) e análogos da eritromicina também foram introduzidos neste período. (FERNANDES, P, 2006).

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida. (FERNANDES, 2006). Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipopeptídeo natural daptomicina pelo FDA em 2003. (FERNANDES, 2006). Na **Figura 03** estão representados os principais antibióticos de origem sintética.

Figura 03 - Principais Antibióticos de Origem Sintética



Fonte:

Disponível em: <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v33n3/35f01.gif>. Acesso em: Setembro de 2018.

3.3.2 Classificações e Mecanismos de Ação dos Antibióticos

Segundo Baptista (2013), o antibiótico ideal seria um fármaco com alvo seletivo, ação bactericida rápida, espectro de ação estreito que não afete a microbiota saprófita, com baixo

nível tóxico e elevados níveis terapêuticos, poucas reações adversas, várias vias de administração, boa distribuição no local de infecção e ser um antibiótico que não contrarie as defesas imunológicas do hospedeiro, não induza resistência e possua boa relação custo/eficácia. Sendo, no entanto, todas essas características, difíceis de serem obtidas devido a relação entre os antibióticos e as bactérias, não ser linear. (COSTA, 2016).

De acordo com Guimarães et al. (2010), os antibióticos podem ser classificados:

1) de acordo com suas origens em: antibióticos naturais, quando são obtidos a partir de organismos vivos; **antibióticos semi-sintéticos**, que são substâncias de origem natural que são submetidas a processos de síntese em laboratório; ou **antibióticos sintéticos**, que são produzidos exclusivamente em laboratório;

2) pela suas ações sobre as células bacterianas: bacteriostáticos ou **bactericidas**;

3) pelo seus mecanismos farmacodinâmicos, que podem ser os seguintes:

• **Inibição da síntese de parede celular:** Os antibióticos com este mecanismo de ação atuam ao nível da síntese do peptidoglicano, impedindo sua síntese. Antibióticos que exemplificam este mecanismo de ação são os β -lactâmicos como a penicilina e as cefalosporinas, que inibem enzimas necessárias para a formação do peptidoglicano; a bacitracina que bloqueia a passagem do pirofosfato-bactoprenol à fosfobactoprenol (BAPTISTA, 2013) que é um importante precursor da síntese de parede celular e carreador de membrana associado a processos anabólicos em Gram-positivos (SCHNEIDER et al. 2009); e os glicopeptídeos como a vancomicina que se liga à extremidade terminal do peptídeo D-Ala-D-Ala da cadeia do peptidoglicano, prevenindo as ligações cruzadas entre o N-acetilglicosamina e o ácido N-acetilmurâmico que formam o peptidoglicano da parede celular. (DZIDIC et al., 2008; BAPTISTA, 2013).

• **Inibição da síntese proteica:** Os ribossomos bacterianos são organelas celulares constituídas por duas subunidades, 30s e 50s, onde ocorre a síntese de proteínas, atuando fármacos como os aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólídeos, lincosamida e oxazolidinonas, inibindo ou modificando o processo de síntese de proteínas, se ligando a uma das duas subunidades formadoras do ribossomo, impedindo assim a síntese de enzimas necessárias ao metabolismo e impedindo também o crescimento bacteriano. (COSTA, 2016).

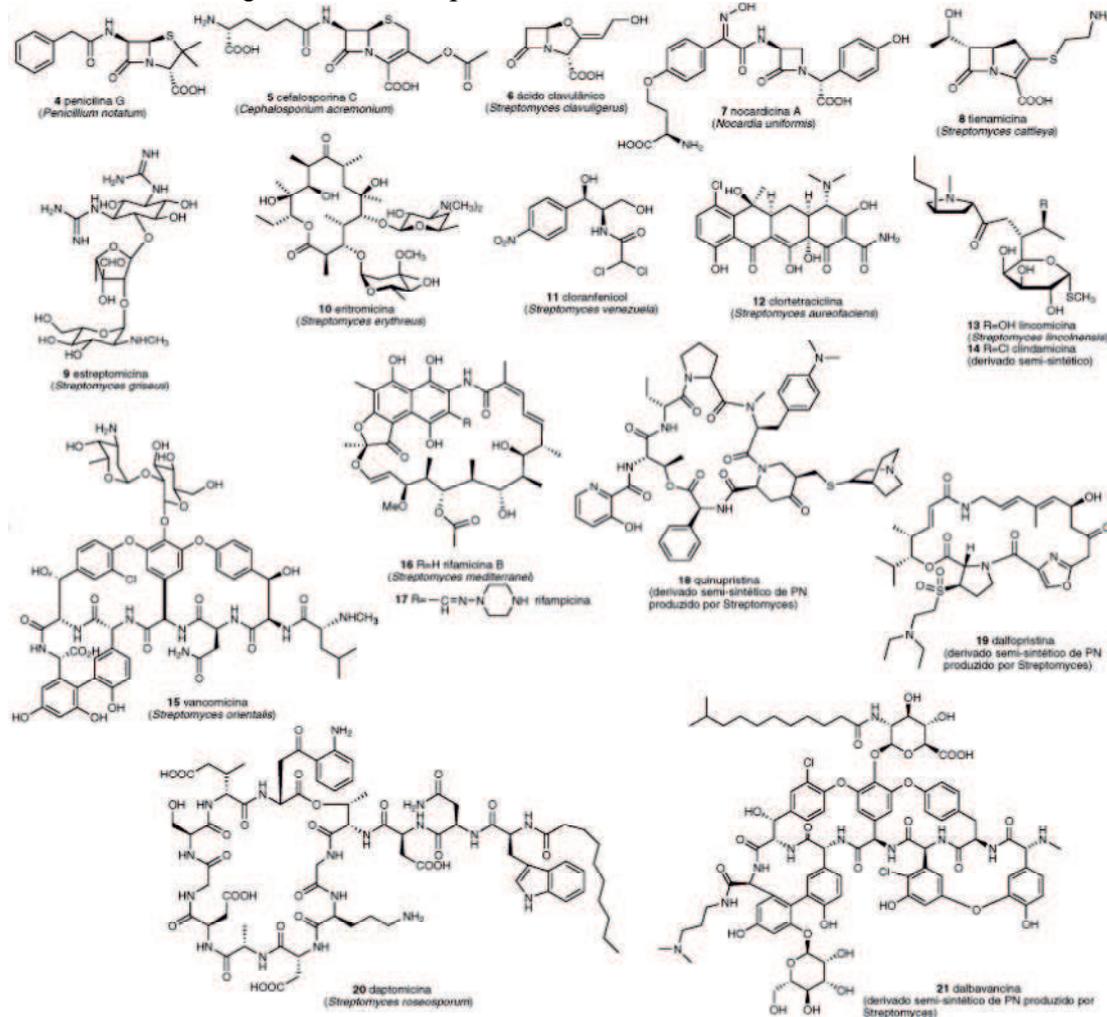
• **Inibição da síntese de ácidos nucleicos:** Antibióticos que exemplificam este mecanismo de ação são as quinolonas como o ciprofloxacino, norfloxacino e ofloxacino que inibem as enzimas girase e topoisomerase IV que atuam no processo de replicação do DNA (COSTA, 2016) e a rifampicina que atua inibindo a RNA polimerase, que é responsável pelo

processo de transcrição, impedindo a síntese de mRNA e consequentemente a de proteínas. (DZIDIC et al., 2008).

- **Desorganização da membrana celular:** Antibióticos que exemplificam esse mecanismo de ação são as polimixinas que são moléculas anfipáticas tensoativas que interagem com as moléculas de polissacarídeos presentes na membrana externa, sequestrando o cálcio e o magnésio necessário para a estabilidade da membrana, desorganizando-a, alterando sua permeabilidade e causando vazamento do conteúdo intracelular. (DZIDIC et al., 2008).

- **Interferência no metabolismo celular:** As sulfonamidas e o trimetropim bloqueiam diferentes etapas da síntese de folato, que é um cofator necessário para a síntese de DNA e RNA (DZIDIC et al. 2008), impedindo que os processos celulares ocorram. Na **Figura 04** estão mostrados as principais classes de antibióticos em uso clínico.

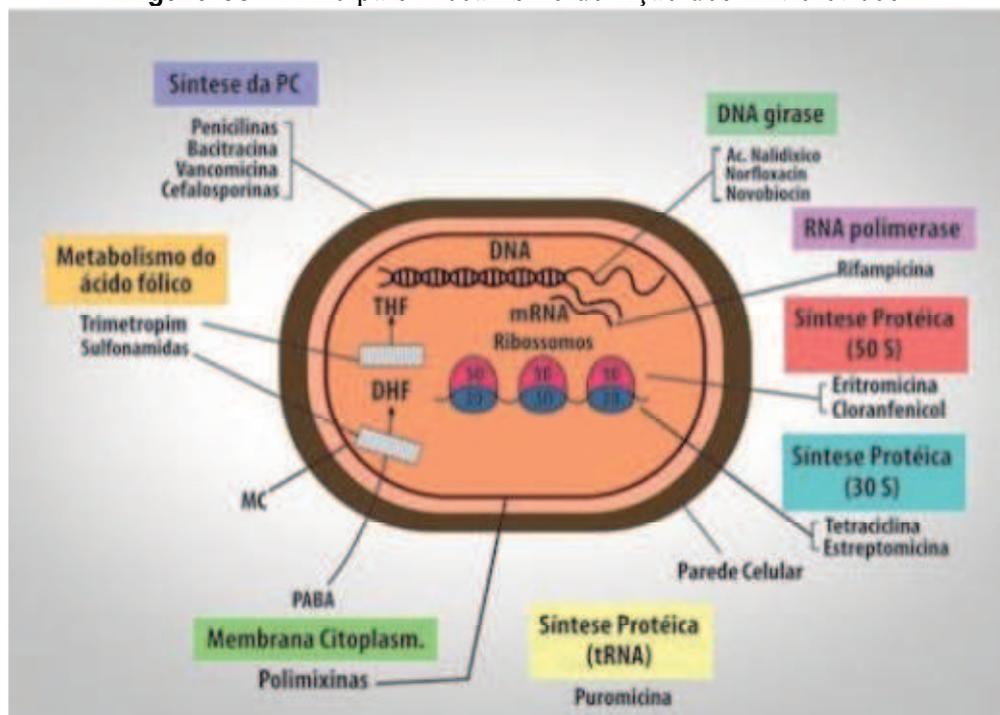
Figura 04 - Principais Classes de Antibióticos em Uso Clínico



Fonte: Disponível em: <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v33n3/35f02.gif>. Acesso em: Setembro de 2018.

Os antibióticos representam para a medicina um grande avanço por tornarem possíveis a realização de procedimentos invasivos como cirurgias, transplantes, partos prematuros e terapias citotóxicas para o câncer, dentre outros procedimentos profiláticos ou terapêuticos que contribuem para o aumento da expectativa de vida das populações humanas do planeta. Que podem ser comprometidos pela resistência bacteriana aos antibióticos por reduzir as opções de fármacos efetivos contra patógenos bacterianos e favorecer a disseminação de bactérias resistentes dentro de ambientes hospitalares e na comunidade. (BRITO; CORDEIRO, 2012). Na **Figura 05** estão representados os principais mecanismos de ação dos antibióticos:

Figura 05 - Principais Mecanismo de Ação dos Antibióticos



Fonte: MADIGAN et al., 2010.

3.4 Principais Antifúngicos Utilizados Clinicamente e a Resistência Leveduriforme Encontrada

As espécies de leveduras do gênero *Candida* mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, sendo que a *Candida albicans* permanece como a espécie mais comum nas infecções humanas. (DIEKEMA, PFALLER, 2007; DIGNAMI, et al. 2009).

As manifestações clínicas na candidíase apresentam grande diversidade de quadros, como candidíase cutâneo-mucosa e candidíase invasiva ou sistêmica. A candidíase cutâneo-mucosa consiste em manifestações superficiais, apresentando as seguintes formas: candidíase intertriginosa, onicomicose, candidíase oral, vulvovaginite, balanopostite e candidíase cutâneo-mucosa crônica. Já a candidíase invasiva ou sistêmica caracteriza-se por apresentar infecções profundas ou invasivas, podendo localizar-se em um órgão ou disseminar-se via sanguínea (candidemia). Apresentam-se como quadros de sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, renal, ocular, do sistema nervoso central, ou disseminada, que é uma forma clínica de difícil tratamento . (DIGNAMI, et al., 2009).

