

Instituto Politécnico do Porto

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Cátia Verónica Azevedo Pinheiro

Bioatividade da Quinoxalina 1,4-dióxido e seus derivados

Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde

Vila Nova de Gaia, Setembro de 2012

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE
DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Cátia Verónica Azevedo Pinheiro

Bioatividade da Quinoxalina 1,4-dióxido e seus derivados

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Rúben Fernandes, da área científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas.

S e t e m b r o , 2 0 1 2

Agradecimentos

A realização deste estudo marca o fim de uma etapa na minha vida que acredito ser impulsionadora de muitas outras. Antes de mais, quero deixar um agradecimento especial a todos aqueles que sempre me acompanharam e que estiveram envolvidos nesta etapa:

À Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto, mais concretamente à área das Ciências Químicas e das Biomoléculas, pelo acolhimento e apoio na execução do projeto;

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, por ser um exemplo a seguir na conquista dos seus objetivos, pela sua simpatia, incentivo e motivação;

Ao orientador, Professor Doutor Rúben Fernandes, por toda a disponibilidade, atenção prestada, partilha de conhecimento e sobretudo por me motivar a fazer sempre mais e melhor;

À co-orientadora, Professora Doutora Mónica Vieira, pela competência científica, disponibilidade, atenção prestada sempre que solicitei ajuda e pela partilha de conhecimentos;

Ao Professor Doutor Pedro Coelho, incansável na ajuda laboratorial, estando pacientemente disponível para esclarecer dúvidas;

Aos meus colegas de mestrado, principalmente aos que me acompanharam no laboratório, pela cooperação, companheirismo, partilha de conhecimento em áreas tão diversas e sobretudo pela boa disposição. A vossa presença animou bastante os dias de trabalho!

Às funcionárias da ESTSP, nomeadamente à D. Graça e D. Elisabete pelo excelente trabalho que desempenham, pois sem esta ajuda os ensaios laboratoriais estariam dificultados;

À minha família, em particular aos meus pais e avós, cuja importância na minha vida nunca poderá ser descrita na totalidade. Contudo, quero agradecer pelo apoio incondicional, paciência, por serem incansáveis na ajuda em todos os aspetos, por me escutarem e aconselharem...

À minha “mana”, pela amizade, pelos seus sorrisos e sucessos que tanto alegram a minha vida;

Ao meu namorado, por também ser um amigo, pela confiança e pela valorização do meu trabalho de forma tão entusiasta.

Aos meus amigos de longa data, que sempre estiveram presentes para me ouvir e dar força para seguir em frente, apesar das distâncias.

Resumo

O objetivo deste estudo consiste em avaliar a atividade antimicrobiana da quinoxalina 1,4-dióxido e alguns dos seus derivados em estirpes bacterianas e leveduras. Os compostos estudados foram a quinoxalina 1,4-dióxido (QNX), 2-metilquinoxalina-1,4-dióxido (2MQNX), 2-metil-3-Benzoilquinoxalina-1,4-dióxido (2M3BenzoilQNX), 2-metil-3-benzilquinoxalina-1,4-dióxido (2M3BQNX), 2-amino-3-cianoquinoxalina-1,4-dióxido (2A3CQNX), 3-metil-2-quinoxalinacarboxamida-1,4-dióxido (3M2QNXC), 2-hidroxifenazina-*N*-dióxido (2HF) e 3-metil-*N*-(2-metilphenil)quinoxalinacarboxamida-1,4-dioxido (3MN(2MF)QNXC). Os modelos procariontes selecionados para este estudo foram o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* S3R9, *Escherichia coli* S3R22, *Escherichia coli* TEM CTX-M9, *Escherichia coli* TEM-1, *Escherichia coli* AmpC MOX-2, *Escherichia coli* CTX-M2 e *Escherichia coli* CTX-M9. A *Candida albicans* ATCC 10231 e a *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 constituíram os modelos eucariotas deste estudo.

Para os compostos químicos que apresentem atividade pelo método de difusão em disco, será determinada a Concentração Mínima Inibitória (CMI), bem como a viabilidade e o crescimento (na presença e na ausência dos compostos químicos).

Os resultados deste estudo mostram atividade antimicrobiana para a maioria dos compostos estudados em todos os modelos procariontes Gram negativos, à exceção da *E.coli* CTX-M2 e CTX-M9 e nenhuma atividade nos modelos eucariotas.

O estudo da viabilidade/curvas de morte em bactérias e num modelo eucariota (*S.cerevisiae*) sugerem que alguns destes compostos constituem potenciais drogas para a quimioterapia antibacteriana.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, quinoxalinas *N,N*-dióxido, métodos de suscetibilidade antimicrobiana, viabilidade/curvas de morte.

Abstract

The present work reports the study of the antimicrobial activity of quinoxaline *N,N*-dioxide and some derivatives against bacterial and yeast strains. The compounds studied were quinoxaline-1,4-dioxide (QNX), 2-methylquinoxaline -1,4-dioxide (2MQNX), 2-methyl-3-benzoylquinoxaline-1,4-dioxide (2M3BenzoilQNX), 2-methyl-3-benzylquinoxaline-1,4-dioxide (2M3BQNX), 2-amino-3-cyanoquinoxaline-1,4-dioxide (2A3CQNX), 3-methyl-2-quinoxalinecarboxamide-1,4-dioxide (3M2QNXC), 2-hydroxyphenazine-*N*-dioxide (2HF) and 3-methyl-*N*-(2-methylphenyl)quinoxalinecarboxamide-1,4-dioxide (3MN(2MF)QNXC). The prokaryotic model used were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* S3R9, *Escherichia coli* S3R22, *Escherichia coli* TEM CTX-M9, *Escherichia coli* TEM-1, *Escherichia coli* AmpC MOX-2, *Escherichia coli* CTX-M2 e *Escherichia coli* CTX-M9. The *Candida albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 were used as eukaryotic model.

For the compounds that present activity for disk diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC) was determined, as well as verified the viability and growth curves (present and absence of chemical compounds).

The results show antimicrobial activity for some compounds in every prokaryotic model Gram negative, with exception of *Escherichia coli* CTX-M2 and *Escherichia coli* CTX-M9 and no inhibition for eukaryotic models.

The study of viability/growth curves in bacterial and *S.cerevisiae* suggest that some compounds are potential new drugs for antibacterial chemotherapy.

Keywords: Antimicrobial activity, quinoxaline *N,N*-dioxide, antimicrobial susceptibility methods, viability/ Growth curves.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice de abreviaturas	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Índice de Gráficos	xix
1.Introdução	1
2.Revisão Bibliográfica	3
2.1 Antimicrobianos.....	3
2.1.1 Descoberta e evolução dos Antibióticos.....	3
2.1.2 Classificação dos antibióticos	4
2.2 Resistência aos antimicrobianos	14
2.2.1 Origem da resistência	15
2.2.2 Pressão seletiva	15
2.2.3 Propagação da resistência bacteriana.....	16
2.2.4 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos	19
2.3 Combate à resistência aos antimicrobianos	20
2.4 Consumo/Resistência aos antimicrobianos em Portugal	21
2.5 Compostos derivados das quinoxalinas <i>N,N</i> -dióxido	24
2.6 Patogénios	26
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.6.1.1 Organização do Genoma.....	28

2.6.1.2 Mecanismos de Resistência aos β -lactâmicos.....	29
2.6.1.3 Mecanismo de Resistência aos glucopeptidos.....	32
2.6.1.4 Mecanismo de Resistência às fluoroquinolonas.....	36
2.6.2 <i>Escherichia coli</i>	36
2.6.2.1 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos.....	36
2.6.2.2 Mecanismos de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas.....	40
2.7 Resistência combinada.....	41
2.8 Leveduras.....	42
2.8.1 <i>Candida</i> spp.....	42
2.8.2 <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	44
Objetivos.....	49
CAPÍTULO 2.....	53
2.Material e Métodos.....	53
2.1 Material.....	53
2.1.1 Quinoxalina <i>N,N</i> - dióxido e seus derivados.....	53
2.1.2 Estirpes microbianas.....	54
2.1.3 Meios de cultura.....	55
2.1.4 Outros reagentes e equipamentos.....	56
2.2 Métodos.....	57
2.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	57
2.2.2 Curvas de morte e viabilidade microbiana.....	59
2.2.3 Curvas de crescimento num modelo eucariota não humano.....	60
CAPÍTULO 3.....	61
3. Bioatividade de compostos derivados da QNX 1,4-dióxido.....	65
3.1 Atividade antimicrobiana do composto QNX.....	65
3.1.1 Método de difusão em disco.....	65
3.1.2 Método de Microdiluição.....	68

3.2 Curvas de morte <i>versus</i> viabilidade microbiana	68
CAPÍTULO 4.....	71
4. Bioatividade do composto 2MQNX	73
4.1 Atividade antimicrobiana do composto 2MQNX	73
4.1.1 Método de difusão em disco	73
4.1.2 Microdiluição.....	74
4.2 Curvas de morte <i>versus</i> viabilidade microbiana	74
CAPÍTULO 5.....	71
5. Bioatividade do composto 2M3BenzoilQNX.....	79
5.1 Atividade antimicrobiana do composto 2M3BenzoilQNX.....	79
CAPÍTULO 6.....	81
6. Bioatividade de composto 2M3BQNX.....	83
6.1 Atividade antimicrobiana do composto 2M3BQNX	83
CAPÍTULO 7.....	85
7. Bioatividade do composto 2A3CQNX	87
7.1 Atividade antimicrobiana do composto 2A3CQNX	87
7.1.1 Método de difusão em disco	87
7.1.2 Método de Microdiluição	90
7.2 Curva de morte <i>versus</i> viabilidade celular	92
CAPÍTULO 8.....	97
8. Bioatividade do composto 3M2QNXC	99
8.1 Atividade antimicrobiana do composto 3M2QNXC	99
8.1.1 Método de difusão em disco	99
8.1.2 Método de Microdiluição	105
8.2 Curva de morte <i>versus</i> viabilidade celular	107
CAPÍTULO 9.....	115
9. Bioatividade do composto 2HF	117

9.1 Atividade antimicrobiana do composto 2HF	117
9.1.1 Método de difusão em disco	117
9.1.2 Método de Microdiluição	118
9.2 Curva de morte versus viabilidade celular	118
CAPÍTULO 10.....	115
10. Bioatividade do composto 3MN(2MF)QNXC	123
10.1 Atividade antimicrobiana do composto 3MN(2MF)QNXC	123
CAPÍTULO 11.....	121
11. Curva de crescimento para um Modelo Eucariota.....	127
Conclusão	135
Perspetivas futuras	139
Bibliografia	142

Índice de abreviaturas

6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico
attB _{sc}	SCC _{mec} attachment site
CDR1 e 2	<i>Candida Drug Resistance 1 e 2</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CTX	Cefotaximase
CIQ	Centro de Investigação em Química
D-Ala-D-Ala	D-Alanina-D-Alanina
D-Ala-D-Lact	D-Alanina-D-Lactato
EARSS	<i>European Antimicrobial Resistance Surveillance System</i>
ECDC	<i>European Centre for Diseases Prevention and Control</i>
EGM	Elementos Genéticos Móveis
ESBL	β-lactamases de espectro estendido
ESAC	<i>European Surveillance of Antimicrobial Consumption</i>
EASSA	<i>European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCUP	Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GISA	<i>Glycopeptide-intermediate S. aureus</i>
hVISA	hétero-VISA
HVR	Região Hipervariável
IACS	Infeções Adquiridas em Cuidados de Saúde

INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ITU	Infeções do Trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LNR-AR	Laboratório de Referência Nacional–Resistência aos antimicrobianos
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MRSA	<i>S. aureus</i> meticilina resistentes
MRSA – AC	<i>S. aureus</i> meticilina resistentes associados à comunidade
MRSA – AH	<i>S. aureus</i> meticilina resistentes associados ao hospital
NaCl	Cloreto de Sódio
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
NDM	<i>New Delhi Metallo-β-lactamase</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilinase
<i>orfX</i>	<i>Open Reading Frame X</i>
PBP	<i>Penicilin Binding Protein</i>
SCC <i>mec</i>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SHV	<i>Sulphydryl Variable</i>
TEM	Temoneira
TEST	<i>Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial</i>
TSA	Trypticase Soy Agar

TSB	<i>Tryptone Soy Broth</i>
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VISA	<i>Vancomycin Intermediate S. aureus</i>
VRE	<i>Vancomycin resistant Enterococcus spp.</i>
VRSA	<i>Vancomycin resistance S. aureus</i>
VSSA	<i>Vancomycin sensitive S. aureus</i>
YEPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química do anel β -lactâmico. **Fonte:** Compendium of Chemical Terminology, GOLD BOOK of *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), versão 2.3.2, 19-09-2012.

Figura 2. Estrutura química básica dos β -lactâmicos. 1- Penamo (penicilinas), 2 - Penemo, 3 - Carbapenemo -, 4 - Cefem, 5 - Monobactamo e 6 - Clavam. (R- Cadeia lateral) **Fonte:** IUPAC e <http://www.chem.ox.ac.uk/oc/cjschofield/biosynthesis.htm> (Último acesso a 14-09-2012)

Figura 3. Estrutura química geral da penicilina (penamo) e alguns exemplos de antibióticos derivados desta, nomeadamente a Benzilpenicilina (ou penicilina G), ampicilina e amoxicilina. **Fonte:** Antunez *et al*, 2005.

Figura 4. Estrutura química geral de um antibiótico cefem (à esquerda) e, estrutura da cefalosporina C (à direita). As cefalosporinas análogas desta diferem apenas no grupo que se encontra na cadeia lateral R1. **Fonte:** Oliveira *et al*, 2009.

Figura 5. Atividade antimicrobiana da cefalosporina de quinta geração (Ceftarolin). **Fonte:** Laudano, 2011.

Figura 6. Comparação da estrutura química das cefalosporinas (à esquerda) com as cefamicinas (à direita). Verifica-se a substituição de um hidrogénio na posição 7 do anel bicíclico, por um grupo metoxi. **Fonte:** Oliveira *et al*, 2009.

Figura 7. Estrutura química do ácido clavulânico. **Fonte:** Oliveira *et al*, 2009.

Figura 8. Locais de ação (à direita) e mecanismos de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos. **Fonte:** Mulvey & Simor, 2009.

Figura 9. Efeito da pressão seletiva nas bactérias. População bacteriana sensível na presença de bactérias com resistência a determinado antibiótico (à esquerda); Na presença do antibiótico, as bactérias sensíveis são destruídas e as resistentes sobrevivem (ao centro); As bactérias resistentes proliferam podendo causar nova infeção. **Fonte:** (Mulvey & Simor, 2009)

Figura 10. Transferência genética horizontal e vertical. **Fonte:** Malachova & DeLeo, 2010.

Figura 11. Uso dos antimicrobianos em Portugal no ano 2008 em ambulatório, expressos em DDD (*Defined Daily Dose*)/1000 habitantes por dia. **Fonte:** *European Surveillance of antimicrobial Consumption* (ESAC) em http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50280 (Último acesso a 14-09-2012).

Figura 12. Proporção de estirpes MRSA em 2008. Para os países que não reportaram dados ou reportaram menos de 10 isolados não são apresentados dados. **Fonte:** *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), 2008.

Figura 13. Proporção de isolados de *E.coli* resistentes à fluoroquinolonas em 2008. Para os países que não reportaram dados ou reportaram menos de 10 isolados não são apresentados dados. **Fonte:** *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), 2008.

Figura 14. Estrutura química geral 2D e 3D da quinoxalina. **Fonte:** <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7045> (Último acesso a 14-09-2012).

Figura 15. Estrutura química geral das quinoxalinas 1,4-dióxido. **Fonte:** Carta *et al*, 2002.

Figura 16. Comparação das características das estirpes MRSA-AC e MRSA-AH. **Fonte:** Nastaly & Grinholc, 2010.

Figura 17. Classes estruturais do complexo *mec*. As setas indicam a direção da transcrição e à esquerda é apresentada a designação da Classe. **Fonte:** Plata *et al*, 2009.

Figura 18. Classificação dos genes *ccr*. **Fonte:** *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome* (2009).

Figura 19. Regulação da resistência aos glucopéptidos. **Fonte:** McCallum *et al*, 2010.

Figura 20. Esquemas de classificação de β -lactamases, onde se incluem a classificação funcional e molecular. **Adaptado:** (Bush *et al*, 1995)

Figura 21. Fenótipos de resistência mais comuns encontrados em estirpes de *E.coli* no estudo do EARSS (2008) que envolveu 33 países. Fonte: *European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)*, 2008.

Figura 22. Mecanismos de resistência adquirida em espécies de *Candida*. **Fonte:** Lewis *et al*, 2012.

Figura 23. A figura mostra um exemplo de um resultado obtido para *S.cerevisiae* na presença da QNX aos 0, 30, 60 e 90 minutos, que permitiu efetuar a contagem de colónias para construção do gráfico UFC/mL *versus* Tempo.

Índice de Tabelas

Tabela 1. Número de isolados de *E.coli* e *S. aureus* Sensíveis (S), Intermédias (I) e Resistentes (R) a alguns grupos antimicrobianos em Portugal em 2010 e 2011. **Adaptado** de *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) em http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/graph_reports.aspx (Último acesso a 22-01-2013).

Tabela 2. CMI de vancomicina ($\mu\text{g/mL}$) para definir estirpes de *S.aureus* como sensíveis, intermédias ou resistentes ao antimicrobiano. Comparação entre valores antigos e os atuais. **Adaptado:** Fry & Barie, 2010.

Tabela 3. Estrutura química da quinoxalina 1,4-dióxido e seus derivados.

Tabela 4. Modelos procariontes e eucariontes selecionados para avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos.

Tabela 5. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E.coli* TEM-1 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Tabela 6. Classificação das estirpes em resistente, intermédia ou sensível, de acordo com os valores dos diâmetros dos halos documentados pelo CLSI para enterobactérias.

Tabela 7. Número de colónias de *E.coli* TEM-1 presentes em meio de cultura TSA para cada diluição.

Tabela 8. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E.coli* ATCC 25922 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Tabela 9. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* S3R9 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Tabela 10. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* S3R22 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Tabela 11. Valor das CMI ($\mu\text{g/L}$) de 2A3CQNX para as estirpes *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22.