As infecções invasivas estão associadas a internações prolongadas, com elevada taxa de mortalidade e aumento no custo hospitalar (DIGNAMI, et al., 2009, NUCCI, et al., 2010). Nesses casos, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica. (DIEKEMA; PFALLER, 2007; DIGNAMI, et al. 2009).

Dentre os antifúngicos utilizados na terapêutica de candidíases invasivas destacam-se triazólicos, como fluconazol, derivados poliênicos, como anfotericina B, e do grupo das equinocandinas, a caspofungina. (DIEKEMA; PFALLER, 2007; DIGNAMI, et al., 2009).

A anfotericina B é indicada para formas graves de doença invasiva, pertence ao grupo dos poliênicos. São grandes moléculas que atuam na membrana celular fúngica, onde possui grande afeição pelo ergosterol, justificando sua especificidade. Também interferem com a permeabilidade e com as funções de transporte pela sua capacidade de formar grandes poros na membrana causando distúrbios graves no equilíbrio iônico, com perda de K^+ extracelular (DALE; RANG, et al., 2011) além de utilizar múltiplas vias de sinalização intracelular para indução da morte da levedura. (CHUDZIK, et al., 2015).

Os azólicos constituem um grupo de agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade, baseados nos núcleos imidazol ou triazol (CHUDZIK, B, et al., 2015). Eles atuam inibindo a enzima fúngica lanosina-14- α -desmetilase, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, afetando diretamente a fluidez da membrana e nas enzimas ligadas a ela (DALE; RANG, et al., 2011; CHUDZIK, et al., 2015). No caso de infecção invasiva, um dos mais utilizados é o fluconazol (CHUDZIK, B, et al. 2015), que é um antifúngico triazólico que alcança grandes concentrações no líquido cefalorraquidiano, podendo ser a primeira opção nos casos de meningite fúngica, alcançando também boas concentrações no humor vítreo, saliva, pele, unhas e tecido vaginal.

A caspofungina pertence ao grupo das equinocandinas e é administrada intravenosamente. Ele atua contra o crescimento de fungos através da inibição da β -1,3-D-glucano-sintase. (ODDS, et al., 2003). Este polímero é necessário para manter estável a estrutura das paredes celulares fúngicas, sendo que, na sua ausência, as células fúngicas perdem a integridade e ocorre a sua lise. (ODDS, et al., 2003). O amplo espectro de atividade fungicida contra as espécies de *Candida*, baixos efeitos colaterais e perfil de interação favorável faz da caspofungina terapia de primeira linha para as diversas manifestações clínicas da candidíase. (THOMPSON, et al., 2008).

Uma vez identificado o patógeno causador da infecção, a falha na terapia antifúngica pode ocorrer por diversos fatores, como resistência *in vitro* (intrínseca ou desenvolvida ao longo da terapia) ou resistência clínica. (ARTHINGTON, BA; REX, JH, 2008).

A resistência clínica ocorre quando o fungo é aparentemente susceptível ao antifúngico *in vitro*, porém não *in vivo*, devido à impossibilidade do antifúngico agir no seu alvo. Pode ser resultado de terapia em pacientes muito imunodeprimidos, neutropênicos, infecção em tecidos pouco vascularizados ou abscessos fechados, falta de aderência do paciente ao tratamento e formação de biofilmes em próteses e catéteres. Várias espécies de leveduras do gênero *Candida* têm a habilidade de produzir biofilme. (ARTHINGTON; REX, 2008, EL-AZIZI, et al., 2015).

A resistência microbiológica, por sua vez, envolve mecanismos moleculares e pode ser intrínseca ou adquirida. (ARTHINGTON; REX, 2008). A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de micro-organismo e confere a ele a resistência inata antes da exposição deste ao antifúngico. Isso ocorre, por exemplo, com a espécie de *C. krusei*, que possui resistência intrínseca ao fluconazol. (ARTHINGTON; REX, 2008). Já a resistência adquirida ocorre em micro-organismos que desenvolveram mutações após a exposição ao antifúngico e posteriormente houve a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes. (ARTHINGTON, BA; REX, JH, 2008).

3.5 Desenvolvimento de Fármacos

Infelizmente, embora a resistência aos antimicrobianos tenha aumentado, o desenvolvimento de novos agentes tem diminuído drasticamente ao longo dos últimos 30 anos. (CHANG et al., 2013). Tais demandas levaram a OMS a reconhecer a Resistência

Antimicrobiana (RAM) como uma crise de saúde pública global. (WHO, 2012; BASSETTI et al., 2013; CHANG et al., 2013).

A busca por substâncias com atividades antimicrobianas é uma necessidade permanente em vista do surgimento de cepas patogênicas resistentes e do aumento das doenças degenerativas. As infecções podem ser classificadas em três tipos: **I - emergentes e reemergentes**, que corresponde a doenças novas ou modificadas que estão aumentando ou possuem potencial para aumentar no futuro próximo. **II – oportunistas**, quando acometem pessoas com sistema imunológico deprimido. **III - hospitalares ou nosocomiais**, quando ocorre em ambiente hospitalar. (CASE; FUNKE; TORTORA, 2005).

Segundo Cachiba et al. (2012), a pesquisa por novos antimicrobianos constitui uma das estratégias para evitar o insucesso nos tratamentos anti-infecciosos, causado pela emergência dos micro-organismos resistentes.

O primeiro passo para o desenvolvimento de um fármaco é a identificação de um alvo terapêutico, seguido do respectivo ensaio experimental que permita identificar moléculas com possível ação no alvo escolhido. O ensaio experimental consiste na avaliação do efeito de milhares de moléculas sobre a plataforma terapêutica selecionada. Com o desenvolvimento tecnológico diversas técnicas têm sido desenvolvidas para acelerar a triagem farmacológica do desenvolvimento de fármacos. Dentre as técnicas mais recentes podemos destacar automatizada em alta escala (HTS, *High-throughput screening*), que propicia a avaliação biológica *in vitro* de milhares ou até mesmo milhões de compostos contra uma proteína alvo ou sistema celular definido. (ANDRICOPULO; FERREIRA; GLAUCIUS, 2011; ANVISA, 2012).

Conforme Barreiro e Fraga (2005), o método de descoberta de fármacos baseado na modificação estrutural de fármacos conhecidos leva à identificação de novos compostos protótipos que atuam pelo mecanismo farmacológico do primeiro, sendo denominados de fármacos “*me-too*”. Considera-se como fármaco “*me-too*” aquele que é estruturalmente muito similar a um fármaco conhecido, com pequenas diferenças farmacoterapêuticas. Esta estratégia é largamente empregada na Indústria Farmacêutica que pesquisa novos fármacos sendo considerada, por alguns autores, como responsável por inovações parciais.

Uma estratégia eficaz e muito empregada nesta busca consiste na modificação molecular de agentes antimicrobianos pré-existentes, se obtendo fármacos

análogos estruturais e farmacológicos, que possuem estrutura química e atividade farmacológica semelhante, que podem ser considerados análogos diretos quando possuem grupamentos farmacofóricos idênticos, responsáveis pela interação com o sítio receptor. (FISCHER; GANELLIN, 2006).

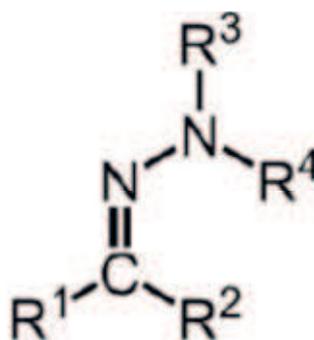
Além disso, como a resistência consiste no reconhecimento da estrutura do fármaco pelos micro-organismo, realizar substituições em fármacos já existentes pode garantir um maior potencial, superando os mecanismos de resistência, como também, diminuindo seus efeitos tóxicos. (MADIGAN et al., 2016).

3.6 Derivados N-Acilidrazônicos

A subunidade estrutural acilidrazona está presente em diversas substâncias com atividades biológicas bem relatadas e que podem ser utilizadas como modelos para o planejamento de candidatos a novos fármacos. Já foram descritas, para os compostos desta natureza, diversas atividades farmacológicas como ação antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica e anti-inflamatória, e antiproliferativa de células tumorais. (BARREIRO; FRAGA, 2015).

A **Figura 06** mostra a estrutura da hidrazona, precursora de diversos compostos amplamente sintetizados e de grande interesse farmacêutico, devido às suas diversas atividades biológicas. (SANTOS, 2012).

Figura 06 - Esqueleto Hidrazônico



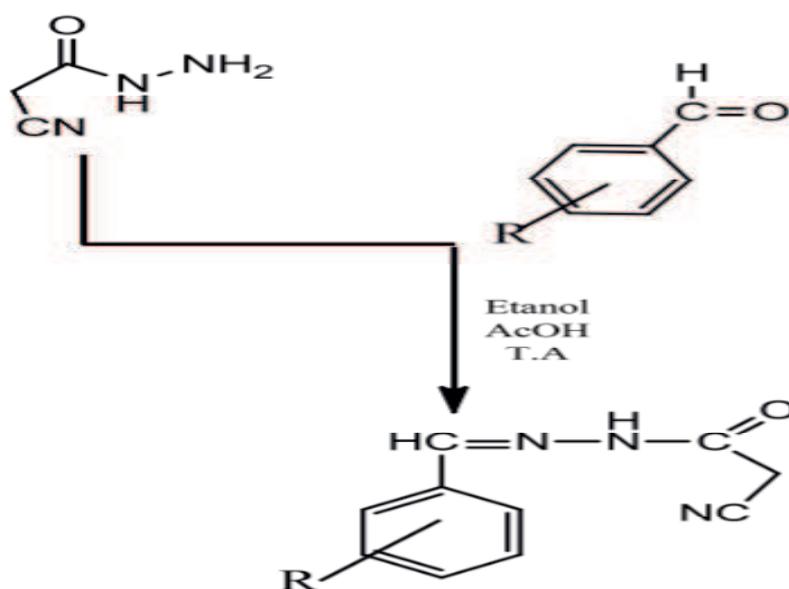
Fonte: SANTOS, 2012

A obtenção das hidrazonas ocorre a partir da condensação entre um aldeído ou cetona com uma hidrazina. Quando essa hidrazina é uma *N*-acilidrazina (ou hidrazida), o produto é uma *N*-acilidrazona (**Figura 07**), um composto azometino.

Figura 07 - Reação Geral da Formação de uma N-acilidrazona

Fonte: Moura, 2016.

A obtenção dos derivados N-acilidrazônicos se procede a partir de uma reação de condensação do 2-cianoacetohidrazida com diferentes aldeídos aromáticos seguida de uma desidratação, como proposto na **Figura 08** a seguir, Moura em 2016 utilizou como solvente o etanol e para catálise da reação o ácido acético.

Figura 08 – Rota Sintética da Série JR

Fonte: Moura, 2016.

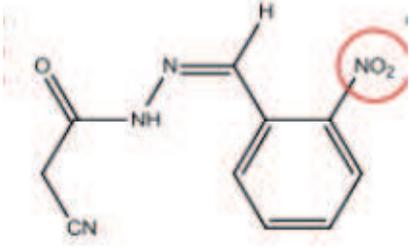
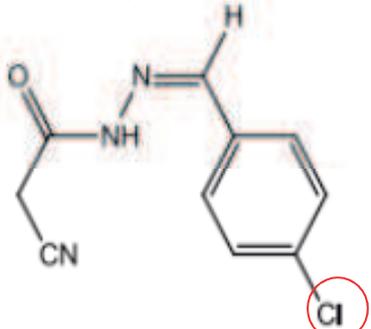
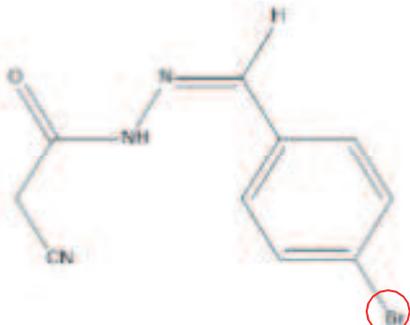
A atividade antibacteriana de derivados acilidrazônicos já foi relatada frente a diferentes espécies de bactérias. Reis (2007) encontrou atividade antimicrobiana de derivados acilidrazônicos derivados da D-ribolactona frente a uma cepa de *Mycobacterium tuberculosis* e outra de *Staphylococcus aureus*. Oliveira et al. (2012) também constataram significativa atividade antimicrobiana de derivados da acilidrazona frente a diferentes cepas multirresistentes de *S. aureus*.