Tabela 12. Número de colónias das estirpes presentes em meio de cultura TSA para cada diluição.

Tabela 13. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* ATCC 25922 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Tabela 14. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* AmpC MOX-2 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Tabela 15. Valor das CMI ($\mu\text{g/L}$) de 3M2QNXC para as estirpes *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* TEM CTX-M9, *E. coli* AmpC MOX-2, *E. coli* TEM-1, *E. coli* S3R9 e *E. coli* S3R22.

Tabela 16. Diluições ótimas para todas as estirpes com as quais se observou atividade antimicrobiana com o composto 3M2QNXC foi de 10^{-5} .

Índice de Gráficos

Gráfico 1. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ QNX.

Gráfico 2. Evolução do crescimento da *E.coli*-TEM-1 ao longo do tempo (0, 30, 60, 120, 150 e 180 minutos), até às 24h (1440 minutos), na ausência da QNX (curva a vermelho) e na presença da QNX na concentração de 256µg/L (curva azul).

Gráfico 3. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ 2MQNX.

Gráfico 4. Evolução do crescimento da *E.coli*-TEM-1 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2MQNX (curva a vermelho) e na presença da 2MQNX na concentração de 400µg/L (curva verde).

Gráfico 5. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ 2A3CQNX.

Gráfico 6. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R9/ 2A3CQNX.

Gráfico 7. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R22/ 2A3CQNX.

Gráfico 8. Evolução do crescimento da *E.coli* ATCC 25922 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 500µg/L (curva amarela).

Gráfico 9. Evolução do crescimento da *E.coli* TEM-1 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 500µg/L (curva amarela).

Gráfico 10. Evolução do crescimento da *E.coli* S3R9 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 320µg/L (curva amarela).

Gráfico 11. Evolução do crescimento da *E.coli* S3R22 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 320µg/L (curva amarela).

Gráfico 12. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* ATCC 25922/ 3M2QNXC.

Gráfico 13. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM CTX-M9/ 3M2QNXC.

Gráfico 14. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* AmpC MOX-2/ 3M2QNXC.

Gráfico 15. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ 3M2QNXC.

Gráfico 16. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R9/ 3M2QNXC.

Gráfico 17. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R22/ 3M2QNXC.

Gráfico 18. Evolução do crescimento da *E.coli* ATCC 25922 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 320µg/L (curva verde).

Gráfico 19. Evolução do crescimento da *E.coli* TEM CTX-M9 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 125 µg/L (curva verde).

Gráfico 20. Evolução do crescimento da *E.coli* AmpC MOX-2 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 100 µg/L (curva verde).

Gráfico 21. Evolução do crescimento da *E.coli* TEM-1 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 80 µg/L (curva verde).

Gráfico 22. Evolução do crescimento da *E.coli* S3R9 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 125 µg/L (curva verde).

Gráfico 23. Evolução do crescimento da *E.coli* S3R22 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 200 µg/L (curva verde).

Gráfico 24. Relação entre a Concentração *versus* diâmetro do halo de inibição para a estirpe *E.coli* TEM-1 na presença do composto 2HF em diferentes concentrações.

Gráfico 25. Evolução do crescimento das estirpes bacterianas ao longo do tempo, dos 0 aos 180 minutos e às 24h (1440 minutos), na ausência da 2HF (curva vermelha) e na presença da 2HF na concentração de 320 µg/L (curva cor-de-rosa).

Gráfico 26. Influência dos compostos QNX no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

Gráfico 27. Influência do composto 2MQNX no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

Gráfico 28. Influência do composto 2A3CQNX no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

Gráfico 29. Influência do composto 3M2QNXC no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

Gráfico 30. Influência do composto 2HF no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

CAPÍTULO 1

Introdução

1. Introdução

Desde há muito tempo que os investigadores se centram no estudo de diversas patologias, nomeadamente de infeções microbianas, com o intuito de prevenir, diagnosticar precocemente e desenvolver novas terapêuticas mais eficazes. Neste âmbito é sobretudo urgente o desenvolvimento de estudos que se centrem na procura de novas terapias efetivas. Cada vez mais se tem observado um aumento da ineficácia no tratamento de infeções que conduz a uma redução das opções terapêuticas, aumento da morbi-mortalidade humana e animal e dos custos associados aos cuidados de saúde, como resultado do crescente desenvolvimento de resistências e multirresistências. (Giedraitiene *et al*, 2011) A resistência aos antimicrobianos é observada sobretudo em bactérias Gram negativas, tais como estirpes de *E.coli* produtoras de β -lactamases (ESBLs), que atualmente constituem um importante problema de saúde pública. (Guenther *et al*, 2011; García-Hernández *et al*, 2011) Porém, também se verifica a presença de resistência aos antimicrobianos por parte de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e leveduras (*Candida albicans*). (Malachowa & DeLeo, 2010; Pfaller, 2012) Existem investigações que mostram que os compostos derivados das quinoxalinas *N,N*-dióxido são potenciais agentes antimicrobianos. (Villar *et al*, 2008; Vicente *et al*, 2008) Daí que a atividade destes compostos continue a ser testada sobretudo em microrganismos responsáveis por infeções crónicas, nomeadamente a Tuberculose, a Malária e a SIDA. (Vicente *et al*, 2008; Barea *et al*, 2012; Kleim *et al*, 1993) No entanto, existem infeções que, embora não sendo crónicas, também são de extrema importância. Os derivados das quinoxalinas *N,N*-dióxido têm sido estudados quanto à sua atividade anti-*M.tuberculosis* e anti-*Plasmodium* e, uma vez que têm sido obtidos resultados promissores, também seria importante conhecer a atividade destes compostos noutras estirpes. (Villar *et al*, 2008; Barea *et al*, 2012) Assim, neste estudo pretende-se verificar a suscetibilidade de bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras aos compostos químicos derivados das quinoxalinas 1,4-dióxido. Um composto químico “ideal” seria aquele que apresentasse uma atividade apenas contra a estirpe a eliminar e não possuísse qualquer ação nas células eucarióticas do hospedeiro.

Este estudo é imprescindível na medida em que permitirá conhecer a atividade antimicrobiana de novos compostos químicos em modelos eucariotas (*C.albicans* e *S.cerevisiae*) e procariotas (*S. aureus* e de *E.coli*), numa tentativa de propor novas

terapias e superar o problema da resistência emergente aos agentes terapêuticos por parte dos microrganismos.

2.Revisão Bibliográfica

2.1 Antimicrobianos

O conhecimento dos antimicrobianos e a compreensão dos seus mecanismos de ação e de resistência microbiana são de extrema importância, quer na sua utilidade clínica, quer no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Contudo, neste estudo dar-se-á mais ênfase aos antibacterianos.

2.1.1 Descoberta e evolução dos Antibióticos

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 conduziu a uma nova era na medicina. Este composto natural, produzido por fungos do género *Penicillium*, salvou centenas de milhares de vidas na 2ª Guerra Mundial, uma vez que era tóxico para estirpes do género *Staphylococcus*, mas seguro para ser utilizado em humanos. O facto de ser tóxico para este género permitiu tratar uma grande variedade de infeções, nomeadamente escarlatina, pneumonias e gonorreia, que até então não possuíam tratamento. A penicilina G ou benzilpenicilina foi o primeiro antibiótico a tornar-se disponível para uso clínico em 1942. (Oliveira *et al*, 2009) Seguiram-se intensas pesquisas que conduziram à descoberta de novos compostos naturais e sintéticos que atuassem noutros microrganismos patogénicos. Atualmente, existem mais tecnologias disponíveis e um maior conhecimento científico que permitem a descoberta e desenvolvimento de novos compostos eficazes no tratamento de infeções. Contudo, a situação económica exige um corte na avaliação e testes clínicos aos novos agentes antimicrobianos. Deste modo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a diminuição na síntese de novos compostos e o aumento das resistências conduziu a uma enorme diminuição nas opções terapêuticas. (OMS, 2012)

Os antimicrobianos são substâncias naturais produzidas por microrganismos ou obtidos por modificações químicas, que são frequentemente utilizados no tratamento de infeções humanas ou animais, causadas por bactérias, vírus, fungos ou parasitas. Estes têm capacidade para inibir a proliferação microbiana ou destruir o microrganismo, eliminando a causa de diversas patologias. Estes incluem os antibióticos, antivirais, antifúngicos, antiparasitários e alguns agentes quimioterápicos. (OMS, 2011) De acordo com Oliveira *et al* (2009), dos antibióticos produzidos por microrganismos 66% são de actinomicetos, 22% de fungos e 12% de bactérias. Dentre os actinomicetos, 80% são

obtidos a partir do género *Streptomyces*.

Para além da sua utilidade terapêutica, os antimicrobianos, nomeadamente os antibióticos, são bastante utilizados como agentes profiláticos e promotores de crescimento animal (pecuária, aquacultura). Daí que o uso e abuso destas drogas em meio hospitalar, na comunidade e na indústria alimentar, seja uma causa importante para a atual emergente resistência bacteriana aos antibióticos. (ASAE, 2010; Buffet-Bataillon *et al*, 2012)

2.1.2 Classificação dos antibióticos

Os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com a estrutura química, mecanismo de ação, toxicidade, espectro de ação e uso terapêutico. Contudo, para este estudo, considera-se mais importante a classificação de acordo com o mecanismo de ação para alguns grupos de antibióticos e estrutura química. O mecanismo de ação será apenas abordado em detalhe para os β -lactâmicos (antibióticos mais prescritos) e para as quinolonas (estrutura química muito semelhante à dos compostos estudados). Deste modo, esta classificação permitirá compreender posteriormente os mecanismos de resistência antimicrobiana conhecidos para as estirpes em estudo.

2.1.2.1 Classificação dos antibióticos de acordo com o mecanismo de ação e estrutura química

2.1.2.1.1 Ação sobre a parede celular – β -lactâmicos

A classe ou grupo de antibióticos que exerce ação sobre a parede celular são os β -lactâmicos. Esta classe de antibióticos apresenta estruturalmente um anel β -lactâmico que se encontra representado na Figura 1.

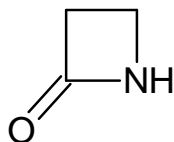


Figura 1. Estrutura química do anel β -lactâmico. **Fonte:** Compendium of Chemical Terminology, GOLD BOOK of *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), versão 2.3.2, 19-09-2012.

Esta classe de antibióticos apresenta subgrupos de acordo com as cadeias laterais e o tipo de anel (ou núcleo) associado ao anel β -lactâmico. As estruturas básicas que se conhecem são os penamo, penemo, cefem, carbapenemo e monobactamo. Oliveira *et al*, (2009) fazem referência ao clavam como sendo outra estrutura básica. (Figura 2)

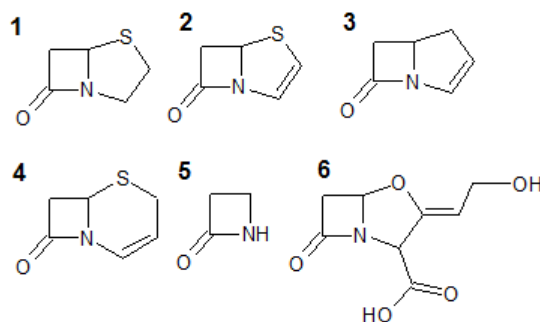
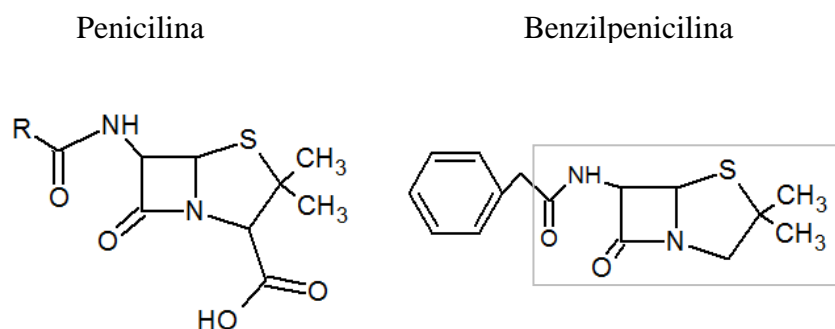


Figura 2. Estrutura química básica dos β -lactâmicos. 1- Penamo (penicilinas), 2 - Penemo, 3 - Carbapenemo -, 4 - Cefem, 5 - Monobactamo e 6 - Clavam. (R- Cadeia lateral) **Fonte:** IUPAC e <http://www.chem.ox.ac.uk/oc/cjschofield/biosynthesis.htm>

Os β -lactâmicos com anel **penamo**, do qual fazem parte as penicilinas, possuem uma estrutura básica bicíclica, denominada ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). O que distingue as penicilinas é a cadeia lateral R. (Figura 3) (Ruben, 2012) Algumas penicilinas podem ser inativadas por β -lactamases bacterianas (por exemplo penicilinases), que quebram o anel β -lactâmico, inativando o antibiótico. (Bradford, 2001)



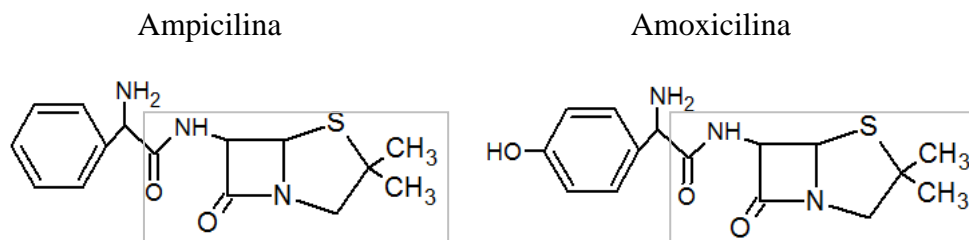


Figura 3. Estrutura química geral da penicilina (penamo) e alguns exemplos de antibióticos derivados desta, nomeadamente a Benzilpenicilina (ou penicilina G), ampicilina e amoxicilina. **Fonte:** Antunez *et al*, 2005.

Os β -lactâmicos que contêm um anel **penemo**, diferem dos anteriores na sua estrutura base, por apresentarem uma dupla ligação entre o carbono 2 e 3 do anel. (Figura 2)

Os **cefems**, comparativamente com os penamo apresentam mais um átomo de carbono no anel que se encontra associado ao anel β -lactâmico, e uma dupla ligação entre o carbono 3 e 4 (Figura 2). Estes podem ser classificados em cefalosporinas, cefamicinas, oxacefems ou oxa-1-cefems e carbacefems. (Ruben, 2012) As cefalosporinas são as mais representativas do grupo cefems e, possuem um espectro de ação maior do que as penicilinas. A cefalosporina C foi a primeira cefalosporina a ser isolada (1948) a partir do fungo *Cephalosporium acremonium*. Os diversos análogos desta cefalosporina diferem entre si na cadeia lateral 3-acetoximetil Figura 4. (Oliveira *et al*, 2009)

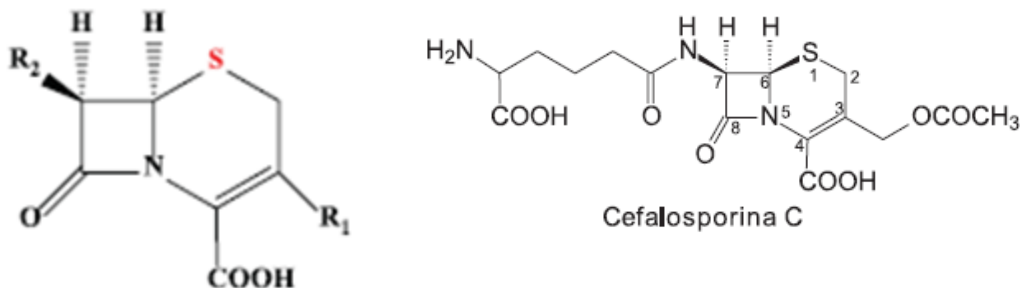


Figura 4. Estrutura química geral de um antibiótico cefem à esquerda e, estrutura da cefalosporina C à direita. As cefalosporinas análogas desta diferem apenas no grupo que se encontra na cadeia lateral R1. **Fonte:** Oliveira *et al*, 2009.

Atualmente são conhecidas 5 gerações de cefalosporinas baseadas no seu espectro de atividade. (Ruben, 2012) A primeira geração é ativa contra bactérias Gram positivas, excepto MRSA e enterococos; a ação antibacteriana das cefalosporinas de segunda geração abrange todas as estirpes contra as quais as cefalosporinas de primeira geração atuam e, adicionalmente, apresentam maior espectro de ação nas bactérias Gram negativas (*Klebsiella* e *Proteus*); a terceira geração apresenta maior espectro de ação do que os anteriores para microrganismos Gram negativos e menor espectro de ação para os Gram positivos; a quarta geração de cefalosporinas apresenta um espectro de ação bastante mais amplo do que os antimicrobianos das gerações anteriores, atuando contra *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases. (Laudano, 2011) Recentemente, foi descrito na literatura um novo antimicrobiano (ceftarolin) que tem sido considerado como uma cefalosporina de quinta geração. (Ruben, 2012) Esta apresenta um amplo espectro de ação contra Gram negativos, mas a sua atividade contra Gram positivos é bastante mais abrangente do que os antimicrobianos das gerações anteriores permitindo-lhe atuar em estirpes multirresistentes (*S. aureus*, *S.pneumoniae*). (Laudano, 2011; Saravolatz *et al*, 2011) (Figura 5).

Gram-positive organisms	Gram-negative organisms
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
MRSA	<i>Citrobacter freundii</i>
MSSA	ESBL-negative <i>Escherichia coli</i>
VISA	ESBL-negative <i>Klebsiella pneumoniae</i>
VRSA	<i>Proteus mirabilis</i>
Coagulase-negative staphylococci	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Shigella</i> spp.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
levofloxacin resistant	<i>Haemophilus influenzae</i>
penicillin resistant	β -lactamase positive
penicillin intermediate	β -lactamase negative
penicillin susceptible	β -lactamase negative, ampicillin resistant
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
macrolide resistant	
macrolide susceptible	
Viridans group streptococci	
β -Haemolytic group A streptococci	
β -Haemolytic group B streptococci	

Figura 5. Atividade antimicrobiana da cefalosporina de quinta geração (Ceftarolin). **Fonte:** Laudano, 2011.