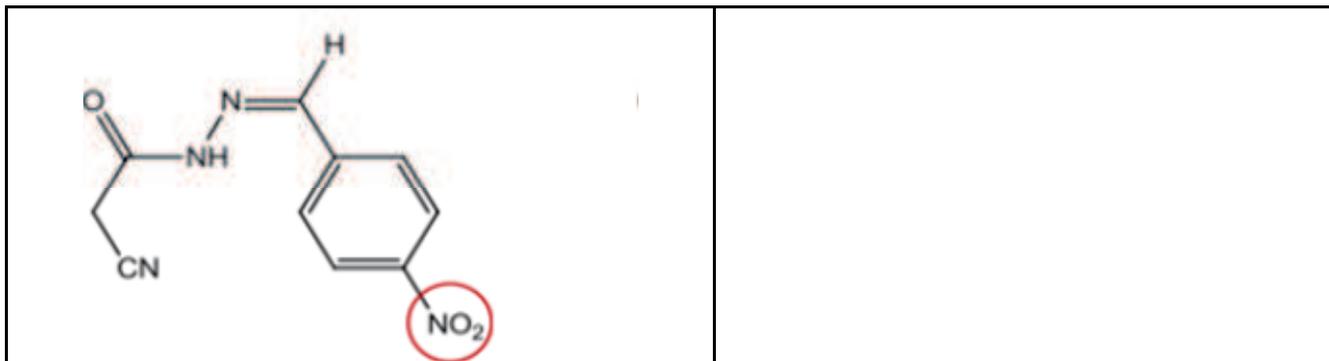
A atividade antifúngica também já foi constatada para derivados acilidrazônicos. Malik et al (2012) e Cachiba et. al., (2012) também detectaram atividade antifúngica destes derivados frente a diferentes espécies do gênero *Candida* sp.

Na **tabela 01** a seguir é possível se observar a estrutura de alguns dos compostos N-acilidrazônicos testados por Moura, 2016 que foram utilizados neste trabalho de pesquisa, é

possível se observar que a diferença entre as moléculas JR-05 e JR-08 está na posição do radical $-NO_2$ adicionado ao anel benzênico, em que na primeira está adicionado na posição 2 e na segunda na posição 4. A diferença entre as moléculas JR-06 e JR-07 está nos halogênios adicionados na posição 4 do anel benzênico, em que na primeira foi adicionado um cloro e na segunda um bromo.

Tabela 01 - Estrutura Molecular dos Compostos N-acilidrazônicos Testados

Composto	Nomenclatura
<p>JR-05 (acilidrazônico)</p> 	<p>2-ciano-N'-(2-nitrobenzilideno) - acetato hidrazida</p>
<p>JR-06 (Acilidrazônico)</p> 	<p>2-ciano-N'-(4-clorobenzilideno) - acetato hidrazida</p>
<p>JR-07 (Acilidrazônico)</p> 	<p>2-ciano-N'-(4-bromobenzilideno) - acetato hidrazida</p>
<p>JR-08 (Acilidrazônico)</p>	<p>2-ciano-N'-(4-nitrobenzilideno) - acetato hidrazida</p>



Fonte: Moura, 2016

O coeficiente de partição ($\log P$) das moléculas que foram testadas são os seguintes, JR-05 = 0,5; JR-06 = 2,22; JR-07= 2,5 e JR-08 = 0,5. As moléculas JR-05 e JR-08 foram são as mais hidrofílicas, o que favoreceu uma melhor dissolução durante o preparo das soluções mães. Os resultados para peso molecular em grama por mol (g/mol) foram: JR-05 = 232,06 ; JR-06 = 221,64; JR-07 = 264,98 e JR-08= 232,06. (MOURA, 2016). Todas as moléculas têm $\log P < 5$. Os resultados para peso molecular e $\log P$ apresentam-se de modo satisfatório e de acordo com a regra de Lipinsk para estes parâmetros, uma vez que esses valores podem indicar um bom perfil de biodisponibilidade. (BARREIRO; FRAGA, 2015), resultando em um aumento da sua ação farmacológica. (PEREIRA, 2016).

3.7 Ésteres

Os ésteres são uma função orgânica que possuem átomos de oxigênio entre as cadeias carbônicas. Porém, diferem-se dos éteres por possuírem um grupo carbonilo (CO) também entre os carbonos. Assim, a molécula estruturada por: radical – carbonilo – oxigênio – radical. (COSTA et al., 2004).

Os ésteres são compostos de baixa polaridade e com ponto de ebulição menor do que os ácidos carboxílicos de peso molecular semelhante. Podem ser sintetizados através de reação entre um ânion carboxilato e um haleto de alquila ou ainda pela reação de esterificação de Fischer à qual se tem dado maior ênfase devido à viabilidade de aplicação industrial para síntese de flavorizantes. (COSTA et al., 2004). Na **Figura 09** está representada a reação de esterificação Fischer dando origem a um éster:

Figura 09 - Reação de Esterificação de Fischer

Fonte: Pereira, 2016.

Os ésteres são derivados dos ácidos carboxílicos e podem ser preparados através da reação de álcoois com ácidos, cloretos de ácido ou anidridos na presença de catalisador. A reação de ácidos com álcoois é uma reação de equilíbrio. No sentido direto conduz à formação de ésteres e no sentido inverso leva à hidrólise dos mesmos. Para deslocar a reação no sentido da formação do éster pode utilizar-se um excesso de um dos reagentes ou remover um dos produtos à medida que a reação decorre. (CAVALCANTE et al, 2015).

3.7.1 Derivados Fenilacrilatos

Como citou Pereira em 2016, os ésteres de Fenilacrilatos são derivados formados através da reação de condensação de Knoevenagel, reagindo um aldeído aromático e o 2-cianoacetato de etila, na presença de bases orgânicas como catalisadores. Apesar de importantes intermediários em síntese, ainda são poucos conhecidos quanto as suas propriedades biológicas. A reação de condensação, representa uma classe de reações muito importantes na síntese de compostos intermediários. Moléculas complexas e contendo grupos funcionais específicos podem ser formadas através da condensação de duas ou mais moléculas simples.

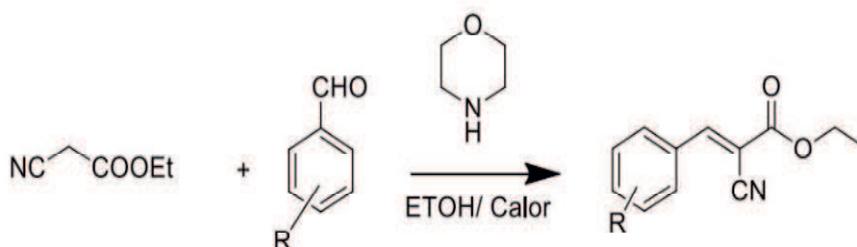
Dentro dessa classe, a condensação de Knoevenagel tem sido muito utilizada comercialmente para preparação de intermediários para a química fina e como reação modelo para caracterização da basicidade de catalisadores sólidos. Esta reação ocorre entre um composto carbonílico (aldeídos ou cetonas) e moléculas contendo grupos metilênicos ativados. (VELOSO et al., 2001; WEITKAMP et al., 2001).

Uma importante vantagem desta reação que ocorre em fase líquida é a possibilidade do uso de reagentes com caráter básico diferenciado.

Convencionalmente, esta reação é catalisada por bases fracas, tal como aminas, em meio homogêneo. (VELOSO et al., 2001; WEITKAMP et al., 2001).

Na **Figura 10** estar representado o mecanismo de obtenção da série AL

Figura 10 - Obtenção da Série AL: Reação de Condensação de 2-Cianoacetato de Etila com Diferentes Aldeídos.



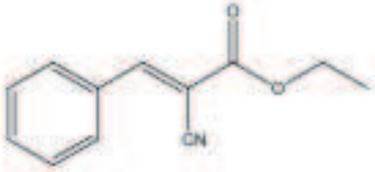
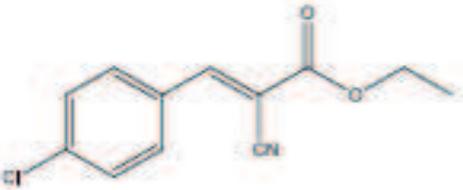
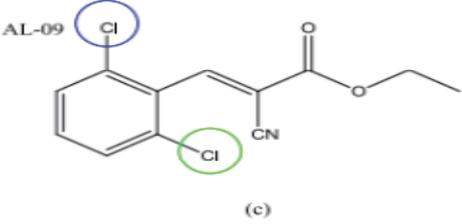
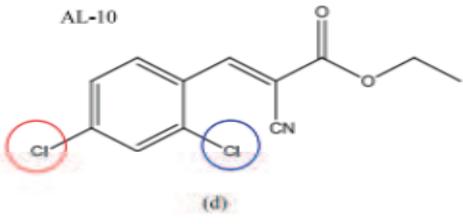
Fonte: Pereira, 2016.

O potencial bioativo dos derivados Fenilacrilatos vem atraindo a atenção de estudiosos no meio acadêmico, atenção esta devido ao fato delas exibirem considerável efeito anticancerígeno: atividade citostática contra linhas de células malignas, incluindo carcinoma pancreático, de mama, cervical, da laringe, de cólon, a linha celular de melanona e fibroblastos humanos. (BRAIOS et. al., 2009).

Como antimicrobianos são compostos relativamente novos, utilizados particularmente no tratamento de infecções bacterianas do trato urinário e também para o tratamento de infecções cujos agentes antimicrobianos apresentam grande resistência, como por exemplo os derivados de nitrofurantoínas com importante ação frente a bactérias como: *S. aureus* e *S. saprophyticus*. (BRAIOS et. al., 2009). A atividade antitumoral de derivados Fenilacrilatos foi comprovada por Hranjec et al. (2003). A potencialidade de moléculas de Fenilacrilatos derivados de quinolonas foi evidenciada, em estudos realizados por Serafim (2014), como fortes candidatas para o tratamento antimalárico além de outras doenças parasitárias.

Na **tabela 02** é possível observar a estrutura de alguns dos compostos Fenilacrilatos sintetizados por Pereira em 2016 e que foram utilizados neste trabalho de pesquisa.

Tabela 02 - Estrutura Molecular dos Compostos Fenilacrilatos Testados

AL-01 (Acrilato) 	Etil 2-ciano-3-fenil acrilato
AL-02 (Acrilato) 	Etil 2-ciano-3-(4 clorofenil)-acrilato
AL-09 (Acrilato) 	Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil)-acrilato
AL-10 (Acrilato) 	Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)-acrilato

Fonte: Pereira, 2016

O coeficiente de partição ($\log P$) das moléculas que foram testadas são os seguintes: AL-01 = 2,43; AL-02 = 2,99, AL-09 = 3,55 e AL-10 = 3,55. Sendo assim, as moléculas mais lipofílicas foram a AL-09 e a AL-10. Os resultados para peso molecular em grama por mol (g/mol) foram: AL-01 = 201,22; AL-02 = 235,67, AL-09 = 270,11 e AL-10 = 270,11. Todas as moléculas têm $\log P < 5$. Os resultados para peso molecular e $\log P$ apresentam-se de modo

satisfatório e de acordo com a regra de Lipinsk, uma vez que esses valores podem indicar um bom perfil de biodisponibilidade. (BARREIRO; FRAGA, 2015), resultando em um aumento da sua ação farmacológica. (PEREIRA, 2016).

3.8 Testes de Atividade Antimicrobiana

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de moléculas naturais e sintéticas. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição.

3.8.1 Métodos de Difusão

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um micro-organismo é testado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido, relacionando o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo estudado com a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY, et al.,2008).

Quando se utiliza o método de difusão vários fatores podem tornar-se fontes de erros, tais como: composição e espessura do meio de cultura, preparação incorreta do meio de cultura, densidade incorreta do inóculo, uso de swab com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequados, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas [ALVES, et al., 2008].

A aplicação do método de difusão limita-se a micro-organismos de crescimento rápido, (aeróbios ou aeróbios facultativos). A avaliação é efetuada comparativamente a um padrão de referência (controlo positivo). A zona ou halo de inibição de crescimento é medida partindo da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos. (OSTROSKY, et al.,2008).

De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como:

Sensíveis, quando o diâmetro do halo de inibição é maior ou igual que o halo do controlo positivo;

Moderadamente sensíveis, o halo de inibição é maior que 2 mm, mas menor em ± 3 mm, em relação ao controlo positivo;

□ **Resistentes, o diâmetro do halo de** inibição é igual ou menor que 2 mm. (OSTROSKY, et al.,2008).

Como controlo positivo, aplica-se um quimioterapêutico padrão, e como controlo negativo a solução utilizada para a dissolução dos extractos. [Ostrosky et al., 2008]. As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 °C, durante 24 a 48 horas para bactérias, e de 25 a 27 °C durante 48 a 72 horas para fungos. As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em agar. (OSTROSKY, et al.,2008).

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar .(PINTO et al., 2003).

A metodologia de difusão em discos consiste em colocar os discos sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com diferentes cargas microbianas, 10^8 UFC (Unidade Formadora de colônia)/mL para bactérias, 10^6 UFC/mL para leveduras e 10^4 para esporos/mL . CHATTOPADHYAY et al., 2002; KARAMAN et al., 2003). A disposição dos discos deve ser tal que sua distância até a lateral da placa seja maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4, e a profundidade recomendada ser de aproximadamente 4 mm. (OSTROSKY, et al.,2008).

A técnica cilindros de aço inoxidável por sua vez, consiste na aplicação de cilindros no meio de cultura solidificado já inoculado e a adição da solução em estudo nos cilindros. (OSTROSKY, et al.,2008).

Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas.(OSTROSKY, et al.,2008).

3.8.2 Método de Diluição em Caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. (OSTROSKY, et al.,2008).

A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. (PINTO et al., 2003).

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada do micro-organismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana . (OSTROSKY, et al.,2008).

3.8.2.1 Macrodiluição

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando entre 1 e 10 mL. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado pequeno número de réplicas. (OSTROSKY, et al.,2008).

3.8.2.2 Microdiluição

Nos Estados Unidos, o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, conhecido antigamente por *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, é o comitê responsável pela padronização de todos os métodos utilizados em laboratórios clínicos, principalmente na área de microbiologia.

Há diversos métodos laboratoriais que podem ser usados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Em 2015, o CLSI aprovou a norma M7-A10 que descreve técnicas padrão de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição) e diluição em ágar, além de incluir uma série de procedimentos para padronizar a execução dos testes.

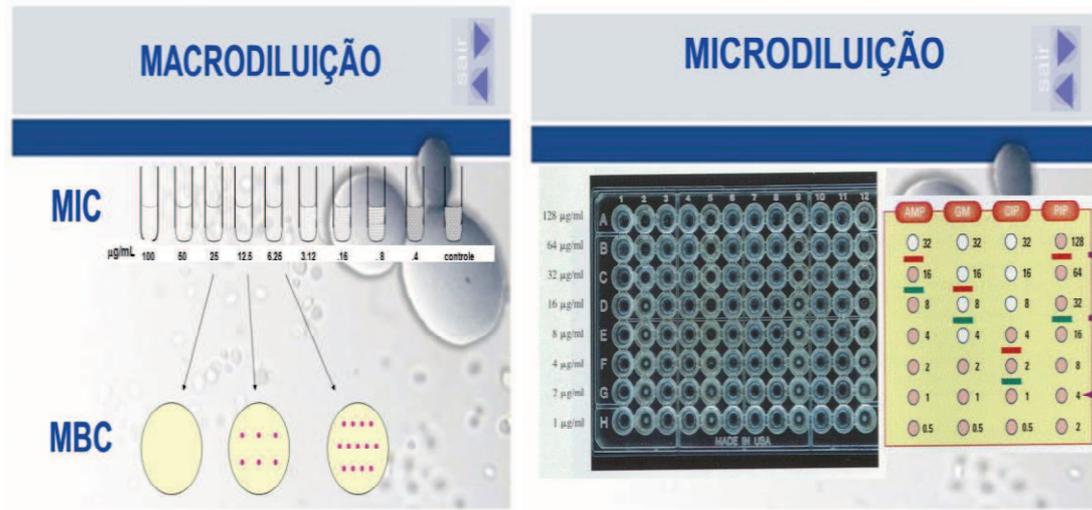
Além disso, descreve o desempenho, as aplicações e as limitações dos métodos atualmente recomendados pelo CLSI. (CLSI, 2015).

Dentre os métodos descritos no documento M7-A10 destaca-se um método em que, por ser realizado em uma escala micro, vem sendo amplamente utilizado como teste de *screening* para novos candidatos a drogas com atividade antimicrobiana. Além disso, essa metodologia é simples, rápida e barata, principalmente pela utilização reduzida de solventes e materiais. (CLSI, 2015).

Este método é denominado “microdiluição” porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que

possuem 96 poços de fundo redondo ou cônico. (CLSI, 2015). A seguir, na **Figura 11** está imagens representativas dos métodos de Macrodiluição e Microdiluição.

Figura 11 - Macrodiluição e Microdiluição



Fonte: <https://slideplayer.com.br>. Acesso em: setembro de 2018.

4 METODOLOGIA

4.1 Período das Pesquisas, Local de Realização e Origem dos Compostos

Os testes utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, utilizando placas de Elisa estéreis, contendo 96 poços, onde foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de derivados N-acilidrazônicos e Fenilacrilatos frente a diversas cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e Leveduras, foram realizados entre o mês de agosto de 2016 e agosto de 2018 e são frutos de 2 projetos de iniciação científica, que foram fomentados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) através do Programa de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), e realizados no Laboratório de Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea (LaRMiCC) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, campus V, que continha os materiais, equipamentos e compostos utilizados para a realização dos experimentos.

Foi utilizado o espectrofotômetro do Laboratório de Bioquímica Básica (LBB), do mesmo campus, para preparo das suspensões bacterianas e leveduriformes, as moléculas testadas foram cedidas pelo Laboratório do Professor Ricardo Olímpio de Moura, sendo sintetizadas por Moura (derivados N-acilidrazônicos) e Pereira (derivados Fenilacrilatos) no ano de 2016.

4.2 Preparo das Soluções a Serem Testadas

Para o preparo das soluções dos derivados acilidrazônicos e Fenilacrilatos testados, pesou-se 0,02 g (20 mg) da molécula a ser testada e solubilizou-se em 1.960 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 20%. Para melhorar a solubilidade das moléculas no meio aquoso, adicionou-se 40 µL de tween 80 perfazendo assim o volume de 2 mL, ficando a solução mãe na concentração de 10.000 µg/mL.

A fim de diminuir a concentração do DMSO, pois o mesmo é considerado altamente tóxico para as células de micro-organismos em concentrações de 20%, foram preparadas outras duas soluções, primeiro a solução estoque onde pegou-se 0,41 mL da solução mãe e adicionou-se 0,59 mL de água destilada estéril, ficando então a solução estoque na concentração de 4.096 µg/mL e o DMSO na concentração de 10%. Já a diluição seguinte foi a preparação da solução teste, se adicionando 0,5 mL da solução estoque e 0,5 mL de caldo

Mueller Hinton, se obtendo o volume desejado de 1 mL. Desta maneira, ficando o DMSO na concentração de 5% e a solução final na concentração de 2.048 µg/mL. Esta foi a solução utilizada para se realizar os testes em triplicata nas microplacas. Para o preparo das soluções utilizadas para as leveduras, ao invés de se utilizar o caldo Mueller Hinton no preparo da solução teste se utilizou o caldo Sabouraud dextrose.

Foi preparada solução estoque do antibiótico controle na concentração de 10.000 µg/mL, ao volume total de uma ampola de amicacina que tinha concentração de 50.000 µg/mL foi adicionado 8 mL de água destilada estéril obtendo-se assim a solução. A partir desta foi preparada a solução teste com 205 µL (0,205 mL) da mesma e 795 µL (0,795 mL) de água destilada estéril, de forma a se obter o volume desejado de 1 mL na concentração de 2.048 µg/mL, que foi a solução utilizada nas placas de Elisa. O antifúngico utilizado como controle positivo para os testes com as leveduras foi o fluconazol, a solução estoque e a teste foram preparadas da mesma maneira que as soluções preparadas a partir da amicacina.

4.3 Bactérias e Leveduras Utilizadas

Foram realizados ensaios *in vitro*, constatando-se a ação antimicrobianas dos novos compostos derivados N-acilidrazônicos e Fenilacrilatos frente a diferentes cepas de bactérias *Shigella flexneri* - ATCC 12022, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* - ATCC 700603, *Proteus mirabilis* - ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* - ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU)), *Enterococcus faecalis* - ATCC 29212, *Enterococcus durans/hirae* derivada da SS1225/IAL 03/10), *Staphylococcus* spp. Resistente à novobiocina não saprophyticus (R a Nov) (isolado de fossas nasais), *Escherichia coli* produtora de ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* produtora de ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* produtora de AmpC e *MRSA* (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina)

Foram realizados testes de sensibilidade em fungos através do método de microdiluição em caldo, de acordo com as padronizações publicadas nos documentos M27-A2 e M38-A pelo *Nacional Committee For Clinical Laboratory Standard* (NCCLS, 2002). As leveduras utilizadas foram *Candida tropicalis* - ATCC 13803, *Candida glabrata* – 2001, *Candida metapsilosis*, *Candida ortopsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida albicans*. Tanto as bactérias quanto as leveduras eram da Coleção do Laboratório de

Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea (LaRMiCC) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba.

4.4 Cultura e Preparo das Suspensões Bacterianas e Leveduriformes

Foi utilizado o método de **suspensão direta de colônias** proposta pelo CLSI M7-A6, 2014, após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C preparou-se o inóculo fazendo suspensão direta, em solução salina, a partir de colônias previamente isoladas em ágar *Mueller Hinton (MH)*. Todas as bactérias tiveram a turbidez ajustada em espectrofotômetro, a leitura foi realizada em comprimento de onda 625 nm, de modo que a solução viesse a apresentar uma variação de absorvância de 0,08 – 0,10%.

Para as leveduras realizou-se a subcultura (repique) dos micro-organismos em placas estéreis com ágar Sabouraud dextrose, excetuando passagem para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação foi de 35 ± 2 °C. O inóculo foi preparado escolhendo-se cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm de cultura. As colônias foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%).

A suspensão resultante foi agitada durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada em espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5, em comprimento de onda de 530 nm. O que forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição 1:20 da suspensão padrão com caldo Sabouraud resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL².

4.5 Testes de Sensibilidade *In Vitro* Para Bactérias e Leveduras

As concentrações utilizadas dos derivados N-acilidrazônicos e Fenilacrilatos variam entre 1.024 e 1 µg/mL. O meio de cultura utilizado nos testes foi o Caldo Mueller Hinton (MH). A droga controle utilizada foi a amicacina e alguns poços foram reservados para os testes de esterilidade do meio e controle do crescimento bacteriano.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de Caldo Mueller Hinton, em seguida foi adicionada 100 µL da solução teste no poço 12 das linhas A

até F, seguindo então a homogeneização dentro do poço e retirada de 100 µL que foram transferidos para o poço vizinho, poço 11 da mesma linha, e assim sucessivamente até o poço 2. A concentração da molécula a ser testada ficou entre 1 a 1.024 µL, respectivamente da coluna 2 à coluna 12; foi realizado triplicata para cada molécula testada. A coluna 1 foi destinada ao controle de crescimento bacteriano. Foram adicionados ainda, 100 µl do antibiótico controle (amicacina) do poço 12 da coluna G até o poço 4 da mesma linha, e do poço 12 da linha H até o poço 4 da mesma. A concentração do antibiótico variou de 0,0078125 a 1024 µg/mL. Foram adicionados ainda 10 µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas, com exceção dos poços 1 da linha G e H, que foram destinados ao teste de esterilidade. Foram reservados ainda os poços 2 e 3 das linhas G e H para o controle negativo referente ao solvente (Dimetilsulfóxido).

Para as leveduras o meio de cultura utilizado foi o Caldo Sabouraud dextrose (SB), foi utilizado como controle positivo o fluconazol e devido ao metabolismo diferenciado em relação às bactérias foram utilizados volumes duplo-concentrados nas placas, fazendo-se uso de 50 µL de Caldo Sabouraud, de cada solução teste, do antifúngico controle e do DMSO utilizado como controle positivo, e ao invés de 10 µL das suspensões, foram utilizados 50 µL. As disposições dos componentes nas placas, bem como as concentrações final destes em cada poço foram as mesmas que as utilizadas para as bactérias.