A cefamicinas diferem das cefalosporinas pela substituição de um hidrogênio na posição 7 do anel bicíclico, por um grupo metoxi, que lhe permite resistir à ação das β -lactamases (Figura 6). Atuam inibindo especificamente as transpeptidases. (Oliveira *et al*, 2009) Os compostos oxacefems ou oxa-1-cefems diferem em um átomo de oxigênio na posição 1 do anel comparativamente com os anteriores. Os carbacefems apresentam um grupo CH_2 na posição 1 do anel. (Ruben, 2012)

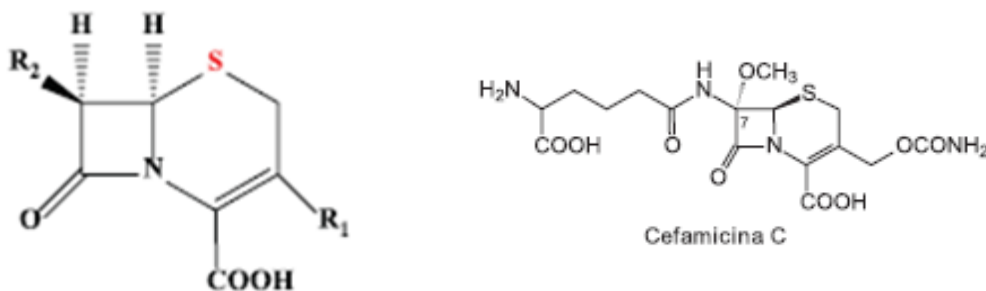


Figura 6. Comparação da estrutura química das cefalosporinas (à esquerda) com as cefamicinas (à direita). Verifica-se a substituição de um hidrogênio na posição 7 do anel bicíclico, por um grupo metoxi. **Fonte:** Oliveira *et al*, 2009.

Os **carbapenemos** (Imipenem, meropenem) quando comparados com os penemos, não apresentam um átomo de enxofre na posição 1 do anel ligado ao anel β -lactâmico (Figura 2). Em vez disso, possuem um átomo de carbono com extrema importância no espectro de ação e potência contra as β -lactamases. A presença do grupo hidroxietil no carbono 6, aumenta a resistência do antibiótico à ação das β -lactamases. Este subgrupo de antibacterianos possui um amplo espectro de atividade contra microrganismos Gram positivos, Gram negativos e anaeróbios. Contudo, apresentam alguma dificuldade em travessar a parede celular bacteriana, pelo que se pensa que atingem o espaço periplasmático através das porinas. (Papp-Wallace, 2011; Ruben, 2012)

Os antibióticos **monobactamos** são caracterizados por apresentarem apenas um anel β -lactâmico na sua estrutura química, sendo ativos contra bactérias Gram negativas produtoras de β -lactamases (Figura 2) O aztreonam constitui o principal exemplo de monobactamos e são ativos contra Gram negativos (*Pseudomonas*). (Ruben, 2012)

De acordo com Oliveira et al (2009) clavam constitui outro subgrupo pertencente ao grupo dos β -lactâmicos. O exemplo mais representativo é o ácido clavulânico (Figura 7). A estrutura básica destes compostos é um anel β -lactâmico associado a um anel oxazolidina (**clavam**). Trata-se de um composto natural produzido pelo *Streptomyces clavuligerus*, que atua como um excelente inibidor das serina β -lactamases (Classe A) produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas. Quando o ácido clavulânico é utilizado em associação com estes antibióticos, ocorre uma ligação irreversível entre o grupo hidroxilo da serina da β -lactamase e o ácido, produzindo um intermediário estável que inativa a enzima. Assim, o antibiótico atua no combate à infecção. (Oliveira et al, 2009)

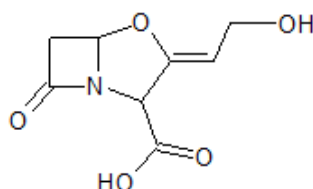


Figura 7. Estrutura química o ácido clavulânico. **Fonte:** Oliveira et al, 2009.

Todos os antibióticos da classe dos β -lactâmicos exercem uma ação bactericida, sendo classificados funcionalmente como antiparietais, uma vez que inibem enzimas que atuam na síntese da parede celular bacteriana. (Figura 8) Esta parede é um biopolímero (denominado peptidoglicano) constituído por unidades glicosídicas alternadas de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurânico (NAM). (Magnet et al, 2007) Durante a síntese da parede celular, a ligação estabelecida entre ambos (β 1-4) é efetuada por transglicosidasas. Nestas bactérias, as cadeias laterais peptídicas (com uma porção terminal D-Alanina) ligam-se a extremidades livres de cada unidade de NAM e vão estabelecer ligações cruzadas com o péptido de outra cadeia semelhante, através dos resíduos de glicina que se encontram ligados ao péptido. (Drawz et al, 2010) A constituição desses péptidos diferem entre espécies, e no caso dos *Staphylococcus* são 5 resíduos de glicina. As *Penicilin Binding Protein* (PBP) ou D,D-transpeptidase catalizam esta reação, clivando D-Ala⁴-D-Ala⁵ do péptido dador e estabelecem a ligação do grupo carbonil do D-Ala⁴ ao grupo amina da cadeia lateral da posição 3 (péptido recetor). (Magnet et al, 2007) Nas bactérias Gram positivas, a camada de peptidoglicano é muito mais espessa (cerca 90% de peptidoglicano). As bactérias Gram negativas

apresentam cerca de 10% de peptidoglicano e uma membrana externa.

As transglicosidases e as transpeptidases são o principal alvo dos antibióticos utilizados para tratar infecções severas por Gram positivos (β -lactâmicos e glucopéptidos). (Magnet *et al*, 2007) Como os antibióticos β -lactâmicos são análogos estruturais da D-Ala-D-Ala atuam como substrato das PBP que deixam de efetuar a transpeptidação. (Draw *et al*, 2010) Assim, a parede celular começa a desagregar, aumentando a sua permeabilidade e ocorrendo a lise celular.

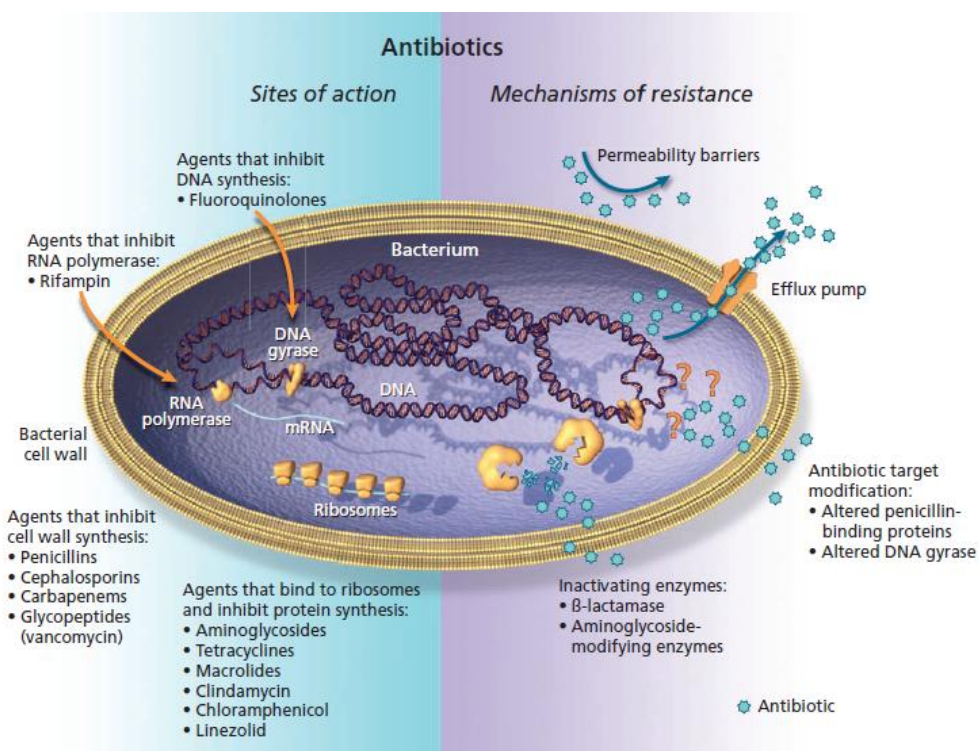


Figura 8. Locais de ação (à direita) e mecanismos de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos. **Fonte:** Mulvey & Simor, 2009.

2.1.2.1.2 Ação sobre a parede celular - Glucopéptidos

Os glucopéptidos são assim designados por apresentarem uma molécula proteica associada a moléculas peptídicas. A vancomicina e a teicoplanina (bactericidas) constituem os principais representantes deste grupo, mas ambos apresentam propriedades que não lhes são favoráveis, nomeadamente a baixa lipossolubilidade. (EARSS, 2008) Contudo, a teicoplanina é mais lipossolúvel.

Os antimicrobianos pertencentes ao grupo dos glucopéptidos atuam inibindo a

síntese da parede celular de bactérias Gram positivas através da ligação à porção terminal D-Ala⁴-D-Ala⁵ do pentapéptido, evitando a transpeptidação e transglicosilação (Figura 8). (James *et al*, 2012) Deste modo, contribuem para a instabilidade celular. De acordo com EARSS (2008), os glucopéptidos, para exercerem a sua ação eficazmente, têm que atravessar cerca de 20 camadas de peptidoglicano. Sendo assim, estirpes que apresentem uma parede celular mais espessa possuem maior capacidade de resistir à ação destes antimicrobianos. Por outro lado, não atuam em estirpes bacterianas Gram negativas porque são moléculas de alto peso molecular que apresentam dificuldade em atravessar a sua membrana externa.

Têm sido amplamente utilizados como alternativa aos β -lactâmicos em indivíduos alérgicos a estes antibióticos e em infeções causadas por estafilococos resistentes à oxacilina. Contudo, a sua utilização tem que ser mais restrita uma vez que já existem estirpes com resistência.

2.1.2.1.3 Ação na síntese proteica

Dos antibióticos conhecidos, os aminoglicosídeos, as tetraciclinas, as oxazolidinonas, o cloranfenicol, os macrólidos, as lincosamidas e as estreptograminas são os que atuam na síntese proteica bacteriana (Figura 8).

Os antibióticos aminoglicosídeos apresentam um ou mais grupos amina associados a um grupo glicosídeo, são produtos naturais ou semi-sintéticos com origem em actinomicetos. A estreptomina foi dos primeiros antibióticos naturais descobertos pertencentes a este grupo que era inócuo para o homem, mas com excelente atividade contra *M. tuberculosis*, quando associada a outros antibióticos. Têm sido amplamente utilizados no tratamento de infeções causadas por bactérias Gram negativas aeróbias, como nas infeções respiratórias, do trato urinário, endocardites, as septicémias. Os antibióticos pertencentes a este grupo exercem o seu efeito bactericida, inibindo a síntese proteica, através da ligação à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, impedindo deste modo a leitura correta do mRNA. (McCallum, 2010)

Atualmente são conhecidos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos que não são induzidos pela presença do antimicrobiano. Os mecanismos conhecidos são a alteração dos sítios de ligação no ribossoma, alteração na permeabilidade de membrana e modificação enzimática do fármaco. (Giedraitiene, 2011)

As tetraciclinas são antibióticos com amplo espectro de ação que atuam em Gram positivos e negativos e, apresentam também atividade antiprotozoária (*P. falciparium*, *E. histolytica*). A sua ação inibe a síntese proteica por ligação à subunidade ribossomal 30S, impedindo a ligação do tRNA nesse local (inibem a fase de alongação).

Atualmente encontram-se caracterizados 29 genes de resistência às tetraciclinas (gene *tet*), sendo que 18 desses genes codificam para bombas de efluxo e os restantes para proteínas que protegem os ribossomas da ação das tetraciclinas. (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2003) As oxazolidinonas atuam do mesmo modo que as tetraciclinas. (McCallum, 2010)

O cloranfenicol é também um antibiótico de largo espectro de atividade que se liga à subunidade 50S ribossomal inibindo a transpeptidação. Atualmente também se conhecem mecanismos de resistência bacteriana para este antibiótico.

Os macrólidos, as lincosamidas e as estreptograminas são frequentemente referidos em simultâneo uma vez que, apesar de apresentarem diferenças estruturais, atuam no mesmo alvo bacteriano (subunidade ribossomal 50S). O primeiro macrólido descoberto foi a eritromicina e, a claritromicina e a azitromicina constituem outros exemplos de macrólidos. (Roberts, 2011) A lincomicina e a clindamicina são exemplos de lincosamidas. Como exemplo de estreptograminas têm-se a quinupristina e a dalfopristina.

2.1.2.1.4 Interferência na síntese e/ou ação do folato

Os antibióticos pertencentes a este grupo possuem uma ação bacteriostática, atuando através da inibição da síntese do folato que é um precursor essencial na síntese do RNA e DNA bacteriano. A sulfonamida e o trimetropim constituem os exemplos deste grupo. A sulfonamida é um análogo estrutural do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) essencial para a síntese do ácido fólico bacteriano. Este antibacteriano inibe competitivamente a enzima envolvida na síntese do folato. O trimetropim é um análogo estrutural do folato que inibe competitivamente a enzima bacteriana diidrofolato redutase que converte o diidrofolato a tetraidrofolato. Se esta conversão não ocorrer, não há multiplicação bacteriana. (Skold, 2001)

2.1.2.1.5 Ação na replicação - Quinolonas e fluoroquinolonas

Os antibióticos pertencentes a este grupo (sintéticos) derivam do ácido nalidíxico e foram, primeiramente, utilizados da década de 60. A primeira geração de quinolonas (ácido nalidíxico e o ácido oxolínico) apresentava uma fraca atividade antibacteriana. O ácido oxolínico chegou a ser utilizado na medicina veterinária. Duas décadas depois, surgiram as fluoroquinolonas (quinolonas de segunda geração) que diferem das quinolonas por apresentarem um átomo de fluor na posição 6 do anel quinolónico. A ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e pefloxacina constituem exemplos das primeiras fluoroquinolonas que surgiram. (Poirel *et al*, 2012) Estas apresentam uma potente atividade contra Gram positivos e uma ação severa sobre os Gram negativos. As fluoroquinolonas mais recentes apresentam uma maior espectro de ação contra bactérias Gram positivas (sparfloxacina, levofloxacina e moxifloxacina) e bactérias anaeróbias (trovafloxacina, gatifloxacina, or gemifloxacina) (Poirel *et al*, 2012) Contudo, são muito utilizadas para combater infecções urinárias causadas por *Enterobacteriaceae*. (Michon *et al*, 2011) Collin *et al* (2011) refere esta classe de antibióticos pode apresentar uma ação bacteriostática ou bactericida. Essa ação é exercida sobre a subunidade A da DNA girase (ou topoisomerase II) nas bactérias Gram negativas, e a topoisomerase IV pode ser o alvo em alguns microrganismos Gram positivos (*S. aureus*). (Collin *et al*, 2011; McCallum, 2010) A topoisomerase II tem como função tornar a molécula de DNA mais condensada (superenrolamento) e biologicamente ativa. Quando a sua ação é inibida pelo antibiótico, a molécula de DNA passa a ocupar muito espaço no interior da bactéria e as extremidades livres determinam uma síntese descontrolada de mRNA e proteínas (ação bacteriostática). A ação bactericida parece ser dependente da síntese de uma proteína. Portanto, esta classe de antibióticos interfere com a replicação do DNA (Figura 8).

Os mecanismos de resistência conhecidos para esta classe de antimicrobianos incluem alterações no alvo (mutações no gene topoisomerase) ou presença de bombas de efluxo. (McCallum, 2010; Giedraitiene, 2011)

2.1.2.2 Classificação dos antibióticos segundo a importância na medicina humana (OMS)

Um grupo de trabalho da OMS desenvolveu critérios que permitem classificar os antimicrobianos, nomeadamente os agentes antibacterianos, de acordo com a sua

importância na medicina humana. Essa classificação define os antibióticos em 3 categorias: “criticamente importantes”, ”altamente importantes” e “importantes”. Os antibacterianos “criticamente importantes” constituem a única ou uma das poucas alternativas para tratar infecções humanas severas (Critério 1), e podem ser transmitidos por fontes não-humanas ou por doenças causadas por organismos que adquiriram determinantes de resistência dessas mesmas fontes (Critério 2). Os antibacterianos ”altamente importantes” incluem-se no Critério 1 ou 2 e os restantes não se inserem em nenhum dos critérios. (WHO, 2007) Estes critérios permitem também contribuir para o desenvolvimento de estratégias de monitorização do risco para melhorar a utilização dos agentes antimicrobianos na agricultura e medicina veterinária. Os animais destinados ao consumo humano são fontes de bactérias que causam infecções humanas. Essas bactérias podem carregar determinantes de resistência que são transmitidos aos humanos através da alimentação ou pelo contato direto com os animais. (Collignon, 2009)

2.2 Resistência aos antimicrobianos

A resistência antimicrobiana (ou resistência às drogas) é um fenómeno biológico natural, em que os microrganismos adquirem (ou já possuem) resistência às drogas cuja finalidade é destruí-los ou inibir o seu crescimento. Todavia, essa resistência conduz à ineficácia do agente antimicrobiano, permitindo que a infeção se dissemine, e haja um aumento da morbi-mortalidade. (OMS, 2011) A OMS refere que o aumento emergente da resistência aos antimicrobianos por parte dos patógenos humanos constitui, atualmente, um grande problema de saúde pública. O principal fator que contribui para essa resistência na comunidade é a sua incorreta utilização. (Onwubiko & Sadiq, 2011) Por outro lado, a Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) é considerada o epicentro das multiresistências (Brussels *et al*, 2011) devido ao grande número de pacientes imunodeprimidos, uso de dispositivos médicos (sondas) e a ampla utilização de antimicrobianos. (Cercenado, 2011) Os antibióticos e os genes de resistência também têm sido considerados poluentes ambientais, uma vez que conduzem a alterações nos ecossistemas e têm impacto na saúde humana. (Martinez, 2009) Ainda em termos ambientais, são preocupantes os efluentes hospitalares e os resíduos das quintas onde ocorre a criação de animais. (Martinez, 2009)

2.2.1 Origem da resistência

Quanto à origem da resistência microbiana, a OMS refere que, há bilhões de anos, o facto de alguns microrganismos produzirem naturalmente substâncias químicas para se protegerem de outros microrganismos fez com que estes desenvolvessem mecanismos que lhes permitem sobreviver à ação dessas substâncias. Desde então essa resistência tem sido transmitida através de linhagens microbianas, permitindo que estirpes sensíveis se tornem resistentes à ação dessas substâncias. (OMS, 2012)

De acordo com a OMS, para grande parte dos microrganismos sensíveis, não é fácil o aparecimento súbito de novas resistências através de mutações ou aquisição de genes, e este fenómeno é raro. Assim, a resistência que se observa atualmente na prática clínica foi desenvolvida há muito tempo noutro indivíduo, animal ou num reservatório ambiental em qualquer parte do mundo. (OMS, 2012) De acordo com Martinez (2009), a utilização excessiva de antimicrobianos na produção animal e na agricultura, antes da introdução dos antimicrobianos na prática clínica, conduziu a uma contaminação de ecossistemas naturais, cuja clara consequência é a seleção de bactérias resistentes. Consequentemente, existe um grande impacto em termos de saúde pública (Martinez, 2009)

2.2.2 Pressão seletiva

De acordo com Mulvey & Simor (2009) a pressão seletiva é definida pela presença de determinadas condições ambientais a que está sujeito um organismo com determinadas características que lhe permite sobreviver e proliferar. Numa situação de infeção, as estirpes comensais e as estirpes responsáveis por determinada infeção são expostas ao agente antimicrobiano que pode inibir ou destruir a maioria da população bacteriana sensível, enquanto as estirpes resistentes sobrevivem. (OMS, 2012) Estas estirpes podem ser intrinsecamente resistentes ao antimicrobiano ou terem adquirido essa resistência e, portanto, o uso do antimicrobiano seleciona as estirpes resistentes que podem proliferar e causar novas infeções (Figura 9). Existem estudos que mostram que o uso de antimicrobianos está associado ao aumento da resistência aos mesmos. Um estudo retrospectivo, que tinha como objetivo avaliar a relação entre o uso fluoroquinolonas e a diminuição da suscetibilidade de algumas estirpes às fluoroquinolonas em hospitais universitários durante nove anos, concluiu que ocorre uma diminuição na suscetibilidade de algumas estirpes estudadas às fluoroquinolonas.