4.6 Leitura dos Experimentos

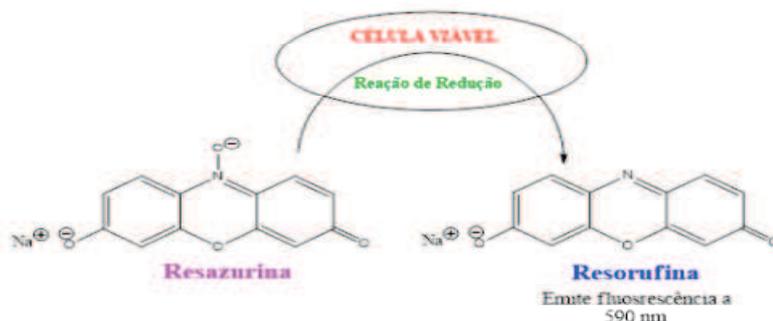
Após a realização dos experimentos e incubação da placa na estufa, por 20 ± 2 horas a $35 \pm 2^\circ$ C, adicionou-se 20 µl do corante resazurina na concentração de 0,010% para facilitar a realização da leitura. Após o período de aproximadamente 4 horas, realizou-se a leitura da placa, na qual a cor azul representava a ausência do crescimento bacteriano e a cor rosa o crescimento bacteriano (PALOMINO et al. 2002).

Para interpretar a atividade da amicacina, que é o antibiótico controle, foi utilizado o BrCAST 2017, que considera como sensível $\text{CIM} \leq 8$ µg/mL, intermediário $\text{CIM}=16$ µg/mL e resistente > 16 µg/mL. Já o documento CLSI M100-S27 considera como sensível ≤ 16 µg/mL, intermediário = 32 µg/mL e resistente ≥ 64 µg/mL.

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-onda10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de óxido-redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al.

2003). A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável), conforme indicado na **Figura 12**:

Figura 12 - Reação de Redução da Resazurina



Fonte: <http://www.sscdt.org/> Acesso em: agosto de 2017.

Para as leveduras as placas de microdiluição foram incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, por 24 horas, observando presença ou ausência de crescimento visível. Os poços de microdiluição receberam uma pontuação (score), o crescimento em cada poço é comparado com o do poço controle do crescimento (isento de droga) com auxílio de um espelho de leitura. Cada poço da placa de microdiluição recebeu um valor numérico, usando a seguinte escala: 0 = opticamente claro; 1 = crescimento indefinido; 2 = redução proeminente de crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento; e 4 = nenhuma redução do crescimento, conforme metodologia proposta pelo NCCLS M-27-A2.

Para interpretar o teste de fluconazol foi utilizado o documento M27-A2 (2002) que prediz que CIM de $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ é considerado sensível, CIM de 16 ou $32 \mu\text{g/mL}$ é intermediário (ou SDD = susceptibilidade dose-dependente ou intermediária), e CIM ≥ 64 é resistente.

4.7 Derivados Sintéticos

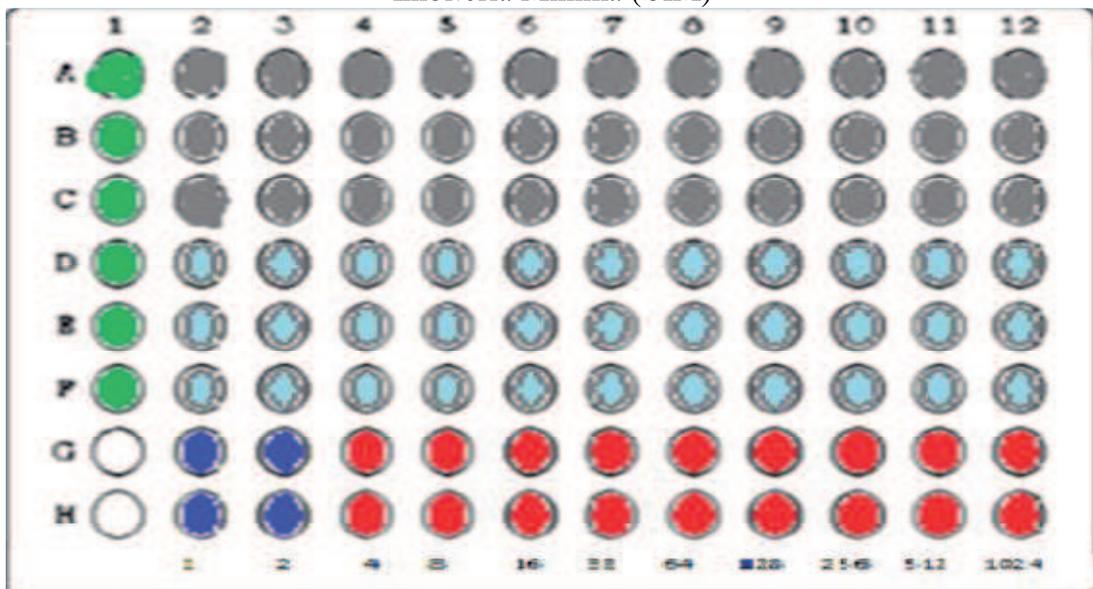
Os compostos sintéticos dos derivados N-acilidrazônicos e Fenilacrilatos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório do Professor Ricardo Olímpio de Moura, as moléculas foram sintetizadas por Moura (derivados N-acilidrazônicos) e Pereira (derivados Fenilacrilatos) no ano de 2016. A escolha das moléculas se deu a partir a análise dos melhores resultados obtidos anteriormente por estes alunos, frente a protótipos bactérias Gram-negativas e Gram-positivas respectivamente, bem como a partir da facilidade de acesso a estas moléculas.

Os derivados N-acilidrazônicos testados foram: JR-05 (2-ciano-N'-(2-nitrobenzilideno) - acetato hidrazida); JR-06 (2-ciano-N'-(4-clorobenzilideno) - acetato hidrazida) ; JR-07 (2-ciano-N'-(4-bromobenzilideno) – acetato hidrazida) e JR-08 (2-ciano-N'-(4-nitrobenzilideno) – acetato hidrazida).

Os derivados Fenilacrilatos testados foram: AL-01 (Etil 2-ciano-3-fenil acrilato); AL-02 (Etil 2-ciano-3-(4-clorofenil)-acrilato); AL-09 (Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato) e AL-10 (Etil 2-ciano-(2,4-diclorofenil)3- acrilato)

A **Figura 13** ilustrada abaixo mostra a disposição dos testes realizados nas microplacas para avaliação da Concentração Inibitória mínima (CIM), para bactérias e leveduras, a ilustração possui uma legenda que explica os poços nos quais foram adicionados os micro-organismos, os meios de culturas, as moléculas, o DMSO e os antimicrobianos nas microplacas a cada teste realizado.

Figura 13 - Disposição dos Testes na Microplaca para Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)



Legenda:

	Controle da Viabilidade do Micro-Organismo = Meio de Cultura + Micro-organismo
	Apenas Meio de Cultura (Controle da Esterilidade do Meio)
	(Molécula 1 Triplicata): Meio de Cultura + Molécula a ser testada + Micro-organismo
	(Molécula 2 Triplicata): Meio de Cultura + Molécula a ser testada + Micro-organismo
	Controle DMSO: Meio de cultura + DMSO + Micro-organismo
	Controle Antibiótico = Meio de cultura + antimicrobiano + Micro-organismo

Fonte: FARIAS, 2018.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características Observadas nos Compostos Testados

Durante a realização dos experimentos observou-se que o DMSO, um composto anfipático, capaz de dissolver tanto compostos aquosos, quanto orgânicos e, por isto, bastante utilizado como veículo de drogas terapêuticas (GALMEAS et al, 1995), não foi capaz de dissolver totalmente as moléculas testadas quando foi utilizado na concentração de 20% durante o preparo das soluções mães. Como o DMSO em concentrações maiores torna-se altamente tóxico para células de micro-organismos, é preciso diminuir esta concentração para fins de teste.

Foram adicionados às soluções mães, pequenos volumes (40 µL) de tween 80, um co-emulsificador de óleo em água, bastante utilizado como agente solubilizante, a fim de se alcançar uma maior dissolução das moléculas, já que não se pode aumentar a concentração de DMSO. A adição de tween 80 conseguiu diminuir a precipitação das moléculas testadas, mas não foi capaz de atingir o resultado esperando, ou seja, a solubilidade completa das mesmas, o que pode ter vindo a interferir nos resultados obtidos, reduzindo a atividade das moléculas frente às diferentes cepas bacterianas e fúngicas testadas.

Mesmo as moléculas que conseguiram uma solubilidade mais apreciável nas soluções preparadas, vieram a apresentar um certo grau de precipitação nos poços das microplacas durante os experimentos. Porém, apesar desta limitação encontrada durante a realização dos experimentos, foi possível se chegar a resultados bastante satisfatórios de Concentração Inibitória Mínima para os compostos testados frente a diversos micro-organismos.

A **tabela 03** traz algumas importantes características observadas nos compostos derivados N-acilidrazônicos e Fenilacrilatos testados, como cor, condições em que o pó se encontrava quando veio a ser utilizado, bem como a solubilidade destas moléculas no diluente (DMSO a 20%) durante o preparo das soluções mães.

Tabela 03 - Características Observadas nas Moléculas Testados

Compostos	Aparência/Cor	Condições em que o pó se encontrava	Solubilidade das moléculas em DMSO a 20% durante o preparo das soluções mães
JR-05	Bege escuro	Pouco Higroscópico	Incompleta
JR-06	Bege escuro	Higroscópico	Incompleta
JR-07	Bege escuro	Pouco Higroscópico	Incompleta
JR-08	Laranja	Pouco Higroscópico	Incompleta
AL-01	Marrom	Higroscópico	Incompleta
AL-02	Amarelo esverdeado	Pouco Higroscópico	Incompleta
AL-09	Marrom	Higroscópico	Incompleta
AL-10	Amarelo	Higroscópico	Incompleta

DMSO= dimetilsulfóxido; **JR** = derivado N-acilidrazônico; **AL** = derivado acrilato
 Fonte: FARIAS, 2018.

A tabela mostra ainda que algumas moléculas testadas, como os derivados N-acilidrazônicos JR-05, JR-07, JR-08 e o derivado fenilacrilato AL-02 se mostraram como pós finamente divididos e fáceis de se dissolver do que os demais, que haviam absorvido umidade do ar atmosférico (mais higroscópicas).

5.2 Controle de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Antimicrobianos

Durante os experimentos realizados, foram destinados poços nas microplacas para a realização do controle positivo, fazendo-se uso de antimicrobianos conhecidos clinicamente (amicacina para as bactérias e fluconazol para as leveduras), em concentrações variando de 0,0078125 a 1024 µg/mL.

Poços foram reservados ainda, para o controle negativo referente ao solvente utilizado para a dissolução das moléculas durante o preparo das soluções mães (DMSO), em concentrações variando de 5 a 20%.

A seguir, nas **tabela 04 e 05** estão representados a concentração do DMSO no controle negativo capaz de inibir o crescimento de cada micro-organismo e a Concentração Inibitória Mínima dos antimicrobianos frente às cepas bacterianas e leveduriformes.

Tabela 04 - Controle de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Antibiótico para as Bactérias Testadas

Bactérias	Concentração de DMSO capaz de inibir o crescimento bacteriano (%)	CIM em µg/mL de amicacina (Interpretação)
<i>Shigella flexneri</i> - ATCC 12022	20	8 (S)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> – ATCC 700603	20	0,25 (S)
<i>Proteus mirabilis</i> - ATCC 25933	20	16 (I)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ATCC 27853	10	1-0,5(S)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - ATCC 12228	10	0,25-0,5 (S)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU))	10	2-4 (S)
<i>Staphylococcus</i> spp. R a Nov (isolado de fossas nasais)	20	8 (S)
<i>Enterococcus faecalis</i> - ATCC 29212	20	>1024 (R)
<i>Enterococcus durans/hirae</i> derivada da SS1225/IAL 03/10	20	4 (S)
<i>Escherichia coli</i> produtora de ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido)	10	4 (S)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> produtora de ESBL	20	0,5 (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtora de AmpC	10	1 (S)
MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina)	20	1 (S)

DMSO = dimetilsulfóxido; **CIM**= concentração inibitória mínima; **S** = sensível; **I** = intermediário; **R**= resistente. **IAL** = Instituto Adolpho Lutz.
Fonte: FARIAS, 2018.