Nestas estirpes incluem-se a *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*. (Zervos *et al*, 2003)

Os antimicrobianos também são considerados importantes poluentes ambientais. A maioria dos antibióticos naturais é biodegradável, servindo de alimento a muitos microrganismos. Contudo, os antimicrobianos sintéticos, em geral, apresentam uma taxa de degradação lenta que aumenta o tempo de exposição dos microrganismos aos antimicrobianos. (Martinez, 2009) De acordo com este autor, a emergência da resistência aos antimicrobianos pode resultar da pressão seletiva dos antimicrobianos. Contudo, a emergência desses fenótipos de resistência depende de vários fatores, como o grau de resistência e o local de colonização. (Giedraitienė *et al*, 2011; Brusselaers *et al*, 2011)

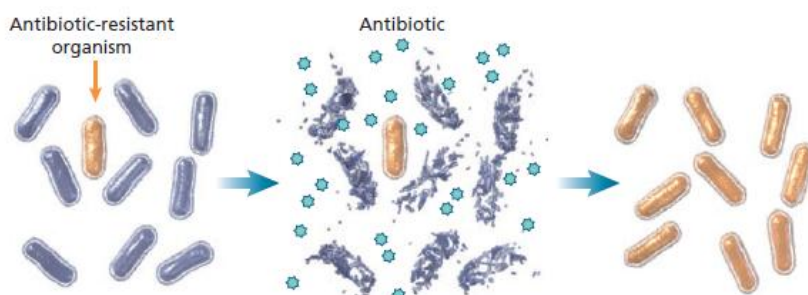


Figura 9. Efeito da pressão seletiva nas bactérias. População bacteriana sensível na presença de bactérias com resistência a determinado antibiótico (à esquerda); Na presença do antibiótico, as bactérias sensíveis são destruídas e as resistentes sobrevivem (ao centro); As bactérias resistentes proliferam podendo causar nova infecção. Fonte: (Mulvey & Simor, 2009)

2.2.3 Propagação da resistência bacteriana

A transmissão/disseminação dos microrganismos resistentes pode ocorrer através do contato direto entre profissionais de saúde e utentes, equipamento médico e cirúrgico contaminado, do ambiente, da água e da alimentação. (Mulvey & Simor, 2009; OMG, 2006; Giedraitiene, 2011) De acordo com a OMS, a incorreta utilização dos antimicrobianos na prática clínica e na indústria (pecuária, aquacultura), constitui a principal causa de transmissão de resistência. Os agentes antimicrobianos também são utilizados como agentes profiláticos e promotores de crescimento animal destinado à alimentação humana (pecuária, aquacultura). (OMG, 2006; Giedraitiene, 2011) A resistência da *E.coli* à ciprofloxacina está associada ao uso de fluoroquinolonas na

avicultura. (Giedraitiene, 2011) Desta forma, o uso dos antimicrobianos pode estar associado à disseminação de microrganismos patogênicos presentes nos animais para consumo humano, através dos alimentos. (Martínez, 2009)

O aumento massivo do comércio (importações e exportações alimentares, por exemplo) e da mobilização humana como consequência da globalização, têm permitido a propagação dos agentes infecciosos.

Em suma, a emergência e disseminação da resistência aos antimicrobianos contribui para o aumento da pressão seletiva, daí a importância de minimizá-la.

2.2.4 Genética da resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos pode ocorrer naturalmente (intrínseca) ou ser adquirida (extrínseca). A primeira ocorre devido à presença natural de genes cromossômicos ou determinantes das características do organismo que conferem resistência a determinados antimicrobianos. (Mulvey & Simor, 2009) Por exemplo, o facto de o *Mycoplasma* não apresentar parede celular torna-o resistente aos β -lactâmicos; a *E.coli* é naturalmente resistente à vancomicina (Tenover, 2006 - tese Rúben; Giedraitiene, 2011). A impermeabilidade celular ao antimicrobiano, a ausência de alvos, a presença de bombas de efluxo e enzimas inativadoras do antimicrobiano, constituem exemplos de mecanismos naturais de resistência. (Tenover, 2006 - tese Rúben) Por outro lado, os mecanismos de resistência extrínseca envolvem mudanças na composição genética do organismo e incluem mutações cromossômicas e/ou transferência vertical ou horizontal de material genético (Figura 8).

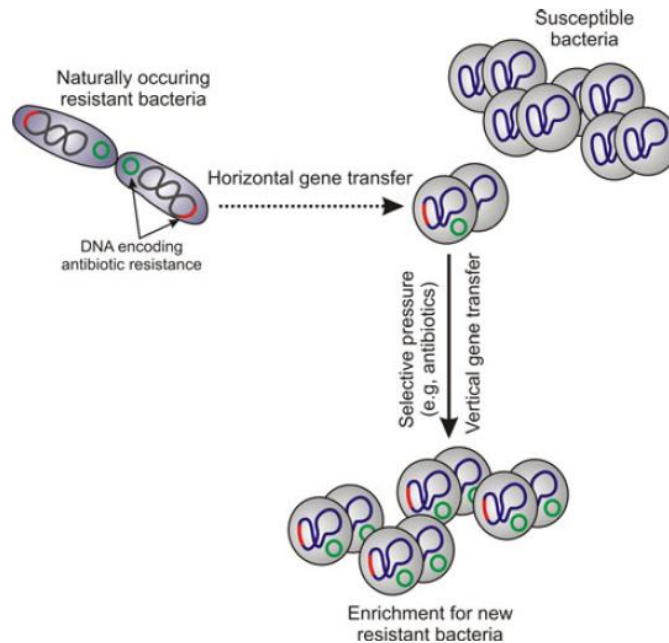


Figura 10. Transferência genética horizontal e vertical. **Fonte:** Malachova & DeLeo, 2010.

As mutações cromossômicas podem ocorrer espontaneamente devido a erros de replicação ou incorreta reparação do DNA, mas em condições normais a sua taxa é muito baixa. Contudo, numa situação de infecção, a taxa replicação é mais elevada do que na ausência de infecção, aumentando a probabilidade de ocorrência desse tipo de mutação. A resistência da *E. coli* às quinolonas pode ocorrer devido a mutações no gene que codifica a síntese da subunidade A da DNA girase (*gyrA*).

A transferência vertical ocorre quando um microrganismo recebe material genético da célula progenitora, que pode conter determinantes de resistência. A transferência horizontal de material genético pode ocorrer entre microrganismos procariontes ou eucariontes, ou entre eucariontes e procariontes. Este tipo de transferência também é conhecido como transferência de elementos genéticos móveis (EGM). (Malachova & DeLeo, 2010) Os plasmídeos, as transposições, os bacteriófagos, as sequências de inserção (SI), cassetes cromossômicas e ilhas de patogenicidade constituem alguns exemplos de EGM que podem conter determinantes de resistência aos antimicrobianos. A transferência desses genes pode ocorrer por conjugação (plasmídeos, transposições), transdução (bacteriófagos, integrões) e transformação (DNA cromossômico livre). A incorporação desse material genético na nova célula bacteriana provoca diversas alterações na sequência de DNA. A conjugação envolve troca de

material genético cromossômico ou extracromossômico entre bactérias; a transdução envolve transferência de material genético entre bactérias através de bacteriófagos; e a transformação consiste na captação de DNA livre no ambiente extrabacteriano.

2.2.5 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

O uso de vários antimicrobianos, ao longo dos anos, tem conduzido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos a um ou mais antimicrobianos. Quando um microrganismo apresenta resistência a mais do que um antimicrobiano fala-se em microrganismo multirresistente ou que apresenta *Multidrug Resistance* (MDR). Atualmente existem diversas estirpes MDR, nomeadamente *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de β -lactamases, *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA), *Vancomycin resistance S. aureus* (VRSA), *Micobacterium tuberculosis*, entre outras. (Giedraitiene *et al*, 2011) Os mecanismos de resistência inatos ou adquiridos permitem aos micro-organismos escapar à ação dos antimicrobianos.

Conhecem-se 4 mecanismos de resistência básicos: a alteração do alvo antimicrobiano (parede celular, síntese proteica), a alteração da permeabilidade de membrana, mecanismos enzimáticos e desenvolvimento de vias metabólicas alternativas. (McCallum, 2010; Ruben, 2012)

2.2.5.1 Alteração do alvo bacteriano

A interação entre o antimicrobiano e a molécula alvo é muito específica, pelo que alterações no alvo influenciam a ligação entre ambos. Por exemplo, os β -lactâmicos atuam nas *Penicilin Binding Protein* (PBP), mas algumas estirpes têm capacidade para produzir uma PBP alternativa (PBP2a), que reduz a afinidade desse grupo de antimicrobianos. (Giedraitiene, 2011) Este mecanismo será abordado em detalhe no tópico “*S. aureus* – Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos”. Outro exemplo corresponde à mutação no gene que codifica para a subunidade A da DNA girase. Esta alteração conduz à ausência de afinidade da fluoroquinolona para o seu alvo.

2.2.5.2 Alteração na permeabilidade membranar

Um exemplo de alteração na permeabilidade ocorre, por exemplo, devido a mutações nas porinas ou à presença de bombas de efluxo. As porinas são canais através dos quais os antimicrobianos podem passar para o interior da célula. Se ocorrerem

mutações nos genes que codificam essas porinas (exemplo: resistência às tetraciclinas) a permeabilidade passa a ser limitada. (Ruben, 2012) As bombas de efluxo, por outro lado, expulsam o antimicrobiano para o meio extracelular, reduzindo o *uptake* da droga no interior da célula. Algumas destas bombas de efluxo são específicas para determinados antimicrobianos enquanto outras são denominadas de transportadores multidrogas (fluoroquinolonas, tetraciclinas e macrólidos) e contribuem significativamente para a MDR. (Giedraitiene, 2011) Há, portanto, neste mecanismo, uma diminuição na quantidade de antimicrobiano que entra na célula bacteriana.

2.2.5.3 Mecanismos enzimáticos

Quanto aos mecanismos enzimáticos que inativam antimicrobianos incluem-se a produção de β -lactamases e transferases. As primeiras são as mais prevalentes e as clinicamente importantes são produzidas por bactérias Gram negativas. São abordadas em detalhe no tópico “*E.coli* – Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos”. As transferases são enzimas que adicionam determinados grupos químicos na periferia dos antibióticos, inativando-os. Por exemplo, a adição de fosforiltransferases, nucleotidiltransferases, adenililtransferases ou acetiltransferases aos aminoglicosídeos neutraliza a sua atividade através da redução da afinidade ao seu alvo. Estas enzimas já foram identificadas em estirpes de *S. aureus* e *S. pneumoniae* e é o mecanismo de resistência mais comum aos aminoglicosídeos. (Giedraitiene, 2011) Geralmente os genes que codificam a síntese destas transferases estão localizados em transposões, o que explica a sua ampla disseminação em bactérias Gram positivas e Gram negativas. (McCallum, 2010)

2.2.5.4 Vias metabólicas alternativas

O último mecanismo de resistência referido pode ser observado em estirpes resistentes às sulfonamidas e trimetropim. A enzima alvo de ambos os antibióticos (diidropteroato sintetase e diidrofolato redutase) torna-se insensível a estes, devido à síntese de enzimas com baixa afinidade para as sulfonamidas e trimetropim.

2.3 Combate à resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é um problema multifatorial e que requer uma abordagem multidisciplinar. Não se trata de um problema recente, mas que se tem tornado cada vez mais perigoso, sendo necessário tomar medidas urgentes para

minimizar as suas consequências. A implementação dessas medidas deve ser efetuada a nível hospitalar e dos profissionais de saúde, na comunidade e na indústria de produção animal, agricultura e veterinária (Collignon, 2009) A OMS desenvolveu estratégias mundiais, com o intuito de reduzir a taxa de resistências, prevenir infeções e reduzir a propagação de microrganismos resistentes. As estratégias foram elaboradas separadamente, tendo em conta a população alvo e instituições. Por isso, existem recomendações para os utentes e comunidade em geral, profissionais de saúde, hospitais, quem administra antimicrobianos aos animais destinados ao consumo humano e para os governos nacionais. O documento encontra-se disponível no <http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf> (2001).

2.4 Consumo/Resistência aos antimicrobianos em Portugal

A Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde em Portugal (INFARMED), participa num programa internacional, o *European Surveillance of Antimicrobial Consumption* (ESAC) coordenado *European Centre for Diseases Prevention and Control* (ECDC) A finalidade deste projeto é fornecer dados acerca da quantidade e tipo de antimicrobianos que são utilizados nos diversos países que participam no projeto. Um programa paralelo a este, o *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), financiado pelo ECDC da Comissão Europeia, reúne informações acerca da resistência aos antimicrobianos relativos a bactérias isoladas de infeções invasivas. Em Portugal, é o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) que coordena o projeto, sendo, por isso, definido como o Laboratório Nacional de Referência para Resistência aos Antimicrobianos (LNR-RA).

O INFARMED é o responsável pela recolha dos dados relativos ao consumo de antimicrobianos que são enviados para o ECDC, que possui uma base de dados contínua e comparável com diversos países (29 no total). Em 2008, Portugal registou um aumento de 3,7% no consumo de antimicrobianos em ambulatório quando comparado com o ano anterior. (ESAC, 2008) Os antibióticos mais prescritos pertencem ao grupo das penicilinas e representam 51% do consumo total de antibióticos (Figura 11). De acordo com ESAC, em 2010, Portugal está entre os países que mais consomem antimicrobianos na comunidade e o que menos consome a nível hospitalar.

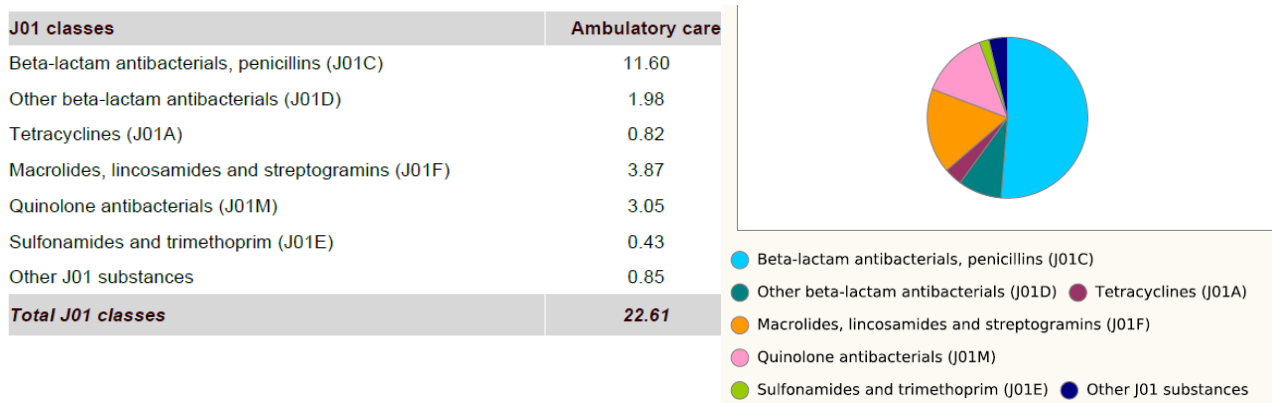


Figura 11. Uso dos antimicrobianos em Portugal no ano 2008 em ambulatório, expressos em DDD (*Defined Daily Dose*)/1000 habitantes por dia. **Fonte:** *European Surveillance of antimicrobial Consumption* (ESAC) em http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50280 (2008).

Quanto à resistência aos antimicrobianos, a base de dados do ECDC apresenta os valores anuais para os diversos países que participam no programa EARSS, apenas para as estirpes/antibióticos com relevância clínica (*E.faecalis*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* e *S. pneumoniae*). Neste tópico apenas serão abordadas as estirpes/antimicrobianos relevantes para este estudo.

De acordo com o EARSS, entre 1999 e 2008, apenas 2 países apresentam mais de 50% de estirpes MRSA: Portugal (53%; n=1556) e Malta (56%; n=108) (Figura 12) Entre 2008 e 2011, comparativamente com os restantes países que participaram no estudo, Portugal apresentou a percentagem de estirpes MRSA mais elevada (54,6%). Assim, em contraste com a melhoria em muitos países europeus (sobretudo em França e Malta), em Portugal as estirpes MRSA continuam a ser um grave problema de Saúde Pública. A Tabela 1 mostra dados mais recentes (2010/ 2011) relativos ao número de estirpes de MRSA e *E.coli* Sensíveis, Intermédias ou Resistentes à ação de determinados grupos antimicrobianos.

Tabela 1. Número de isolados de *E.coli* e *S. aureus* Sensíveis (S), Intermédias (I) e Resistentes (R) a alguns grupos antimicrobianos em Portugal em 2010 e 2011. **Adaptado** de *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) em

<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS->

[Net/database/Pages/graph_reports.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/graph_reports.aspx) (Último acesso a 22-01-2013).

Estirpe bacteriana	Número total de isolados (2010/2011)	Grupo de antibiótico	Número estirpes S (2010/2011)	Número estirpes I (2010/2011)	Número estirpes R (2010/2011)
<i>E.coli</i>	1921/1917	Fluoroquinolonas	1396/1386	1/ 9	524/ 522
	1976/1963	Aminopenicilinas	872/ 849	1/ 4	1103/ 1110
	1979/1962	Aminoglicosídeos	1729/ 1640	12/ 7	238/ 315
<i>S.aureus</i>	1633/ 1307	Meticilina	761/ 594	0/0	872/ 713

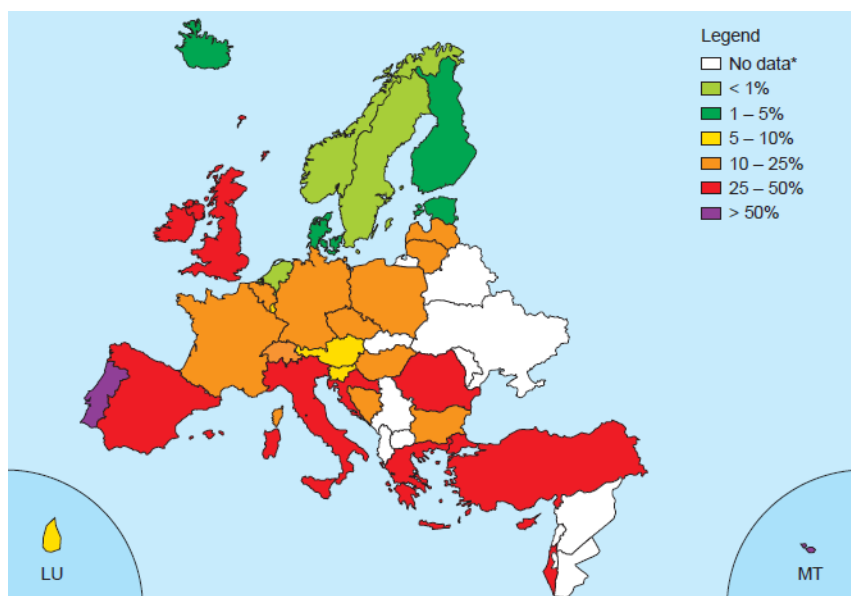


Figura 12. Proporção de estirpes MRSA em 2008. Para os países que não reportaram dados ou reportaram menos de 10 isolados não são apresentados dados.

Fonte: *European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)*, 2008.

Por outro lado, entre 1999-2008, Portugal não faz parte da pior estatística para isolados de *E.coli* com resistência aos aminoglicosídeos e cefalosporinas de 3ª geração. Contudo, Portugal apresenta entre 25-50% de isolados de *E.coli* com resistência a fluoroquinolonas (Figura 13). Contudo, em 2010 e 2011, tal não se verifica (Tabela 1).

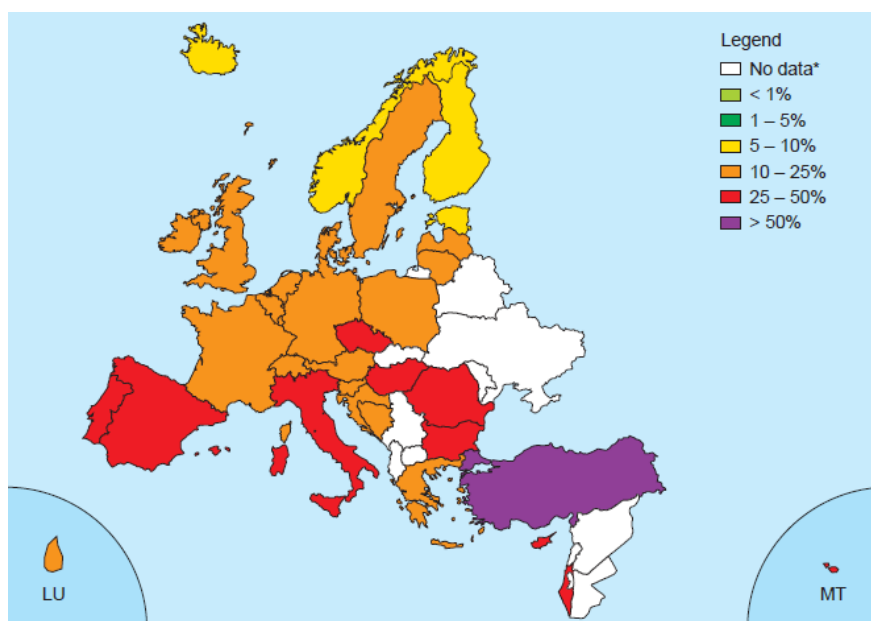


Figura 13. Proporção de isolados de *E.coli* resistentes à fluoroquinolonas em 2008. Para os países que não reportaram dados ou reportaram menos de 10 isolados não são apresentados dados. **Fonte:** *European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)*, 2008.

Analisando os dados mais recentes, também se observou uma ligeira diminuição no número de isolados resistentes às fluoroquinolonas (Tabela 1). A participação nesta rede internacional de sistemas de vigilância nacional é de extrema importância, uma vez que proporcionam informação atualizada às Autoridades Regionais de Saúde acerca do consumo e resistência antimicrobianos. A partir desta monitorização, é possível conhecer a necessidade de implementação de novas medidas nacionais que visem contrariar a tendência do aumento das resistências.

2.5 Compostos derivados das quinoxalinas *N,N*-dióxido

As quinoxalinas ($C_8H_6N_2$) são uma importante classe de compostos aromáticos heterocíclicos também conhecidas como Benzoparadiazinas, 1,4-Benzodiazina, Benzopirazinas, 1,4-Diazanaftaleno, Fenopiazinas, Fenpiazinsa, Quinazinas ou Benzo(a)pirazinas. Estas moléculas apresentam um anel complexo constituído por um anel de benzeno associado a um anel de pirazina e são utilizadas como corante e como antibiótico (Figura 14). (Database ChEBI)

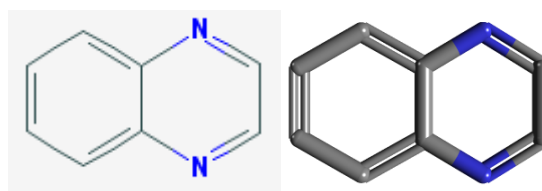


Figura 14. Estrutura química geral 2D e 3D da quinoxalina. **Fonte:** <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7045>

Nas últimas décadas têm sido documentados diversos estudos que fazem referência à atividade biológica de novos compostos derivados das quinoxalinas mono ou di *N*-óxido. Um exemplo destes compostos são os derivados das quinoxalinas 1,4-dióxido, que apresentam átomos de oxigénio (O) ligados aos átomos de azoto (N) no anel aromático. (Diab-Assef *et al*, 2002) (figura 15) Esta oxidação dos átomos de azoto confere aos compostos uma grande diversidade de propriedades biológicas. Essa diversidade deve-se ao facto dos compostos aromáticos poderem apresentar estruturas de ressonância denominados híbridos de ressonância onde ocorre deslocação dos eletrões sem ocorrer alteração na posição dos átomos que constituem a molécula. Deste modo, qualquer grupo ou átomo capaz de aceitar ou doar eletrões por efeito de ressonância vai afetar a distribuição de carga no anel aromático.

Os compostos derivados da quinoxalina 1,4-dióxido, diferem desta, por apresentarem substituintes (grupo amina, metil, benzil, benzoil, carboxamida, carbonitrilo) em uma ou mais posições da molécula. (Barea *et al*, 2012) Relativamente aos derivados da quinoxalina 1,4-dióxido, têm sido descritos como potenciais agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, antitumorais, antihelmínticos e inseticidas. Estudos efetuados neste âmbito revelaram resultados bastante promissores. (Carta *et al*, 2002) Alguns demonstram que alguns compostos derivados das quinoxalinas 1,4-dióxido apresentam atividade *in vitro* e *in vivo* anti-*M.tuberculosis* constituindo, assim, possíveis agentes no tratamento da tuberculose multirresistente. (Villar *et al*, 2008; Vicente *et al*, 2008) Outro estudo envolvia a avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e antifúngica de outros compostos derivados das quinoxalinas em *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Alguns também apresentaram boa atividade contra as estirpes estudadas. (El-Hawash *et al*, 2006) Outros compostos derivados das quinoxalinas 1,4-dióxido foram também testados quanto à sua capacidade para inibir a replicação do VIH-1, atuando sobre a transcriptase reversa. (Kleim *et al*, 1993) Estevez *et al*, (2011) efetuaram um estudo onde testaram a atividade do composto 2,6-dimethyl-

3-f-quinoxaline 1,4-dioxide contra a *Leishmania* e verificaram que havia inibição no seu crescimento em 50%.

Estes compostos, têm sido considerados igualmente como potenciais drogas bio-redutoras, uma vez que são convertidos em substâncias tóxicas através de reações de redução favorecidas em condições de hipóxia. Deste modo formam-se espécies reativas de oxigênio que podem causar danos oxidativos no DNA celular. (Azqueta *et al*, 2005) Por conseguinte, estes compostos tornam-se citotóxicos no microambiente tumoral e, na presença de oxigênio, a droga ativa volta ao seu estado não-tóxico. (Azqueta *et al*, 2005, 2007)

Pelos vários estudos efetuados, principalmente em microrganismos, tem-se observado resultados bastante promissores para compostos derivados das quinoxalinas. Assim, como as células bacterianas diferem das células humanas em muitos aspectos fundamentais, há mais oportunidades para desenvolvimento de novos fármacos. Em contraste, fungos, parasitas e vírus compartilham estruturas com células humanas e, por isso, os pesquisadores têm que lidar com menos locais de ação e maiores riscos de toxicidade nos indivíduos.

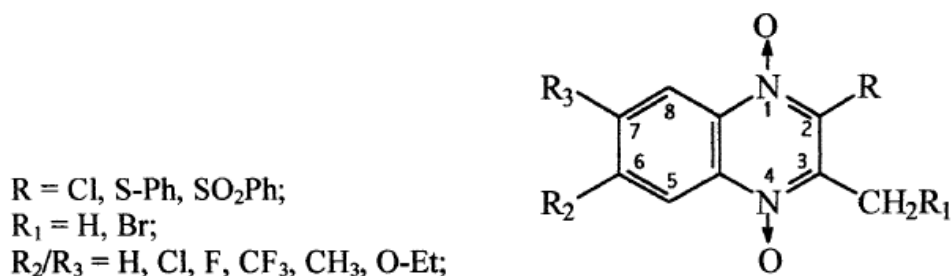


Figura 15. Estrutura química geral das quinoxalinas 1,4-dióxido. R – Cadeias laterais. **Fonte:** Carta *et al*, 2002.

2.6 Patogénios

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

O género *Staphylococcus* apresenta diversas espécies, mas apenas um pequeno número está associado a infeções humanas. Tratam-se de cocos Gram positivos com cerca de 1µm de diâmetro, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivos (permite diferenciá-los dos *Streptococcus*) e bastante tolerantes a elevadas

concentrações de cloreto de sódio (NaCl). (Plata *et al*, 2009) Dentro deste género, a espécie *S. aureus* é considerada a mais invasiva. Os *S. aureus* podem fazer parte da flora comensal normal da pele e das mucosas do Homem. (Plata *et al*, 2009; Malachowa & DeLeo, 2010) Cerca de 20 a 30% dos indivíduos estão colonizados por esta bactéria. (Plata *et al*, 2009) Nastaly *et al* (2010) e Otto (2010) referem que cerca de 1% destes indivíduos estão colonizados com estirpes MRSA. Cercenado (2011) refere que, atualmente, o principal problema são as estirpes MRSA e, de acordo com Overton *et al* (2011), constituem a maior causa de morbi-mortalidade. A taxa de mortalidade anual devido a infeções por MRSA nos Estados Unidos é maior do que a taxa de mortalidade resultante de infeções por outros agentes, nomeadamente o VIH. (Otto, 2010) Estirpes de *S. aureus* podem tornar-se patogénios oportunistas através da síntese de toxinas ou da invasão e destruição de tecidos, permanecendo assim uma causa significativa de morbi-mortalidade. (Onwubiko & Sadiq, 2011; Garnacho-Montero *et al*, 2011) Esta espécie é o agente etiológico de uma série de patologias, nomeadamente septicémia, endocardite, pneumonia e infeções na pele. Diversos autores consideram-na uma das principais causas de Infeções Adquiridas em Cuidados de Saúde (IACS) e adquiridas na comunidade. (Plata *et al*, 2009; Malachowa & DeLeo, 2010; McAdow *et al*, 2011) Durante muitos anos, as estirpes MRSA constituíram a principal causa de IACS. No entanto, as infeções causadas por MRSA estão a aumentar em todo o mundo em indivíduos que não tiveram contacto prolongado com os serviços de saúde. Deste modo, os autores fazem diferenciação entre estirpes MRSA-Associados à Comunidade (MRSA-AC) e MRSA-Associados ao meio Hospitalar (MRSA-AH). (Nastaly & Grinholc, 2010) A Figura 16 mostra as diferenças existentes entre ambos.

Characteristic	CA-MRSA	HA-MRSA
Clinical manifestation	Skin and soft tissue infections, “spider bites”, necrotizing pneumonia, sepsis (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)	Pneumonia, urinary tract, bloodstream, surgical site (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)
Risk groups	Young, drug users, prisoners, athletes, soldiers, men who had sex with men, selected ethnic populations (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)	Elderly people, healthcare workers, preterm neonate, long-term hospitalized patients (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)
Risk factors	Close physical contact, abrasion injuries, poor communal hygiene, hard skin contacts, school children (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)	Indwelling devices, catheters, lines, hemodialysis, prolonged hospitalization, long-term antibiotic use, close proximity to a patient in the hospital colonized with MRSA (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)
Transmission	Person-to-person spread: shared facilities (towels, pools etc.) Environment-to-person spread (shared sports equipment etc.) (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)	Person-to-person spread: healthcare staff (nurses, doctors, surgeons etc.) Environment-to-patient spread (hospital equipment etc.) (Robinson et al. 2008; Chavez and Decker 2008)
Resistance to antimicrobial agents	Susceptible to multiple antibiotics, β -lactam resistant (Fey et al. 2003; Huang et al. 2006)	Resistant to multiple antibiotics (Fey et al. 2003; Huang et al. 2006)
SCCmec type	IV, V, VII (Fey et al. 2003; Huang et al. 2006; Deurenberg and Stobberingh 2008)	I, II, III (Fey et al. 2003; Huang et al. 2006; Deurenberg and Stobberingh 2008)
PVL toxin	Usually present (Fey et al. 2003; Huang et al. 2006; Deurenberg and Stobberingh 2008)	Absent (Fey et al. 2003; Huang et al. 2006; Deurenberg and Stobberingh 2008)

Figura 16. Comparação das características das estirpes MRSA-AC e MRSA-AH. **Fonte:** Nastaly & Grinholc, 2010.