Tabela 05 - Controle de Dimetilsulfóxido (DMSO) e Antifúngico para as Leveduras Utilizadas

Leveduras	Concentração de DMSO capaz de inibir o crescimento bacteriano (%)	CIM do Fluconazol (µg/mL)
<i>Candida metapsilosis</i>	20	8 (S)
<i>Candida ortopsilosis</i>	20	2-4 (S)
<i>Candida parapsilosis</i>	10	4 (S)
<i>Candida tropicalis</i> - ATCC 13803	10	>1024 (R)
<i>Candida glabrata</i> – 2001	10	32-64 (I)
<i>Candida krusei</i>	20	32 (I)
<i>Candida albicans</i>	20	32-64 (I)

DMSO = dimetilsulfóxido; **CIM**= concentração inibitória mínima; **ATCC** = *American Type Culture Collection*; **IAL**= Instituto Adolpho Lutz. **ITU** = infecção do trato urinário; **S** = sensível; **I** = intermediário; **R**= resistente

Fonte: FARIAS, 2018.

Como é possível analisar nas **tabelas 04 e 05**, a maioria dos micro-organismos testados demonstraram possuir metabolismo ativo em presença de concentrações de DMSO abaixo de 20%, mesmo que em concentrações de 10% o DMSO já mostrasse um efeito citostático para alguns dos micro-organismos listados. O que representa que a concentração de DMSO a 5 %, utilizada nas soluções teste contendo as moléculas testadas não interferiu sobre os resultados de Concentrações Inibitórias Míminas (CIM) determinadas.

Entretanto, como é possível se ver, os micro-organismos possuem comportamentos diferenciados, ou seja, certas cepas bacterianas e leveduriformes mostraram-se mais sensíveis ao DMSO, de tal forma que este solvente, mesmo em concentrações menores de 20%, consegue interferir sobre o metabolismo destas espécies, como, por exemplo, sobre as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU), e as leveduras *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ATCC 13803 e *Candida glabrata* 2001.

Quanto ao antimicrobiano utilizado como controle positivo para as bactérias , a amicancina (um aminoglicosídeo), grande parte das bactérias testadas mostraram-se sensíveis, segundo interpretações concedidas pelo BrCAST 2017, que considera como sensível CIM ≤ 8

$\mu\text{g/mL}$, intermediário CIM=16 $\mu\text{g/mL}$ e resistente $> 16 \mu\text{g/mL}$, e o CLSI M100-S27, que considera como sensível $\leq 16 \mu\text{g/mL}$, intermediário = 32 $\mu\text{g/mL}$ e resistente $\geq 64 \mu\text{g/mL}$.

As bactérias que demonstraram CIM com valores menores para a amicacina foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidemidis* ATCC 12228, *Enterococcus durans/hirae derivada as SS1225/IAL 03/10*, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus saprophyticus (ITU)*, *Staphylococcus* spp. R a Nov (isolado de fossas nasais). A estirpe bacteriana com menor valor de CIM (0,25 $\mu\text{g/mL}$) foi a *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* – ATCC 700603, bactéria Gram-negativa da família das enterobactérias.

Proteus mirabilis ATCC 27853 apresentou resistência intermediária à amicacina, exibindo CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mostrou-se resistente à amicacina, apresentando CIM maior que 1.024 $\mu\text{g/mL}$, os enterococos caracterizam-se por apresentar resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos.

Para as leveduras foi utilizado como controle positivo o fluconazol que é um antifúngico triazólico que possui ação relacionada com a inibição da biossíntese do ergosterol de origem fúngica (DALE; RANG et al., 2011; CHUDZIK, et al., 2015). As espécies *Candida glabrata* - 2001, *Candida krusei* e *Candida albicans* demonstraram resistência intermédia ao antifúngico controle e a espécie *Candida tropicalis* apresentou-se como resistente ao fluconazol, apresentando CIM $>1.024 \mu\text{g/mL}$, o que já era esperado, já que esta última possui resistência intrínseca ao antifúngico.

É importante citar que outros antimicrobianos poderiam ter vindo a ser utilizados como controle positivo nos testes, porém, devido à disponibilidade no Laboratório de Resistência Microbiana Clínicas e Contemporânea (LaRMiCC) optou-se por se utilizar o fluconazol e a amicacina.

5.3 Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N- acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

As moléculas dos derivados N-acilidrazônicos tiveram suas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's) determinadas através da técnica de microdiluição em caldo Mueller Hinton, frente a diversas cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas.

É interessante citar que as moléculas JR-06 e JR-07 foram utilizadas apenas frente a bactérias multirresistentes. Na **tabela 06** estão representados os resultados encontrados no decorrer da pesquisa:

Tabela 06: Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N- acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Bactérias Gram-positivas	JR-05	JR-06	JR-07	JR-08
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	128	NR	NR	128
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU))	> 1024	NR	NR	> 1014
<i>Staphylococcus</i> spp. não <i>S. saprophyticus</i> (Resistente a Novobiocina e isolado de fossas nasais)	> 1024	NR	NR	> 1024
<i>Enterococcus durans/hirae</i> derivada da SS1225/IAL 03/10	1024	NR	NR	1024
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 1024	NR	NR	> 1024
Bactérias Gram-negativas				
<i>Escherichia coli</i> produtora de ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido)	NR	> 1024	> 1024	NR
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 700603	NR	NR	NR	NR
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> produtora de ESBL	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	> 1024	NR	NR	> 1024
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	> 1024	NR	NR	> 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1024	NR	NR	> 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtora de AmpC	NR	> 1024	> 1024	NR

JR = Derivado N-acilidrazônico; CIM = Concentração Inibitória Mínima; ATCC = American Type Culture Collection; ITU = Infecção do Trato Urinário; R= Resistente; Nov.= Novobiocina; IAL = Instituto Adolpho Lutz; NR = Não Realizado; µg/mL = micrograma por mL.

Fonte: FARIAS, 2018

Analisando-se a **Tabela 06**, é possível constatar que os melhores resultados atingidos pelos derivados N-acilidrazônicos, foram para as moléculas JR-05 e JR-08 frente a *Staphylococcus epidermidis* – ATCC 12228, de 128 µg/mL para ambas.

As moléculas JR-05 e JR-08 foram os derivados N-acilidrazônicos mais hidrofílicos testados (menores log P) e que se dissolveram melhor durante o preparo das soluções mãe. Uma das possíveis explicações para elas terem apresentado melhores resultados frente a uma bactéria Gram-positiva, é o fato de que drogas que possuem baixa lipossolubilidade não conseguem atravessar a parede celular de micro-organismos Gram-negativos.

A diferença fundamental entre estas moléculas é o fato de que a molécula JR-05 apresenta um -NO₂ ligado na posição 2 do anel benzênico (posição orto), já a molécula JR-08 apresenta o grupamento nitro ligado na posição 4 do anel benzênico (posição para). Porém esta diferença entre as moléculas não veio a interferir nos resultados encontrados para esta bactéria, uma vez que ambas as moléculas atingiram a mesma Concentração Inibitória Mínima.

Moura, no ano de 2016 encontrou um resultado apreciável, fazendo uso da mesma técnica, pela molécula JR-08 frente a *Escherichia coli*, um protótipo de Gram-negativa, o que aliado à CIM determinada nesta pesquisa frente a *Staphylococcus saepidermidis* – ATCC 12228, mostra que esta molécula pode vir a ser bastante promissora no combate a bactérias.

Os resultados observados frente às demais bactérias obtiveram CIM acima de 1024 µg/mL.

A **Figura 14** representa uma placa de Elisa onde testou-se JR-05 e JR-08 frente a *S. epidermidis* ATCC 12228, pode-se observar a atividade das moléculas pela presença da cor azul nos poços com maior concentração da molécula.

Figura 14 - Atividade das Moléculas JR-05 e JR-08 Frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228



Fonte: FARIAS, 2016. Arquivo pessoal do autor

Na **Figura 14** estão representados ainda os controle positivo (amicacina) e negativo (DMSO) realizados, bem como o teste de esterilidade do meio e o de viabilidade do micro-organismo.

5.4 Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N-acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Leveduras

As moléculas dos derivados N-acilidrazônicos foram testadas ainda, através da técnica de microdiluição em caldo sabouraud dextrose, frente a diversas cepas leveduriformes, vide na **Tabela 07** que estão representados os resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM's) atingidos.

Tabela 07: Concentração Inibitória Mínima dos Derivados N-acilidrazônicos Frente às Diferentes Espécies de Leveduras

Leveduras:	JR-05 (µg/mL)	JR-06 (µg/mL)	JR-07 (µg/mL)	JR-08 (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	NR	> 1024	> 1024	> 1024
<i>Candida glabrata</i> – 2001	> 1024	> 1024	> 1024	32
<i>Candida krusei</i>	NR	> 1024	> 1024	> 1024
<i>Candida metapsilosis</i>	> 1024	NR	NR	> 1024
<i>Candida ortopsilosis</i>	256	NR	NR	128
<i>Candida parapsilosis</i>	> 1024	NR	NR	> 1024
<i>Candida tropicalis</i> - ATCC 13803	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024

JR = derivado N-acilidrazônico; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima; **ATCC** = *American Type Culture Collection*; **NR** = Não Realizado, µg/mL = micrograma por mL.

Fonte: FARIAS, 2018.

Na **tabela 07** é possível observar as CIM atingidas pelas moléculas JR-05, JR-06, JR-07 e JR-08 frente às diversas leveduras que foram testadas, é possível se ver que para as leveduras a diferença já citada e existente na estrutura molecular entre as moléculas JR-05 e JR-08 veio a interferir nos resultados encontrados, uma vez que a molécula JR-08 atingiu uma CIM de apenas 32 µg/mL para a espécie *Candida glabrata* – 2001 e de 128 µg/mL para a espécie *Candida ortopsilosis*, enquanto a molécula JR-05 veio a apresentar um resultado acima de 1024 µg/mL para *C. glabrata* e de 256 µg/mL para *C. ortopsilosis*, apresentando assim uma grande diminuição do resultado para a primeira levedura e uma ligeira redução para a segunda.

Os demais resultados encontrados foram todos acima de 1024 µg/mL, as moléculas JR-06 e JR-07 não se mostraram efetivas contra as leveduras testadas.

5.5 Concentração Inibitória Mínima dos Derivados Fenilacrilatos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas Testadas

As moléculas dos derivados Fenilacrilatos também tiveram suas Concentrações Inibitórias Mínimas determinadas frente a diversas cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. As moléculas AL-09 e AL-10 frente utilizadas apenas frente a bacterérias multirresistentes. A **Tabela 08** abaixo respresenta os resultados encontrados

Tabela 08: Concentração Inibitória Mínima dos Derivados Fenilacrilatos Frente às Diferentes Espécies de Bactérias

Bactérias Gram-positivas	AL-01	AL-02	AL-09	AL-10
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU))	512	> 1024	NR	NR
<i>Staphylococcus</i> spp. não <i>S. saprophyticus</i> (Resistente a Novobiocina e isolado de fossas nasais)	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Enterococcus durans/hirae</i> derivada da SS1225/IAL 03/10	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>MRSA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina) do lote Proex 357	NR	NR	> 1024	> 1024
Bactérias Gram-negativas				
<i>Escherichia coli</i> produtora de ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido)	NR	NR	> 1024	> 1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 700603	256	> 1024	NR	NR
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> produtora de ESBL	NR	NR	> 1024	> 1024
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtora	NR	NR	NR	NR

de AmpC

AL = Derivado Fenilacrilato; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima; **ATCC** = *American Type Culture Collection*; **ITU** = Infecção do Trato Urinário; **R**= Resistente; **Nov.**=Novobiocina; **IAL** = Instituto Adolpho Lutz; **NR** = Não Realizado. $\mu\text{g/mL}$ = micrograma por mL.

Fonte: Da Pesquisa

Na **Tabela 08** representada acima, é possível perceber que a única molécula que representou resultados abaixo 1024 $\mu\text{g/mL}$ frente às bactérias testadas foi a AL-01, que veio a apresentar CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus saprophyticus* (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU) e de 256 $\mu\text{g/mL}$ para *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603, sendo uma cepa Gram-positiva de uso clínico e uma cepa Gram-negativa de referência, respectivamente.