2.6.1.1 Organização do Genoma

O genoma do *S. aureus* é constituído por um cromossoma circular haploide, o que indica que alterações no seu genótipo influenciam diretamente a expressão fenotípica (exemplo: resistência antimicrobiana). (Fry & Baric, 2011) 75% do genoma corresponde a genes essenciais e, portanto, encontram-se em cerca de 95% dos *S. aureus* (exemplo: coagulase), enquanto os restantes 25% são constituídos por genes acessórios que variam entre estas estirpes bacterianas. (Plata *et al*, 2009; Fry & Baric, 2011) Os componentes acessórios consistem em EGM, nomeadamente os plasmídeos, os transposões, as sequências de inserção, os bacteriófagos, cassetes e ilhas de patogenicidade (Malachowa & DeLeo, 2010; Fry & Baric, 2011) Os determinantes de resistência que se encontram em plasmídeos são dispersos mais rapidamente dentro de determinado género e, posteriormente, outros géneros, do que aqueles que se encontram em genes nos cromossomas. (Giedraitiene *et al*, 2011) Os EGM podem codificar substâncias que conduzem a resistência antimicrobiana e/ou fatores de virulência. (Malachowa & DeLeo, 2010) Estes elementos podem ser transferidos entre espécies de *S. aureus*, mas também podem ser adquiridos de outras espécies bacterianas (*Enterococcus*) resultando em padrões de virulência e resistência que se alteram

continuamente. (Fry & Baric, 2011) A plasticidade do genoma do *S. aureus* confere-lhe capacidade para se adaptar a todas as condições ambientais, adquirir genes de resistência e mecanismos de regulação para se adaptar a concentrações crescentes de antibióticos. (Dumitrescu *et al*, 2010) Isto conduz a grandes dificuldades no desenvolvimento de fármacos direcionados para determinados alvos bacterianos. (Otto, 2010)

2.6.1.2 Mecanismos de Resistência aos β -lactâmicos

De acordo com EARSS, as estirpes MRSA são a principal causa de resistência aos antibióticos em infecções associadas aos cuidados de saúde em todo o mundo. O que torna este patógeno tão perigoso é a associação da resistência aos antimicrobianos com os seus fatores de virulência. (Otto, 2010)

A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser utilizado com sucesso para tratamento de diversas infecções bacterianas, incluindo infecções causadas por *S. aureus*. (Nastaly *et al*, 2010) Trata-se de um β -lactâmico e, portanto, a sua ação interfere com a síntese da parede celular bacteriana. (McCallum *et al*, 2010) Na década de 40 surgiram estirpes de *S. aureus* resistentes à penicilina devido à aquisição de penicilinase plasmídea. Inicialmente, esta resistência era restrita ao meio hospitalar, mas rapidamente se difundiu na comunidade (correspondem a 90% das estirpes de *S. aureus*). (Dumitrescu *et al*, 2010) Em 1959, foi introduzida na prática clínica um derivado semi-sintético da penicilina (metecilina) para tratar infecções causadas por *S. aureus* resistentes à penicilina (Garnacho-Montero *et al*, 2011) Um ano mais tarde, foi reportado num hospital em Inglaterra, o aparecimento de MRSA. (Dumitrescu *et al*, 2010) Assim sendo, os *S. aureus* podem tornar-se resistentes aos β -lactâmicos através de dois mecanismos. Um dos mecanismos corresponde à síntese de penicilinase, codificada pelo gene *blaZ*, que hidrolisa o anel β -lactâmico da penicilina inativando o antimicrobiano. (Malachowa & DeLeo, 2010) O segundo mecanismo está associado à presença de EGM e confere resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos da classe das penicilinas e não só (McCallum *et al*, 2010) Estirpes de *S. aureus* podem apresentar EGM variáveis denominados *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) que carregam os determinantes centrais para a resistência à metecilina e outros antimicrobianos β -lactâmicos. (Rice, 2012) Esta *cassette* é adquirida e inserida no cromossoma de uma estirpe sensível aos β -lactâmicos e num gene denominado *orfX*

(*open reading frame*). (Malachova & DeLeo, 2010; Nastaly *et al*, 2010) Alguns autores apontam como hipótese para a aquisição desta *cassette* a transferência horizontal entre *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativas (*S.epidermidis*). (Otto, 2010; Dumitrescu *et al*, 2010) Esta teoria surgiu porque esta *cassette* tem sido encontrada apenas no gênero *Staphylococcus*. Contudo, a sequenciação do *Macroccoccus caseolyticus* resistente à meticilina revelou a presença de um complexo *mec* que parece ser precursor do complexo *mec* do *S. aureus*. (Dumitrescu *et al*, 2010) Atualmente, conhecem-se oito tipos distintos da *cassette* SCC*mec* (I ao VIII). As suas diferenças residem na presença de genes de resistência a antimicrobianos que não são β -lactâmicos, presença de transposões, plasmídeos integrados e sequências de inserção (IS). (Malachova & DeLeo, 2010) O Tipo I, V, VI e VII (baixo peso molecular) determinam a resistência apenas aos antibióticos β -lactâmicos; (Fry & Barie, 2011) o tipo IV tem sido associado aos MRSA-AC mantendo a susceptibilidade aos antibióticos não- β lactâmicos; Os Tipos II e III (elevado peso molecular) conferem resistência aos β -lactâmicos e a grande parte dos antibióticos não β -lactâmicos, nomeadamente macrólidos, lincosamidas e aminoglicosídeos. (Fry & Barie, 2011, Malachova & DeLeo, 2010) De acordo com Dumitrescu *et al* (2010) SCC*mec* tipo I, II e III estão presentes em estirpes MRSA-AH enquanto os restantes tipos (mais recentes) estão presentes nas estirpes MRSA-AC. Isto vai de encontro ao defendido por alguns autores, de que estirpes MRSA-AC tiveram origem nas estirpes MRSA-AH.

O SCC*mec* consiste em três regiões principais: o complexo *mec*, o complexo cassette chromosome recombinases (*ccr*) e regiões J (*joining region*). Recentemente, foram identificados SCC*mec* com dois complexos *ccr*. (*International Working Group on the Classification Staphylococcal Cassette Chromosome-IWG-SCC*, 2009) O complexo *mec* apresenta o gene *mecA*, genes reguladores do gene *mecA* e Sequências de Inserção associadas. (IWG-SCC, 2009; Nastaly *et al*, 2010; Dumitrescu *et al*, 2010) Contudo, o *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome* (IGW-SCC) refere que existem SCC*mec* que não possuem o gene *mecA*. Atualmente, conhecem-se cinco classes de complexo *mec* (A a E). (Dumitrescu *et al*, 2010) Todas as classes possuem *mecA* associada a IS431. De acordo com o *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome*, o complexo *mec* da Classe A contém o gene *mecA*, genes reguladores *mecR1* e *mec1*, região hipervariável (HVR) e IS431 a *downstream* do gene *mecA*; se

pertencer à Classe B contém o gene *mecA*, o gene regulador *mecR1* truncado devido à inserção de IS1272 *upstream* do *mecA*, HVR e a sequência IS431 a *downstream* do gene *mecA*; o complexo *mec* da Classe C contém o gene *mecA*, *mecR1* truncado pela IS431 *upstream* de *mecA*, HVR e IS431 *downstream* de *mecA*; a Classe D é constituída por *mecA*, Δ *mecR1*, IS431 *downstream* de *mecA*, mas não a *upstream*. Plata *et al* (2009) fazem referência à Classe E, constituída por *mecA*, *mecR1* truncado, HVR e IS431. Dentro destas classes têm sido descritas diversas variantes (C1, C2, A1, A2). (Plata *et al* 2009) A Figura 17 mostra a estrutura das classes e das suas variantes.

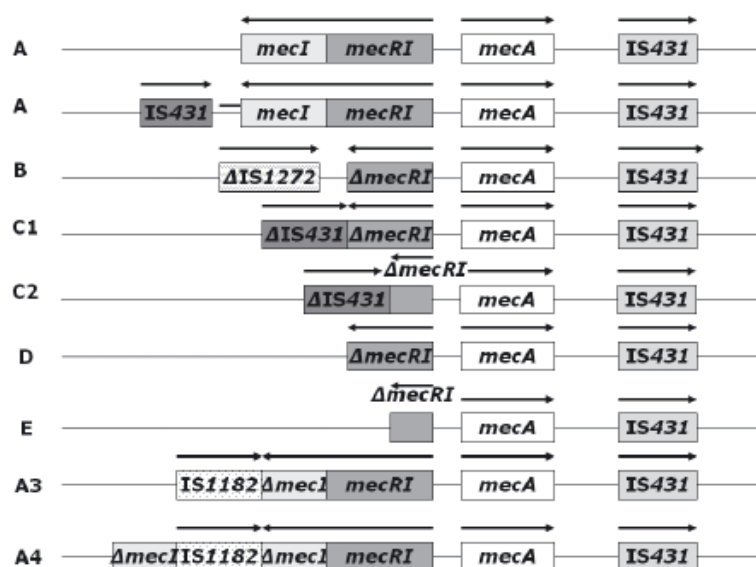


Figura 17. Classes estruturais do complexo *mec*. As setas indicam a direção da transcrição e à esquerda é apresentada a designação da Classe. **Fonte:** Plata *et al*, 2009.

O gene *mecA* codifica uma *Protein Binding Penicilin* alternativa (PBP2a), pertencente ao grupo proteico das transpeptidases, que está envolvida na síntese da parede celular bacteriana. (Malachova & DeLeo, 2010) A PBP2a possui baixa afinidade para a meticilina (devido a uma alteração no seu sítio ativo) e para antibióticos β -lactâmicos. A biossíntese da parede celular continua mesmo na presença do antimicrobiano. Assim, a expressão desta proteína confere resistência a estes antimicrobianos. (Malachova & DeLeo, 2010; EARSS,2008) A sua expressão é regulada pelos genes reguladores *mec1* e *mecR1* que se encontram *upstream* do *mecA*. (IWG-SCC, 2009; Plata *et al*, 2009; Malachova & DeLeo, 2010) O gene *mec1* codifica um repressor da transcrição (Mec1), enquanto o *mecR1* codifica a proteína MecR1 que

deteta a presença de β -lactâmicos através do seu domínio extracelular. (Dumitrescu *et al*, 2010) Este domínio, uma vez ligado ao antimicrobiano, ativa o domínio intracelular conduzindo à ativação de uma protease que degrada o repressor Mec1, permitindo a expressão de *mecA*. Por outro lado, os genes *ccr* são responsáveis pela integração e excisão do SCC*mec* num sítio específico do cromossoma, SCC*mec* attachment site (*attB_{scc}*) na extremidade 3' da sequência de leitura, denominada *orfX*. (Malachova & DeLeo, 2010; Dumitrescu *et al*, 2010) O complexo dos genes *ccr* é constituído por três genes distintos, *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*. (Dumitrescu *et al*, 2010) Estes genes têm sido encontrados em sequências de DNA de *S. aureus* com similaridades até 50% (IWG-SCC, 2009) Os genes *ccrA* e *ccrB* são classificados em quatro alotipos (*ccrAB1-4*), enquanto o *ccrC* é o único alotipo conhecido. (IWG-SCC, 2009; Dumitrescu *et al*, 2010) A Figura 18 mostra a classificação dos genes *ccr* e a percentagem de similaridade entre eles.

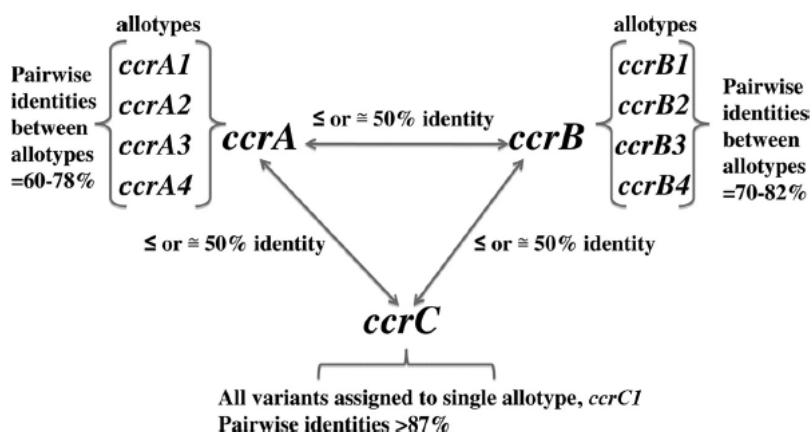


Figura 18. Classificação dos genes *ccr*. **Fonte:** *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome*.

Por último, o SCC*mec* é constituído por 3 regiões J que contêm vários genes ou pseudogenes cuja função não parece ser essencial para a bactéria. (Malachova & DeLeo, 2010) O mecanismo de resistência aos antimicrobianos do grupo β -lactâmicos é o que está melhor descrito.

2.6.1.3 Mecanismo de Resistência aos glucopéptidos

Atualmente os glucopéptidos constituem o tratamento de eleição para as infeções causadas por estirpes Gram positivas, nomeadamente MRSA. (Cafiso *et al*, 2012) Contudo, a sua ampla utilização em todo o mundo tem conduzido a uma

emergente diminuição da sensibilidade de estirpes MRSA para os antimicrobianos deste grupo (Otto, 2010; Cafiso *et al.*, 2012) A vancomicina foi introduzida na clínica em 1958 e, veio a tornar-se o antimicrobiano de escolha no tratamento de infecções causadas por estirpes MRSA. Em 1996 foi reportado pela primeira vez a existência de uma infecção causada por *S. aureus* resistente à ação da vancomicina. (Dumitrescu *et al.*, 2010) Durante três décadas de utilização clínica em que não foram reportadas resistências a este antimicrobiano, chegou a ser especulado que seria impossível o desenvolvimento de resistência. (Cafiso *et al.*, 2012). As estirpes com sensibilidade diminuída à vancomicina caracterizam-se fenotipicamente por apresentarem uma Concentração Mínima Inibitória (CMI) entre 4 a 16 µg/mL. (Fry & Barie, 2010; Dumitrescu *et al.*, 2010) Tem-se como exemplo as estirpes de *S. aureus* com sensibilidade intermédia à vancomicina, denominadas VISA (*Vancomycin Intermediate S. aureus*) ou GISA (*Glycopeptide-intermediate S. aureus*). (Dumitrescu *et al.*, 2010) De acordo com Mendes (2010) foi reportado apenas um caso de VISA em Portugal. As estirpes de *S. aureus* sensíveis à vancomicina (VSSA) distinguem-se das VISA por apresentarem uma CMI inferior a 2 µg/mL. A Tabela 4 contém os valores da CMI da vancomicina que nos permite classificar a estirpe e verifica-se comparativamente com os valores mais antigos, que a CMI tem aumentado (*MIC creep*). Esses valores foram alterados pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) com o intuito de diminuir a falha no tratamento de infecções. (Fry & Barie, 2010)

Tabela 2. CMI de vancomicina (µg/mL) para definir estirpes de *S.aureus* como sensíveis, intermédias ou resistentes ao antimicrobiano. Comparação entre valores antigos e os atuais. **Adaptado:** Fry & Barie, 2010.

Antigos Breakpoints (µg/mL)	Novos Breakpoints (µg/mL)
Suscetíveis ≤ 4	Suscetíveis ≤ 2
Intermédio 8-16	Intermédio 4-8
Resistente ≥32	Resistente ≥16

Recentemente, alguns autores têm feito referência a estirpes precursoras das estirpes VISA denominadas hétero-VISA (hVISA), que apresentam uma $CMI \leq 4 \mu\text{g/mL}$. (Richter *et al.*, 2011; Mendes, 2010) Contudo, existem estirpes de hVISA que podem crescer em concentrações superiores a 4 µg/mL. (Mendes, 2010) Essas estirpes, na presença da vancomicina, têm capacidade para alterar o seu fenótipo para intermédio ou

resistente e, na ausência deste, podem reverter para o fenótipo original. Assim, os hVISA não apresentam uma resposta uniforme ao antimicrobiano. (Fry & Barie, 2010)

O mecanismo de resistência das estirpes VISA ainda não está bem definido, ao contrário das estirpes *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA). (Malachova & DeLeo, 2010; Dumitrescu *et al*, 2010) O fenótipo VISA parece resultar de um espessamento adaptativo da parede celular quando exposto a pressões ambientais, nomeadamente a utilização da vancomicina. Esse espessamento impede o acesso da vancomicina ao seu alvo bacteriano. (Fry & Barie, 2010; Mendes, 2010) Cafiso *et al* (2012) referem que estas estirpes têm origem em hVISA. Por outro lado, os fenótipos de resistência à vancomicina foram inicialmente reportados em estirpes de *Enterococcus*. (James *et al*, 2012) Numa situação de co-infecção por *Enterococcus* e MRSA, este último pode adquirir resistência à vancomicina por transferência genética horizontal a partir de *Vancomycin resistance Enterococcus* spp. (VRE). Portanto, a resistência é adquirida por EGM (plasmídeo do VRE), nomeadamente o transposição Tn1546, que é o responsável pela resistência à vancomicina (Malachova & DeLeo, 2010) Diversos operões de resistência aos glucopéptidos têm sido descritos (VanA, B, C, D, E, F, G, L, M), mas o VanA e VanB permanecem os clinicamente relevantes. Ambos têm sido identificados em transposições. (Rice, 2012) O transposição Tn1546 contém o operão VanA, que é constituído pelo gene *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY* e *vanZ*. (Fry & Barie, 2010) Quando a estirpe bacteriana adquire os genes de resistência à vancomicina, nomeadamente *vanA* e *vanH*, ocorre uma alteração do ligando D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lact (D-Alanina-D-lactato) que possui uma afinidade 1000 vezes menor para os glucopéptidos. (Fry & Barie, 2010; McCallum *et al*, 2010; James *et al*, 2012). Os genes *vanX* e *vanY* codificam a síntese de dipeptidases que estão envolvidas na hidrólise de D-Ala-D-Ala *wild type* (McCallum *et al*, 2010) *vanY* e *vanZ* codificam para proteínas acessórias que parecem estar envolvidas na resistência à teicoplanina. Daí que, as estirpes VRSA também são resistentes à teicoplanina. (Mendes, 2010) Em 2010 foi documentado que as estirpes VISA também são resistentes à teicoplanina. (Dumitrescu *et al*, 2010)

Apenas na presença da vancomicina é que os genes de resistência são expressos. A regulação dos determinantes de resistência é efetuada por *vanS* e *vanR* que codificam proteínas transmembranares envolvidas na transdução de sinal na presença de vancomicina ou teicoplanina extracelular (Figura 19). (McCallum *et al*, 2010;

Malachova & DeLeo, 2010) VanS é uma proteína bifuncional, uma vez que na presença de um indutor autofosforila-se e ativa a resposta de vanR por fosforilação (atua como Kinase) e, na ausência desse atua como fosfatase, desfosforilando vanR e inibindo a transcrição. Quando vanR é ativado, liga-se a promotores upstream de *vanRS* e dos genes *vanHAX* ativando a transcrição. (McCallum *et al*, 2010) A resposta será a indução do operão *vanA*, resultando na resistência aos glucopéptidos. (McCallum *et al*, 2010; Malachova & DeLeo, 2010) De acordo Mendes (2010), em Portugal ainda não foi reportado nenhum caso VRSA.

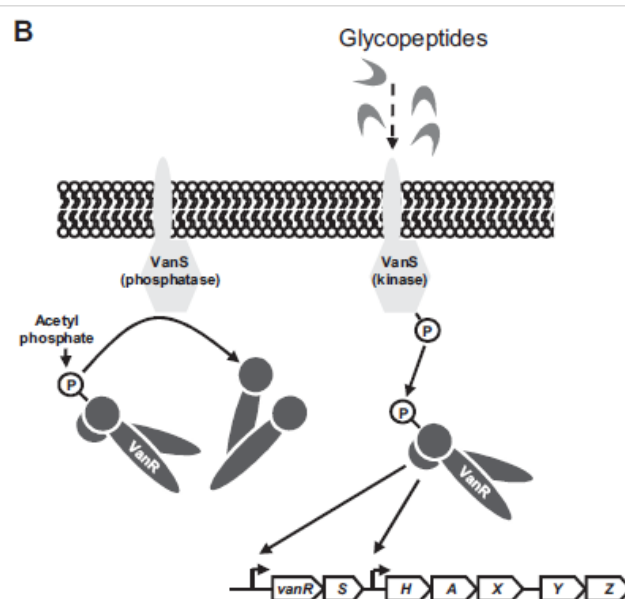


Figura 19. Regulação da resistência aos glucopéptidos. **Fonte:** McCallum *et al*, 2010.

O tratamento prolongado com glucopéptidos é a causa para emergência destas estirpes que por sua vez constituem a causa para a falha no tratamento de infecções por MRSA. (Yamakawa *et al*, 2012) Deste modo, as estirpes VISA e VRSA também constituem sérios problemas de saúde pública.

A teicoplanina, um antimicrobiano pertencente ao mesmo grupo, constitui outra opção terapêutica. Desde então, estas estirpes têm-se disseminado por todo o Mundo. Com o aumento das resistências à meticilina e vancomicina, têm surgido novos antimicrobianos. Por exemplo o linezolid (pertencente à classe das oxazolidinonas) tem sido avaliado em alguns pacientes. (Gao *et al*, 2010) Contudo, recentemente tem ocorrido uma resistência emergente dos *S. aureus* a este antimicrobiano devido a tratamentos prolongados. (Otto, 2010) Essa resistência foi atribuída a uma mutação no

gene 23S rRNA. (McCallum, *et al*, 2010) Por outro lado, já foi descrita e aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) uma cefalosporina de quinta geração com atividade anti-MRSA e VRSA. (Saravolatz, 2011)

2.6.1.4 Mecanismo de Resistência às fluoroquinolonas

Como referido anteriormente as fluoroquinolonas exercem a sua ação sobre a subunidade A do ADN girase nas bactérias Gram negativas e a topoisomerase IV pode ser o alvo em alguns microrganismos Gram positivos. (Collin *et al*, 2011) Geralmente, a resistência a esta classe de antimicrobianos está associada a mutações cromossômicas, mas resistência associada a plasmídeos também já foi documentada. (Rice, 2012) O principal mecanismo de resistência de estirpes Gram positivas às fluoroquinolonas corresponde à modificação do alvo enzimático, nomeadamente topoisomerase IV (gene *parC* e *parE*). Mutações na *gyrA* e *parC* conduzem a falhas na replicação e, conseqüentemente, o antimicrobiano não se consegue ligar ao seu alvo. (Giedraitiene *et al*, 2011).

2.6.2 *Escherichia coli*

Esta espécie bacteriana aeróbia ou anaeróbia facultativa é um patógeno humano ubíquo, comumente responsável por Infecções do Trato Urinário (ITU) e bacteriémias em todas as faixas etárias. (EARSS, 2008) Para além disso, também é responsável por infecções em diversos órgãos (Sistema Nervoso Central, sistema biliar) e cuja gravidade é muito variável, podendo ir desde uma cistite que se resolve espontaneamente ou conduzir a uma septicémia que põe em risco a vida do doente. (Rogers *et al*, 2011)

2.6.2.1 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

Nas últimas décadas, tem-se verificado um aumento gradual da resistência bacteriana às principais escolhas terapêuticas que visam combater as estirpes patogênicas pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. (Coque *et al*, 2008; Guenther *et al*, 2011) Um dos principais mecanismos de resistência que dificultam o tratamento antimicrobiano nas infecções causadas por bactérias Gram negativas é a produção de β -lactamases, nomeadamente ESBLs, que atuam hidrolisando o anel β -lactâmico dos antibióticos pertencentes a este grupo e cujo alvo são as PBP. (Harada *et al*, 2008; García-Hernández *et al*, 2011) Estirpes produtoras de ESBL, principalmente *E.coli*, estão a tornar-se cada vez mais frequentes em isolados clínicos de todo o mundo.

O termo “Espectro Estendido” indica que as estirpes produtoras de ESBLs são capazes de hidrolisar um amplo espectro de antimicrobianos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos, nomeadamente penicilinas, oximino-cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima, cefepima e ceftriaxona) e monobactams (aztreonam). (Harada *et al*, 2008; Guenther *et al*, 2011) Contudo, até há pouco tempo pensava-se que as ESBLs não eram ativas contra cefamicinas (cefoxitin) e carbapenemos (imipenem, meropenem). (Guenther *et al*, 2011) Mais recentemente, alguns autores têm feito referência a um grupo de β -lactamases que hidrolisam carbapenemos (Carbapenemases), nomeadamente NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase), KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, classe A) e OXA (Oxacilinase, classe D). (Guenther *et al*, 2011)

2.6.2.1.1 β -lactamases

Atualmente, conhecem-se mais de 400 β -lactamases cujo mecanismo de ação é o mesmo, mas diferem no substrato sob o qual atuam e na suscetibilidade a substâncias inibitórias. (Guenther *et al*, 2011; García-Hernández *et al*, 2011) Estas enzimas podem ser classificadas em serina β -lactamases e zinco β -lactamases (ou metalo- β -lactamases), de acordo com a substância que se encontra no sítio ativo. Por outro lado, também têm sido classificadas em termos funcionais (fenotípico) e moleculares. Em 1989, Bush publicou um esquema de classificação com base nas características funcionais das enzimas, que foi modificado em 1995 por Bush-Jacoby-Medeiros (Figura 20). De acordo com modelo de classificação mais recente (1995) as enzimas são divididas em grupos de acordo com o perfil do substrato e inibidor. (Bush *et al*, 1995) O Grupo 1 corresponde às cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico (classe molecular C), nomeadamente a AmpC. Algumas destas estirpes produzem β -lactamases que conferem resistência a cefamicinas (MOX-2); o Grupo 2 engloba enzimas de largo espectro que, na sua grande maioria, são inibidas pelo ácido clavulânico (penicilinas e/ou cefalosporinas) pertencentes à classe molecular A e D. Neste grupo existem subgrupos (2a - 2f), devido ao aparecimento de ESBLs mutantes; o Grupo 3 inclui enzimas que apresentam zinco no sítio ativo (metalo- β -lactamases) e que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e Carbapenemos (Figura 20) (Dhillon & Clarck, 2012); No Grupo 4 incluem-se as penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico e não têm correspondência com nenhuma classe molecular. (Ruben, 2012) No entanto, o esquema de classificação mais utilizado baseia-se na homologia das enzimas, denominada classificação de Ambler (1980). Nesta classificação as β -lactamases são

divididas em 4 classes (A a D), sendo que as classes A, C e D são denominadas serina- β -lactamases enquanto as β -lactamases pertencentes à classe B são metalo- β -lactamases (Harada *et al*, 2008; Dhillon & Clarck, 2012)

Grupo Bush- Jacoby- Medeiros	Grupo Bush em 1989	Classe Molecular	Substratos preferidos	Enzimas representativas
1	1	C	Cefalosporinas	AmpC proveniente de Gram negativos
2a	2a	A	Penicilinas	Penicilinases provenientes de Gram negativos
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	A	Penicilinas, cefalosporinas de largo espectro, monobactamos	TEM-3 até TEM-26, SHV-2 até SHV-6
2br	Não incluído	A	Penicilinas	TEM-30 até TEM-36
2c	2c	A	Penicilinas	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	D	Penicilinas, cloxacilina	OXA-1 até OXA-11
2e	2e	A	Cefalosporinas	Cefalosporinas provenientes do <i>Proteus mirabilis</i>
2f	Não incluído	A	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos	NMC-A proveniente do <i>Enterobacter cloacae</i>
3	3	B	Maioria dos β -lactâmicos, incluindo carbapenemos	CccrA proveniente de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	4	Não determinado	Penicilinas	Penicilinases proveniente da <i>P. cepacia</i>

Figura 20. Esquemas de classificação de β -lactamases, onde se incluem a classificação funcional e molecular. **Adaptado:** (Bush *et al*, 1995).

As ESBLs têm sido encontradas sobretudo em bactérias Gram negativas, mas a vasta maioria pertence à família das *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp, *E.coli*, *Citrobacter*). Nesta, os tipos de ESBLs mais comuns são a TEM (Temoneira), SHV (Sulphydryl Variable), OXA e a CTX (Cefotaximase)-M. As três primeiras são consideradas ESBLs clássicas (Guenther *et al*, 2011) A maioria das ESBLs tem evoluído a partir de mutações no centro ativo das β -lactamases plasmídeas clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1). Variantes da TEM e SHV são sobretudo encontradas em estirpes de *E.coli*. (García-Hernández *et al*, 2011) Essas variantes clássicas foram as primeiras a ser identificadas nos anos 80, altura em que a sua prevalência era elevada. (Dhillon & Clarck, 2012) Outros grupos de ESBLs menos frequentes incluem PER (*P.aeruginosa* e *Acinetobacter*) VEB e GES (*P.aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*). Grupos raros incluem SFO, TLA, BEL, IBC, entre outros. (Cantón *et al*, 2008) Na atualidade, a CTX-M (classe A) é a enzima que apresenta maior incidência, que se encontra mais amplamente distribuída e é considerada clinicamente a mais importante. (Naseer and Sundsfjord, 2011; García-Hernández *et al*, 2011) Para além disso, também é responsável pela resistência às penicilinas, cefalosporinas (exceto cefamicina) e monobactams. (Rogers *et al*, 2011) Tendo em conta apenas a homologia das sequências aminoacídicas, a CTX-M é dividida em 5 grupos: CTX-M1 (subgrupo A e B), 2, 8, 9 e 25. (Naseer and Sundsfjord, 2011) Rogers *et al* (2011) refere a existência de outros subgrupos, nomeadamente CTX-M3, CTX-M14, CTX-M27, CTX-M32 e CTX-M61. Esta enzima é assim designada devido à sua capacidade de hidrolisar o cefotaxime e, o M deve-se ao fato de ter sido descoberta em Munich. (Guenther *et al*, 2011; Rogers *et al*, 2011) A CTX-M15 é a mais prevalente na *E.coli* ST131, e confere-lhe resistência sobretudo às fluoroquinolonas. (Rogers *et al* 2011) De acordo com Rogers *et al* (2011), existe um clone pandémico de *E.coli* ST131, produtora de ESBL e responsável, principalmente, pela resistência adquirida aos antimicrobianos na comunidade. A epidemiologia desta estirpe não está bem caracterizada na Europa. Contudo, dados do Norte da América sugerem que esta estirpe é a principal causa de resistência aos antimicrobianos nos Estados Unidos. (Rogers *et al* 2011) Conhecem-se aproximadamente 100 tipos de sequências desta ESBL.

Os genes que codificam a produção de β -lactamases podem estar localizados em

cromossomas ou plasmídeos bacterianos, sendo as enzimas consequentemente designadas cromossômicas ou plasmídeas. Um exemplo de β -lactamases cromossômicas são as AmpC e como exemplo codificado em plasmídeos tem-se a MOX-1.

Em termos epidemiológicos, a prevalência e a distribuição das ESBLs não é estática, uma vez que se tem observado uma expansão territorial de diferentes estirpes e o aparecimento emergente de estirpes que co-expressam vários tipos de ESBLs. (Cantón *et al*, 2008; García-Hernández *et al*, 2011) A presença de bactérias produtoras de ESBLs já foi reportada em todo o Mundo (Norte da América, Sul da América, Africa, Europa, Ásia). (Dhillon & Clarck, 2012) De acordo com a base de dados do *Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial* (TEST) a prevalência de estirpes produtoras de ESBLs é maior na América Latina (44%), seguida da Ásia (22,4%), da Europa (13.3%) e Norte da América (7.5%). (Dhillon & Clarck, 2012) A maioria destas enzimas foi descrita pela primeira vez em países Europeus. De acordo com García-Hernández (2011), em países como Itália, Portugal e Irlanda há tendência para um aumento da frequência das estirpes produtoras de ESBL (entre 10-25%), contrariamente aos Estados Unidos. Um artigo mais recente vai de encontro ao referido por este autor: a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs na Europa tem aumentado a uma velocidade alarmante. (Dhillon & Clarck, 2012) Atualmente, investigadores centram-se sobretudo no conhecimento das enzimas mais frequentes e na sua distribuição geográfica. (García-Hernández *et al*, 2011) A CTX-M é o exemplo de ESBL que apresenta uma maior disseminação mundial e mais rápida. (Naseer and Sundsfjord, 2011) A rápida disseminação de estirpes multirresistentes e a limitação nas opções de tratamento das infeções causadas por este tipo de microrganismos conduz a uma urgência de desenvolvimento de novas terapêuticas farmacológicas. Este, por sua vez, condiciona a uma rápida atuação no combate a infeções graves diminuindo a morbi-mortalidade dos doentes.

2.6.2.2 Mecanismos de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas

Os mecanismos de resistência bacteriana a este grupo de antibióticos têm emergido nos últimos anos devido à sua má utilização. As mutações cromossômicas em genes que codificam os alvos destes antibióticos são os mecanismos clássicos de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas. A acumulação de mutações nestes genes conduz a aumentos nos valores de CMI.

Os determinantes de resistência encontrados em plasmídeos incluem proteínas

Qnr (pertencem à família PRP-*Pentapeptide Repeat Family*) que protegem a DNA girase da ação do antibiótico, o AAC (6')-Ib-cr acetilase (modifica as quinolonas) e bombas de efluxo ativas QepA. (EARSS, 2008; Michon *et al*, 2011) Apesar destes mecanismos conferirem um baixo nível de resistência permitem a evolução clínica da resistência. (EARSS, 2008) Os genes *qnr* são principalmente encontrados em plasmídeos MDR mas também já foram descritos genes *qnr* cromossômicos em espécies bacterianas ambientais (Michon *et al*, 2011)

De acordo com a *European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals* (EASSA) existem elevados níveis de resistência à ciprofloxacina em estirpes de *E. coli* encontradas em galinhas. As bactérias que possuem genes de resistência aos antibióticos que se encontram, por exemplo, nos intestinos desses animais, podem contaminar as carcaças durante o corte e originar patologias humanas nos consumidores. Posteriormente dificultam o tratamento antibiótico. Daí a importância da implementação de medidas não só a nível da saúde humana mas também animal.

2.7 Resistência combinada

Cada vez mais se tem observado estirpes com resistência a mais do que um antimicrobiano (resistência combinada). De acordo com os dados do EARSS (2008) apenas 2 países que participaram no estudo acerca da resistência combinada (total de 33 países) apresentaram estirpes de *E.coli* com resistência combinada acima dos 20% (Turquia e Bulgária). Os restantes países mostraram um aumento significativo. A Figura 21 mostra os fenótipos de resistência mais comuns encontrados neste estudo.

Resistance pattern	Number	% of total
fully susceptible	22,396	47,1
Single resistance (to indicated drug classes)		
aminopenicillins only	14,572	30,6
fluoroquinolones only	1,335	2,8
aminoglycosides only	117	0,2
Resistance to two classes of antimicrobial drugs		
aminopenicillins+fluoroquinolones	3,845	8,1
aminopenicillins+3 rd generation cephalosporins	462	1,0
aminopenicillins+aminoglycosides	557	1,2
fluoroquinolones+aminoglycosides	150	0,3
Resistance to three classes of antimicrobial drugs		
aminopenicillins+fluoroquinolones+aminoglycosides	1,422	3,0
aminopenicillins+fluoroquinolones+3 rd generation cephalosporins	1,092	2,3
aminopenicillins+3 rd generation cephalosporins+aminoglycosides	155	0,3
Resistance to four classes of antimicrobial drugs		
aminopenicillins+3 rd generation cephalosporins+fluoroquinolones+aminoglycosides	1,474	3,1

Figura 21. Fenótipos de resistência mais comuns encontrados em estirpes de *E.coli* no estudo do EARSS (2008) que envolveu 33 países. Fonte: *European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)*, 2008.

2.8 Leveduras

O aumento drástico da frequência de infecções fúngicas nas últimas 3 décadas parece estar associado ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos, como resultado de procedimentos cirúrgicos, cancro, SIDA, idade avançada e transplantes. (LaFayette et al, 2010; Vandeputte *et al*, 2011; Hamoud *et al*, 2011) Por outro lado, alguns indivíduos podem apresentar alterações genéticas que lhes conferem uma maior suscetibilidade para infecções fúngicas. (Vinh, 2011) Também a resistência antifúngica adquirida e inata continua a aumentar apesar da introdução de novos agentes antifúngicos. (Vandeputte *et al*, 2011; Pfaller, 2012) A resistência antifúngica é definida do mesmo modo que a resistência bacteriana.

2.8.1 *Candida* spp

A multirresistência tem conduzido a mudanças na etiologia das infecções bacterianas e fúngicas, tal como aconteceu com as candidíases. A *Candida* spp é capaz de crescer como levedura, pseudohifa ou hifa e pode fazer parte da flora comensal mucocutânea. Contudo, em determinadas situações, pode tornar-se patogénica, sendo responsável por candidíases superficiais (pele, mucosa oral, mucosa genital) e invasivas (órgãos e fluidos estéreis). (Vinh, 2011) Inicialmente, as candidíases eram sobretudo

causadas por estirpes *C.albicans* e, atualmente, estirpes *Candida* não-*albicans* também são responsáveis por essas infecções. (Brusselsaers *et al*, 2011) Atualmente, na prática clínica, são utilizados apenas 4 classes moleculares de antifúngicos para tratar infecções fúngicas sistêmicas (análogos do fluoropirimidina, polienos, azóis, e equinocandina). (Vandeputte *et al*, 2011) Dos grupos de antifúngicos referidos, os azol são os mais utilizados em infecções causadas por *Candida*, e atuam ligando e inibindo a enzima lanosterol 14- α -esterol dimetilase) envolvida na síntese do ergosterol da membrana celular fúngica (LaFayette *et al*, 2010; Pfaller, 2012). Deste modo, o bloqueio da biossíntese do ergosterol (principal esteroide de membrana) por parte do fármaco, conduz a uma alteração estrutural e funcional na membrana celular inibindo o crescimento fúngico. (LaFayette *et al*, 2010; Pfaller, 2012) Durante um tratamento antifúngico, pode ocorrer um aumento da resistência à droga utilizada devido à aquisição de mecanismos de resistência por parte do fungo. (Vandeputte *et al*, 2011) Espécies de *Candida* podem desenvolver vários mecanismos de resistência aos antifúngicos para neutralizar efeitos fungicidas ou fungistáticos. (Vandeputte *et al*, 2011; Pfaller, 2012) Os mecanismos mais comuns são a indução de bombas de efluxo (transportadores ABC) e mutações pontuais no gene que codifica a enzima alvo dos compostos “azol” (*ERG11*). Os transportadores ABC mais frequentemente associados à resistência antifúngica na *C.albicans* são o CDR1 e o CDR2 (*Candida Drug Resistance* 1 e 2) codificados pelo gene *CDR1* e *CDR2*, respectivamente. Estes transportadores parecem atuar contra todos os fármacos “azol”. (Vandeputte *et al*, 2011) Por outro lado, as bombas de efluxo também podem ser codificadas gene *MDR* (*Multidrug Resistance*), dando origem ao transportador MDR, que geralmente é seletivo para o fluconazol (Pfaller, 2012). O transportador MDR é considerado o único transportador de membrana *Major Facilitator Superfamily* (MFS) envolvido na resistência às drogas “azol”. (Schubert *et al*, 2011) Estas bombas de efluxo atuam diminuindo a acumulação da droga no interior da célula fúngica. (Vandeputte *et al*, 2011)

O segundo mecanismo de resistência está associado à presença de mutações pontuais no gene *ERG11* que codifica a enzima lanosterol 14- α -esterol dimetilase, envolvida na síntese da membrana celular fúngica. Essas mutações conduzem a alterações no alvo enzimático, que permitem obter uma diminuição da afinidade entre o antimicrobiano e o respectivo alvo ou inibição da ligação entre ambos. (Pfaller, 2012; Vandeputte *et al*, 2011) Este mecanismo de resistência também atua em drogas “azóis”

(Lewis *et al*, 2012) A Figura 22 mostra os mecanismos de resistência adquirida em estirpes de *Candida*.