A molécula AL-01 foi um dos derivados Fenilacrilatos com menor coeficiente de partição (log P), ou seja, com menor lipofilia, o que favoreceu a dissolução durante o preparo das soluções e que veio a interferir nos resultados encontrados. Quanto à relação estrutura atividade, a molécula AL-01 diferencia-se da molécula AL-02, pela adição de um halogênio (cloro) na posição 4 do anel benzênico nesta segunda, o que pode ter vindo a prejudicar a ligação da molécula AL-02 em receptores específicos nas bactérias testadas e favorecido uma melhor atividade pela molécula AL-01.

Os demais resultados constatados para as moléculas AL-01 e AL-02 foram todos de CIM acima de 1024 $\mu\text{g/mL}$. AL-09 e AL-10 também não obtiveram sucesso perante às bactérias multirresistentes testadas, apresentando CIM acima de 1024 $\mu\text{g/mL}$.

5.6 Concentração Inibitória Mínima dos Derivados Fenilacrilatos Frente às Diferentes Espécies de Leveduras

Os derivados Fenilacrilatos foram, por fim, desafiados perante diversas cepas leveduriformes, a **Tabela 09** a seguir representa os resultados de Concentrações Inibitórias Mínimas determinados:

Tabela 09: Concentração Inibitória Mínima dos Derivados Fenilacrilatos Frente às Diferentes Espécies de Leveduras

Leveduras	AL-01 ($\mu\text{g/mL}$)	AL-02 ($\mu\text{g/mL}$)	AL-09 ($\mu\text{g/mL}$)	AL-10 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i>	NR	> 1024	128	> 1024
<i>Candida glabrata</i> – 2001	32	32	256	> 1024
<i>Candida krusei</i>	NR	> 1024	512	> 1024

<i>Candida metapsilosis</i>	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Candida ortopsilosis</i>	> 1024	> 1024	NR	NR
<i>Candida parapsilosis</i>	128	> 1024	NR	NR
<i>Candida tropicalis</i> - ATCC 13803	128	> 1024	128	> 1024

⁻**AL** = Derivado Fenilacrilato; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima; **ATCC** = *American Type Culture Collection*. **NR** = Não Realizado. **µg/mL** = micrograma por mL.

Fonte: FARIAS, 2018

Como é possível se observar na **Tabela 09**, a molécula AL-01 também obteve sucesso frente às leveduras utilizadas, provavelmente devido à mesma explicação dada para as bactérias, AL-01 alcançou CIM de apenas 32 µg/mL para a levedura *Candida glabrata*, mesma CIM atingida pela molécula AL- 02, neste caso a adição de um cloro ao anel benzênico não veio a influenciar na atividade obtida.

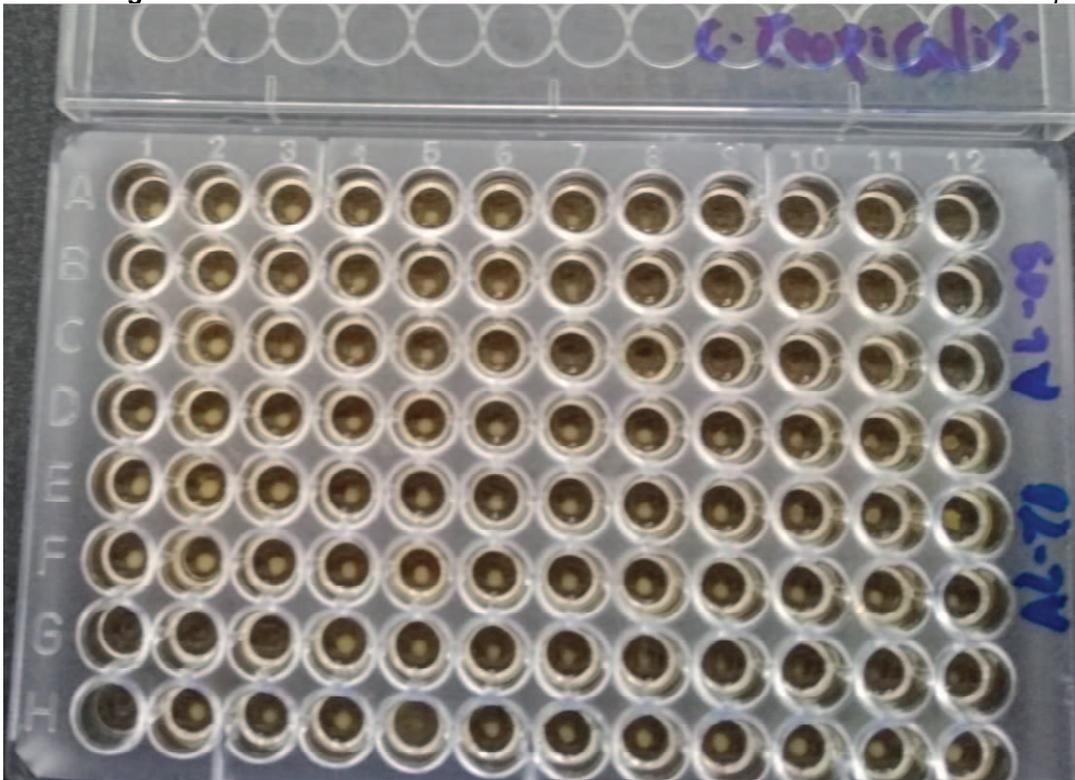
A molécula AL-01 determinou ainda, CIM de 128 µg/mL frente às leveduras *Candida parapsiloses* e 128 µg/mL perante *Candida tropicalis* -ATCC 13803, mesma CIM representada pela molécula AL-09, que apresenta, em sua molécula, 2 halogênios (cloros) estrategicamente ligados ao anel benzênico nas posições 2 e 6 (orto, orto), diferentemente da molécula AL-10, que estes estão ligados nas posições 2 e 4 (orto, para) , e que, por isto, veio a apresentar uma CIM > 1024 µg/mL. Esta atividade alcançada pelas moléculas AL-01 e AL-09 perante *C. tropicalis* se mostra bastante impotente, uma vez que esta apresenta resistência intrínseca ao antifúngico utilizado como controle positivo, o fluconazol, e veio a apresentar CIM acima de 1024 µg/mL para este.

A molécula AL-09 veio a alcançar resultado de CIM satisfatório ainda, diante de *C. glabrata* - 2001, de apenas 256 µg/mL. E uma CIM mais baixa perante *C. krusei*, de 512 µg/mL. Pereira, no ano de 2016, também encontrou um resultado de CIM bastante importante para a molécula AL-09, frente a *Staphylococcus aureus*, um protótipo de bactéria Gram-positiva, de apenas 16 µg/mL. O que mostra o quanto esta molécula pode vir a ser promissora no combate a diversas leveduras.

Os demais resultados determinados pelas moléculas AL-01, AL-02, AL-09 e AL-10 para as leveduras testadas, resultaram em CIM acima de 1024 µg/mL.

Na **Figura 15** a seguir, estar representada a atividade das moléculas AL-09 e AL-10 frente à levedura *Candida tropicalis*.

Figura 15 - Atividade da Molécula AL-09 Frente à Levedura *Candida tropicalis*



Fonte: FARIAS, 2018.

É importante citar que os derivados Fenilacrilatos podem atuar como excelentes ligantes por apresentarem um perfil de aceptores/doadores de Michael, principalmente em biomoléculas nucleofílicas/ eletrofílicas. (EKICI et. a., 2006), podendo interagir com proteínas de caráter oposto.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa que foi realizada obteve sucesso. Para os derivados N-acilidrazônicos ensaiados frente a várias cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as moléculas JR-05 e JR-08 testados frente a *Staphylococcus epidermidis* – ATCC 12228 demonstraram CIM de 128 µg/mL.

Já entre os testes realizados perante às diversas cepas leveduriformes, a molécula JR-08 atingiu uma CIM de apenas 32 µg/mL para a espécie *Candida glabrata* – 2001 e de 128 µg/mL para a espécie *Candida ortopsilosis*, enquanto a molécula JR-05 veio a apresentar um resultado de 256 µg/mL para *C. ortopsilosis*.

Para os derivados Fenilacrilatos por sua vez, desafiados diante de diversas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, através do método de microdiluição em caldo, a molécula AL-01 veio a apresentar CIM de 512 µg/mL para *Staphylococcus saprophyticus* (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU) e de 256 µg/mL para *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603.

Entre as leveduras testadas, AL-01 alcançou CIM de apenas 32 µg/mL para a levedura *Candida glabrata*, mesma CIM atingida pela molécula AL-02. A molécula AL-01 determinou ainda, CIM de 128 µg/mL frente às leveduras *Candida parapsiloses* e 128 µg/mL perante *Candida tropicalis* -ATCC 13803, mesma CIM representada pela molécula AL-09, que veio a alcançar resultado de CIM satisfatório ainda diante de *C. glabrata* - 2001, de apenas 256 µg/mL. E uma CIM mais baixa perante *C. krusei*, de 512 µg/mL.

Os demais ensaios realizados resultaram todos em CIM acima de 1024 µg/mL. É importante citar que foi encontrada dificuldade na dissolução total das moléculas em DMSO durante o preparo das soluções mãe, o que representa que os resultados encontrados poderiam ter sido ainda melhores.

Desta forma, sugere-se a realização de outros testes, como os testes de triagem de difusão em disco, em cilindro de aço inoxidável ou em vidro e de perfuração em ágar, a fim de se observar as CIM's encontradas. Sugere-se ainda, a avaliação da Concentração Fungicida e Bactericida Mínima, a associação das melhores moléculas com antimicrobianos utilizados clinicamente e a realização dos testes de toxicidade e a busca pela elucidação dos mecanismos de ação destas moléculas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **O Diálogo entre a Saúde e o Direito: A Propaganda de Medicamentos**. Seminário realizado em Curitiba, 2006. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33864/284972/O_Dialogo_entre_a_Saude_05_11.pdf/b35bc9e-3f55-4232-a736-0aae1a99a38e Acesso em 20 de Agosto de 2017.

ALVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet and CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** [online]. 2007, vol.43, n.5, pp.319-327. ISSN 16762444. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442007000500004>.

Alves, E. G., Vinholis, A. H. C., Casemiro, L. A., Furtado, N. A. J. C., Silva, M. L. A. E., Cunha, W. R., e Martins, C. H. G. (2008) Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras, **Química Nova** 31, 1224-1229.

ANTONIO, Nayara da Silva. et al. Mecanismos de Resistência Bacteriana **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, Sp, p.1-4, jan. 2009. Semestral. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/UuBDHbHjev9rGKV_2013-6-21-11-52-49.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2017.

ARTHINGTON, BA; REX, JH. **Resistance to Antifungal Agents**. In: Fong IW, Drlica K. Antimicrobial resistance and implications for the 21th century. Springer. 2008.

AYRES, MCC, et al. 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev Bras Farmacogn** 18: 90-97.

BAIL, Larissa, ESMERINO, Luís Antônio. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. **Revista brasileira de Análises Clínicas**. 34(1): 51-56, 2006.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 42f. monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.

BASSETTI, M, TEMPERONI, C, ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12 (22): 1-15.

Lima, L. M. & Barreiro, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* 12, 23–49 (2005).

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: **ArtMed**, 3 ed., 2015. p. 171-223, 347-401, 407-442, 231-252.

BARREIRO, E. J., e FRAGA, C. A. M. (2008). In Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos. 2ed. **ArtMed**, Porto Alegre, p.19-70.

BARREIRO, E. J., e FRAGA, C. A. M. Química Medicinal as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: **Artmed** Editora, 2008. p. 271-341.

BEER, B., CHASIN, M., CLODY, D. E., e VOGEL, J. R. (1972) Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in brain: effect on anxiety. *Science* (New York, N.Y.) 176: 428-430.

BLAIR, J. M. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature*, v. 13, p. 42- 51, 2015.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Rev. Clin Microbiol.* v.14, n.4, p.933-951, 2001.

BRAOIOS, Alexandre et al. **Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Dez 2009, vol.45, no.6, p.449-456. ISSN 1676-2444

BrCAST. **Tabelas de ponto de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos;** Norma aprovada. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos, versão válida a partir de 13-03-2017. Documento baseado no EUCAST. 2017.

BRITO, M. A., CORDEIRO, B. C. Necessidade de Novos Antibióticos. *Jornal Brasileiro de Patologia Med Lab*, v. 48, n. 4, p. 247-249, 2012.

CACHIBA, Thomas Haruo. et al. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilidrazônicos. *Química nova*, v.35, n. 8,p; 1566-1669,2012.

CARVALHO, AAT, et al. 2002. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farm Bonaerense**. 21: 255-258.

CASSENEGO, A.P.V. **Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de Enterococcus sp. Isolados de “swabb” cloacais de frango de corte**. 2010. 89 p.

CAVACANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FILHO, J. R. F. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química** 26, 319-329. 2015.

CHANDRASEKARAN, M, VENKATESALU, V. 2004. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **J Ethnopharmacol**. 91: 105-108.

CHANG RL, et al. Strategies to minimize antibiotic resistance. Int. J. Environ. **Res Public Health** 2013; 10 (9): 4274-305.

CHATTOTADHWAY, D, et al. 2002. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **J Ethnopharmacol** 82: 229-237.

COSTA, A. L. P. et al. Analise qualitativa fitoquímica e do potencial antimicrobiano do extrato bruto de casca de bertholletia excelsa humb. & bomphe (lecytidaceae) frente a microrganismos gram-positivos. **Ciência Equatorial**, v.22, p. 26-34, 2012.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015 (CLSI publication M100-S25).

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COSTA, T. S., Ornelas, D. L., Guimarães, P. I. C., & Merçon, F. Confirmando a Esterificação de Fischer por Meios de Aromas. **Química Nova na Escola**, 19(1), 36---38. 2004.

COSTA, A.L.P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequencias e Estratégias De Contenção**. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

COSTA, ALP; JUNIOR, ACSS. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**. Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, maio/ago. 2017.

COSTA, Rayane Gomes de Queiroga. **Incidência de Klebsiella spp. , resistotipagem e atividade antimicrobiana em isolados hospitalares**. 2015. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia Generalista) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

CHUDZIK, B, et al. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **J Eur Biophys** . 2015;44(1-2):77-90.

DELUCIA, Roberto. et al. **Farmacologia integrada**. 701 p. 3. Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

EMANEINI, M. et. al. Characterization of Glycopeptides, Aminoglycosedies and Macrolide resistance among. *Enterococcus faecalis e Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. **Polish Jornal of Microbiology**, v-57, n.2, 2008.

DESIMONI, M.C., ESQUIVEL, G.P., MERINO, L.A. Fecal colonization by extendedspectrum betalactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. **Enferm Infec Microbiol Clin**. v.22, n.9, p.507-11, 2004.

DIGNAMI, MC, et al. **Clinical Mycology**. 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 2009.

DZIDIC, S; SUSKOVIC, J; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**. v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.

EKICI, OD, et al. 2006. Design, synthesis, and evaluation of aza-peptide Michael acceptors as selective and potent inhibitors of caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9, and -10. **J Med Chem** 49: 5728–5749 [[PubMed](#)]

El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 2015;4(1):14-21.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? **Nat. Biotechnol.** 24, 1497-1503. 2007.

FERRACINI, F.T.; FILHO, W.M.B.; ALMEIDA, S.M. Atenção à Prescrição Médica, 1.ed. São Paulo, **Atheneu**, 2014.

FERREIRA, R.S; GLAUCIUS, O; ANDRICOPULO, A.D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: Oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, V.34, p.1770-1778, 2011.

Fischer, J. G.; Ganellin, C. R.; **Analoguebased Drug Discovery**, Wiley-VCH: Germany, 2006. [CrossRef]

GALMEAS, et al. A Simplified Method for Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells with -80dGC Mechanical Freezer with Dimethyl Sulfoxide as the Sole Cryoprotectant. Journal Leukemia & Lymphoma, vol. 17, pag 1-2, 1995.

GILMORE, Michael S. et al. The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antimicrobial Resistance. **Internacional Journal of Medical Microbiology**. Jena, vol. 292, ed. 7/8, pag 262, fevereiro de 2003.

GOLL, Aline de Souza; FARIA, Maria Graciela Iecher. Resistência Bacteriana Como Consequência Do Uso Inadequado De Antibióticos. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research - Bjsr**. Parque Industrial. Maringá, Paraná, p. 69-72. 07 nov. 2013. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/periodico/20131130_150425.pdf>. Acesso em: 31 jul.2018.

GOODMAN & GILMAN. BRUNTON, Laurence L; CHABNER Bruce A; KNOLLMAN, Bjorn C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. L. Editora McGraw-Hill, **Artmed**, 12^a edição, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667- 679, 2010.

GUSTAVO. B. L. **Análise de portadores assintomáticos de staphylococcus aureus no hospital universitário de Brasília**. 2008. 102f. Monografia (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília.

HANSCH, C.; LEO, A. Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology. Washington: **American Chemical Society**, 1995. 557 p.

HIRZEL, W.. Implicancias del *Staphylococcus saprophyticus* en la patología infecciosa urinaria de la mujer. **Acta bioquím. clín. latinoam.** [online]. 2004, vol.38, n.2.

HRANJEC, M.; GRDISA, M.; PAVELIC, K.; BOYKIN, D.M.; KARMINSKI-ZAMOLA. **Synthesis and antitumor evaluation of some substituted amidino-benzimidazolyl-furyl-phenyl-acrylates and naphtho [2,1-b] furan-carboxylates.** *Il Farmaco* 58, 131319-1324. 2003.

JOÃO LOUREIRO, Rui. et al. O uso de antibióticos e a resistência bacteriana: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, Ceará, v. 34, p.77-84, jan./abr. 2016. Quadrimestral. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S087090251500067X>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

KADOSAKI, L. L, SOUSA, S. F., BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012.

KARAMAN et al. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J Ethnopharmacol.** 85: 231-235.

KOTHAVADE, Rajendra J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Jornal of Medical Microbioly** 59: 873-880, agosto de 2010.

KUMAR, S., VARELA, M. F. Molecular Mechanisms of bacterial Resistance to antimicrobial Agents. Microbial Pathogens and strategies for Combating Them: Science, technology and education, **Formatex**, p. 522- 534 2013.

LEWIS Russell E. **Current Concepts in Antifungal Pharmacology.** Mayo Clin Proc 86: 805-817, 2011.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 12 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010, 1160 p.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 14. Ed. Porto Alegre: **Artmed**, 1160 p.2016

MALIK, Maqsood Ahmad. Et al. Synthesis, Structure Optimization and Antifungal Screening of Novel Tetrazole Ring Bearing Acyl-Hidrazones. **International Journal of Molecular Sciences**. v.13, p. 10880-10898. 2012.

MARCH, J. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure**. 4^a ed. New York: Wiley-Interscience publication, 1992.

MARTINEZ, J., et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella. **Int Microbiol**. v.7, n.4, p.261-8, 2004.

MOODY, JO, et al. 2004. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu) **J Ethnopharmacol**. 92: 57-60.

MONTANARI, C. A. Química Medicinal: Contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n.1, p.566-4, 1995.

MOURA, Willian Charles da Silva. **Planejamento, Síntese e Avaliação Preliminar da Atividade Antibacteriana de Derivados N-Acilidrazônicos Substituídos**. 2016. 58 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia Generalista) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprobada – Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NICOLAOU, K. C.; Montagnon, T.; **Molecules that Changed the World**, Wiley-VCH: Weinheim, 2008, cap. 13.

Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 58: 77-82, 2007.

NUCCI, M, et al. **Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America**. **Clin Infect Dis**. 2010;51(5):561-70.

ODDS, FC, et al. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**. 2003;11(6):272-9.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do Cuidar em Saúde Frente à Resistência Bacteriana: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, n. 10, v. 1, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA, Geraldo A. et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 22, n. 7, p. 443-448, janeiro de 2015.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3. ed. São Paulo: **Sarvier**, 2010. 530 p.

Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., e Freitas, B. R. (2008) **Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais** 18, 301-307.

PATRICK, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16; Patrick, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford University Press: New York, 1995, cap. 10.

PEDROSO, Maíra Tatiane Rodrigues; BATISTA, Maria Angélica de Toledo. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência bacteriana**. 2013. 25 p. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia, Faculdade de Pindamonhangaba-SP, Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.funvicpinda.org.br:8080/jspui/bitstream/123456789/209/1/PedrosoBatista.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

PEREIRA, Denise Nascimento. **Avaliação Preliminar Da Atividade Antibacteriana De Derivados Fenilacrilatos Substituídos**. 2016. 59 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia Generalista)- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB.

PFALLER MA, DIEKEMAN DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Rev. Clin Microbiol** . 2007; 20(1):133-63.

PINTO TJA, Kaneko TM, Ohara MT 2003. **Controle Bóxico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.

PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, n.11, p.589-603, 1998.

PROJAN, S.J.; SHLAES, D.M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clin. Microbiol. Infec.** 10 Suppl 4:18-22. Nov. de 2004.

RANG, HP; DALE MM, RITTER JM, GADNER P. In: Fármacos Antifúngicos. Farmacologia. **Elsevier**, 7^a ed. 2011.

REIS, R. C. N. **Síntese de surfactantes Derivados da D-ribolactona**. 2007. Dissertação de mestrado em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG.

REZENDE, P.; MASUNARI, A.; SANTOS, M. G. B.; MAMIZUKA, E. M.; VESSONI-PENNA, T. C.; TAVARES, L. C. **Hansch Analysis of nifuroxazide analogues with antimicrobial activity against MRSA Barcelona, Drugs Fut.**, v. 27, p. 192-192. (Symposium on Medicinal Chemistry, 17. 2002).

RODRIGUES, CF, et al. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2014;33(5):673-88 doi: 10.1007/s10096-013-2009-3

ROSSI, Flavia; ANDREAZZI, Denise B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ROSSI, Tatiane de et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Revista Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, jan/jun. 2011.

SANTOS, Jander Cainã da Silva. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados N-acilidrazônicos**. 2012. 59 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa-PB.

SANTOS, N. Q. A. Resistência Bacteriana no Contexto da Infecção Hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Especial, p. 64-70, 2004.

SANTOS, J. C. S. 2012. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados N-acilidrazônicos. 59 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa-PB, 2012.

SCHNEIDER, T. et al. The Lipopeptide Antibiotic Friulimicin B Inhibits Cell Wall Biosynthesis through Complex Formation with Bactoprenol Phosphate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1610-1618, 2009.

SILVA. Penildo. **Farmacologia**. Editora Guanabara Koogan S/A Rio de Janeiro 8^a Ed. 2010.

SIQUEIRA, C. M. M. Resistência aos Antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. **Resista de la Organización de Farmacéuticos Iberoamericanos**, v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.

SPANU, T., et al. Italian ESBL Study Group. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrob Agents Chemother** . v.46, n.1, p.196-202, 2002.

SPRINGFIELD, et al. 2003. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**. 10: 434-439.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p. 281-301, 2000.

THOMPSON, GR, et al. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. **Antimicrob Agents Chemother**. 2008;52(10): 3783-5.

TORTORA GI, FUNKE BR, CASE AL. Princípio de doença e epidemiologia. In: Microbiologia. 8º ed. Porto Alegre; **Artmed**; 2005; 408-433.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. *Microbiologia*. 10. ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2010.

TIETZE, L. F.; BEIFUSS, U. In Comprehensive Organic Synthesis. **Pergamon Press.**, v. 2, p. 341-392, 1991.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUN, Flávio. Microbiologia 5ª ed. [S.l.]: **Atheneu**. ISBN 9788573799811

VELOSO, C. O.; PINTO, A. C.; SANTOS, E. N.; MONTEIRO, J. L. F.; **Stud. Surf. Sci. Catal**. 2001, 135, 146.

WANNMACHER L, **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? Uso Racional de Medicamentos**. 2004; 1(4) s/p

WEITKAMP, J.; HUNGER, M.; RYMSA, U. **Microporous Mesoporous Mater.** 2001, 48, 255.

WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypothesis. C. 6, 125-143p. In: WERMUTH, C. G., **Ed The practice of medicinal chemistry** (2008), 2 ed. London: *Academic Press*. P. 67-91.

WHO - World Health Organization. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana.** Opções de ação. 2012.

WOLFS, MS. et al. **To err is human: patient misinterpretations of prescription drug label instructions.** *Patient Educ. Couns.*, 67(3): 293-300, agosto de 2007.