Resistance mechanism	Drugs affected
Alterations in the ergosterol biosynthetic pathway (i.e., loss of function in <i>ERG3</i>)	Triazoles Amphotericin B
Alterations in drug target binding (i.e., <i>ERG11</i> mutation)	Triazoles
Mitochondrial dysfunction	Triazoles
Drug efflux (i.e., <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i>), <i>MDR1</i>	Triazoles

Figura 22. Mecanismos de resistência adquirida em espécies de *Candida*.

Fonte: Lewis *et al*, 2012.

2.8.2 *Saccaromyces cerevisiae*

A *S.cerevisiae* é uma levedura de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo que tal como os restantes microrganismos necessita de nutrientes para o seu crescimento, nomeadamente fontes de carbono, azoto e fósforo. (Conway *et al*, 2012) Esta levedura é muito utilizada na indústria alimentar (panificação, cervejaria) como fermento biológico. (Hamoud *et al* 2011) É também considerada um excelente modelo experimental para estudo da biologia celular eucariótica, uma vez que permite fazer inferências sobre evolução de espécies (sobretudo através da sequência genética) e possui um curto tempo de duplicação. (Botstein & Fink, 2011) Quanto à sua patogenicidade, esta levedura muito raramente é responsável por infeções nos humanos. Contudo, alguns autores têm divulgado casos de fungémia recorrente em pacientes imunodeprimidos hospitalizados por longos períodos de tempo, sobretudo nas UCI. De acordo com Hamoud *et al* (2011), estes pacientes são expostos à levedura, particularmente quando ingerem suplementos dietéticos com o objetivo de tratar a diarreia. Os mecanismos pelo qual causa infeção podem ser variados, desde contaminação de algalias, migração através de mucosas danificadas, entre outras. Mais recentemente, um autor faz referência a uma doença inflamatória multisistémica, com etiologia ainda desconhecida e que, em geral, é

defendido um modelo infeccioso. (Galeone *et al*, 2012) Trata-se da doença de Beçhe't. Nesta doença existe uma série de microorganismos que constituem potenciais agentes, de entre as quais se encontra a *S.cerevisiae*. (Galeone *et al*, 2012) Esta conclusão surge do facto de terem sido encontrados anticorpos anti-*S.cerevisiae* em pacientes com patologia de Beçhe't intestinal e em familiares destes. (Oshitani *et al*, 2001) Os mecanismos de resistência que podem ocorrer nesta estirpe são os mesmos que foram referidos para a *Candida* spp.

Sendo assim...

De acordo com Brusselaers *et al* (2011), nas últimas décadas, o aumento da multirresistência por parte das bactérias Gram negativas relativamente às bactérias Gram positivas deve-se à escassez de novos antimicrobianos ativos contra bactérias Gram negativas. Quanto às infeções causadas pelo género *Candida*, maioritariamente a espécie *C.albicans*, têm aumentado dramaticamente nas últimas décadas. (Rodloff *et al*, 2011) Para as bactérias abordadas anteriormente, *S. aureus* e *E. coli*, não existem artigos recentes publicados que envolvam o estudo da atividade de compostos derivados das quinoxalinas *N,N*-dióxido nestas estirpes. Contudo, um estudo efetuado em 1978 revelou que compostos derivados das quinoxalinas 1,4-dióxido induzem degradação de DNA na *E. coli* em proliferação e na ausência de proliferação. (Suter *et al*, 1978)

Azqueta *et al* (2007) refere que existem estudos que demonstram que os compostos derivados das quinoxalinas *N,N*-dióxido são mutagénicos em bactérias e leveduras, e carcinogénicos em ratos.

As estirpes selecionadas para este estudo como modelos procariotas foram o *S.aureus* ATCC 6538, *S.aureus* ATCC 6538P, *S.aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* sensível à ciprofloxacina (S3R9), *E. coli* resistente à ciprofloxacina (S3R22), *E. coli* TEM-1, *E. coli* TEM CTX-M9, *E. coli* AmpC MOX-2, *E. coli* CTX-M2 e *E. coli* CTX-M9. A *C. albicans* ATCC 10231 e *S. cerevisiae* PYCC 4072 foram selecionados como modelos eucariotas. Os motivos desta escolha são apresentados ao longo da fundamentação teórica.

Objetivos

Objetivos

Objetivo Geral:

Avaliar a atividade antimicrobiana da quinoxalinas e seus derivados *N,N*-dióxido em modelos procariotas (bactérias Gram positivas e Gram negativas) e eucariotas (leveduras);

Objetivos específicos:

- Verificar se a quinoxalina 1,4-dióxido (QNX) e seus derivados, em diferentes concentrações apresentam atividade contra bactérias Gram positivas, nomeadamente *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 29213; Gram negativas, tais como a *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* sensível à ciprofloxacina (S3R9), *E. coli* resistente à ciprofloxacina (S3R22), *E. coli* TEM-1, *E. coli* TEM CTX-M9, *E. coli* AmpC MOX-2; *E. coli* CTX-M2 e *E. coli* CTX-M9; e leveduras, *C. albicans* ATCC 10231 e *S.cerevisiae* PYCC 4072, aplicando o método de difusão em disco;

- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos compostos que apresentem halos de inibição do crescimento pelo método de difusão em disco, aplicando o método de Microdiluição;

- Efetuar o estudo do crescimento microbiano ao longo do tempo na ausência e na presença dos compostos na CMI e, em simultâneo, verificar a viabilidade celular;

-Avaliar a evolução no crescimento de um modelo eucariota (*S.cerevisiae* PYCC 4072) na ausência e presença dos compostos que apresentarem atividade antimicrobiana, de forma a inferir alterações provocadas em células eucariotas humanas.

CAPÍTULO 2

Material e Métodos

2. Material e Métodos

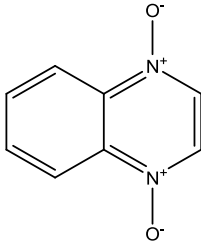
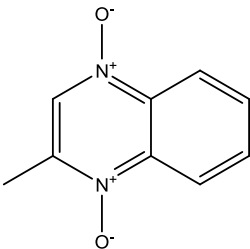
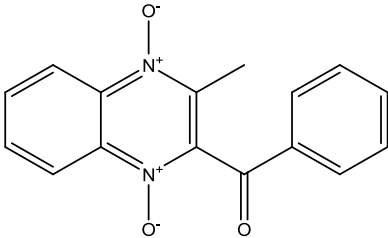
2.1 Material

2.1.1 Quinoxalina *N,N* - dióxido e seus derivados

Os compostos químicos cuja atividade antimicrobiana foi testada neste estudo foram fornecidos pela Prof^a Doutora Maria das Dores Ribeiro da Silva do Departamento de Química do Centro de Investigação em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (CIQ-FCUP). O nome e a respetiva estrutura química dos compostos encontra-se na Tabela 3.

Prepararam-se 50 mL de soluções *stock* para cada um dos oito compostos químicos com uma concentração final de 500µg/L. Como os compostos químicos são termicamente estáveis, de acordo com os estudos efetuados pelo CIQ-FCUP (Ribeiro daSilva *et al*, 2004), foram autoclavados no *AJC Uniclave 88* a 120°C durante 20 minutos. A partir de cada solução prepararam-se soluções padrão com as seguintes concentrações: 500µg/L, 100µg/L, 50µg/L, 20µg/L, 5µg/L, perfazendo um volume final de 10mL. De acordo com os resultados obtidos para estas concentrações no método de difusão em disco, verifica-se se é ou não necessário realizar ensaios adicionais para novas concentrações.

Tabela 3. Estrutura química da quinoxalina 1,4-dióxido e seus derivados.

Quinoxaline-1,4-dioxide (QNX)	2-methylquinoxaline-1,4-dioxide (2MQNX)	2-methyl-3- benzoylquinoxaline-1,4-dioxide (2M3BenzoilQNX)
		

2-methyl-3-benzylquinoxaline-1,4-dioxide (2M3BQNX)	2-amino-3-cyanoquinoxaline-1,4-dioxide (2A3CQNX)	3-methyl-2-quinoxalinecarboxamide-1,4-dioxide (3M2QNXC)
2-hidroxi-phenazine-1,4-dioxide (2HF)	3-methyl-N-(2-methylphenyl)quinoxalinecarboxamide-1,4-dioxide (3MN(2MF)QNXC)	

2.1.2 Estirpes microbianas

Os modelos procariotas (Gram positivos e Gram negativos) e eucariotas selecionados para este estudo foram armazenados a -80°C utilizando um sistema de crioconservação de estirpes microbianas (VIBAKSTORE, Barcelona). As estirpes procariotas utilizadas para avaliar a sua suscetibilidade aos compostos referidos, incluem *S. aureus* ATCC 6538 (SELECTROL, UK), *S. aureus* ATCC 6538P resistente à penicilina (SELECTROL, UK), *S. aureus* ATCC 29213 (SELECTROL, UK), *E. coli* ATCC 25922 (Ref: 84204, *LiofilChem*, Italy), *E. coli* S3R9 (sensível à ciprofloxacina); isolada de amostras de água na Universidade Católica Portuguesa), *E. coli* S3R22 (multirresistente, incluindo ciprofloxacina e penicilina; isolada de amostras de água na Universidade Católica Portuguesa), *E. coli* TEM CTX-M9, *E. coli* TEM-1, *E. coli* AmpC MOX-2, *E. coli* CTX-M2, *E. coli* CTX-M9. Os modelos eucariotas testados para verificar a suscetibilidade aos compostos foram a *C. albicans* ATCC 10231 (SELECTROL, UK) e a *S. cerevisiae* PYCC 4072 (UNL, Portugal). As estirpes estudadas “não ATCC” foram disponibilizadas pelo Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) da Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto (ESTSP) do

Instituto Politécnico do Porto (IPP). A Tabela 4 apresenta as estirpes selecionadas para avaliar a sua suscetibilidade aos compostos químicos.

Tabela 4. Modelos procariontes e eucariontes selecionados para avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos.

Modelos procariontes	Modelos eucariontes
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	
<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>C.albicans</i> ATCC 10231
<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.cerevisiae</i> PYCC 4072
<i>E.coli</i> TEM CTX-M9	
<i>E.coli</i> TEM-1	
<i>E.coli</i> AmpC MOX-2	
<i>E.coli</i> CTX-M2	
<i>E.coli</i> CTX-M9	
<i>E.coli</i> S3R9	
<i>E.coli</i> S3R22	

2.1.3 Meios de cultura

Os meios de cultura são substâncias sólidas ou líquidas que permitem a nutrição, crescimento, multiplicação e seleção de microrganismos. Os meios de cultura sólidos utilizados para o crescimento e isolamento das estirpes (obtenção de culturas puras), e para a realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram reconstituídos e autoclavados (121°C durante 15 minutos) de acordo com as indicações do fabricante. Os meios de cultura sólidos foram distribuídos em placas de Petri e armazenados a 4°C após solidificação. Quanto ao meio de cultura líquido, após reconstituição, foi distribuído em tubos de ensaio e, posteriormente, foi autoclavado de acordo com as indicações do fabricante.

Trypticase Soy Agar (TSA) – O meio de cultura TSA (CULTIMED, Espanha) é um meio de cultura sólido, bastante utilizado para o crescimento e isolamento de diversos tipos de microrganismos. O seu conteúdo em peptona de soja e peptona de caseína constitui uma importante fonte de azoto, o que permite crescimento ótimo de

um grande número de microrganismos exigentes e não exigentes. Neste estudo, foi utilizado para crescimento e isolamento das bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Tryptone Soy Broth (TSB) – O meio de cultura TSB (CULTIMED, Espanha) é um meio de enriquecimento (líquido) que também permite o desenvolvimento de um grande número de microrganismos, devido à sua constituição (Peptona de soja e de caseína). Para além disso, também é utilizado em ensaios de suscetibilidade aos antimicrobianos, nomeadamente no método de microdiluição.

Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) – Este meio de cultura é utilizado para crescimento e isolamento de fungos, nomeadamente leveduras, quando não são necessárias condições especiais. Neste estudo, o meio foi preparado com extrato de levedura (SIGMA, Alemanha), peptona de soja (CULTIMED, Espanha), glucose (MERK, Alemanha) e agar (LIOFILCHEM, Itália), que fornecem os nutrientes necessários para um ótimo crescimento celular (aminoácidos, azoto, vitaminas).

Mueller-Hinton agar - O meio de cultura *Mueller-Hinton* (CULTIMED, *España*), é um meio de cultura sólido, recomendado para ensaios de suscetibilidade aos antimicrobianos (método de difusão em disco), uma vez que, neste meio, crescem bem a maioria das bactérias patogénicas e praticamente não contêm substâncias inibidoras de sulfamidas e trimetropim (timidina e timina).

2.1.4 Outros reagentes e equipamentos

Neste estudo também foi utilizada água destilada autoclavada, solução salina a 0,9% de NaCl (*Carlo Erba Reactifs*, France), placas de *Petri*, frascos de *SHOTT*, micropipetas *Orange Scientific* (10, 100 e 1000 μ L), discos em branco (Liofilchem, Itália), discos de ciprofloxacina com 5 μ g (Oxoid, UK) e cefoxitin com 30 μ g (Oxoid, UK), pinças, ansas estéreis de 10 μ L (Gosselin), *eppendorfs* estéreis e microplacas (frilabo, Portugal).

Quanto aos equipamentos foram utilizados, o autoclave *AJC Uniclave 88*, o vórtex *Heidolph REAX 2000*, o espectrofotómetro *Thermo Scientific Genesys 20*, a incubadora *VWR Incubating Orbital Shaker* e a balança eletrónica *KERN ABJ 120 4M*.

2.2 Métodos

2.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

2.2.1.1 Método Difusão em disco

O princípio deste método baseia-se na difusão radial do antimicrobiano a partir de um disco de papel aplicado na superfície do meio de cultura inoculado (agar *Mueller-Hinton*). Os resultados são avaliados tendo em conta a presença ou ausência de halos de inibição de crescimento. Na presença desses halos é feita a medição, em milímetros, e o valor é



comparado com valores predefinidos, permitindo classificar a estirpe em questão em **Sensível**, **Intermédia** ou **Resistente** ao composto químico presente no disco. De acordo com o Documento M2-A8 do CLSI, uma estirpe é considerada **Sensível** quando o agente antimicrobiano na concentração testada pode ser usado para tratar uma infecção causada pelo microrganismo em questão. Por outro lado, uma estirpe é **Resistente** a determinado antimicrobiano quando o seu crescimento não é inibido pela concentração de composto testada. Quando a infecção por uma determinada estirpe pode ser tratada adequadamente em determinados locais do corpo, onde as drogas se concentram fisiologicamente, a estirpe é classificada como **Intermédia**. Contudo, a atividade antimicrobiana dos compostos estudados não é conhecida pelo que essa classificação não será utilizada.

Com o intuito de avaliar a potencial atividade antimicrobiana dos compostos, realizou-se o método por difusão em disco, tendo-se por base as *guidelines* do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para os antibióticos disponíveis comercialmente. (M2-A8: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*)

Após obtenção de culturas puras em TSA, as colónias isoladas foram utilizadas para preparar suspensões microbianas em solução salina (0,9% de NaCl) com uma densidade que variava entre 0,09 e 0,1 (equivalente à solução padrão McFarland de 0,5 - 1 a 2×10^8 UFC/mL). A densidade bacteriana foi medida no espectrofotómetro a 625nm após definição do branco (solução salina). Procedeu-se à inoculação das placas de *Mueller-Hinton* com uma zaragatoa, semeando por estrias em 3 direções diferentes para obtenção de uma inoculação uniforme. Posteriormente, efetuou-se a aplicação dos

discos em branco na placa inoculada, previamente mergulhados na solução dos compostos em estudo com o auxílio de uma pinça estéril.

Para as leveduras, mais concretamente para o género *Candida*, o CLSI preconiza a utilização de agar *Mueller-Hinton* suplementado com 2% de glicose e 0,5µg/mL de azul de metileno (Documento M44-A2: *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts*). Deste modo, sendo a *S.cerevisiae* também uma levedura, o teste de difusão em disco foi efetuado com base nesse documento. Para finalizar este método, as placas foram colocadas a incubar a 37°C durante 18-24h para as bactérias e leveduras. Após o período de incubação, observa-se a presença ou ausência de halos de inibição à volta do disco. A presença dos halos indica ausência de crescimento em redor do disco. O diâmetro dos halos de inibição foi medido em milímetros (diâmetro do disco são 6mm + diâmetro do halo). O diâmetro obtido está relacionado com a atividade antimicrobiana e é inversamente proporcional à CMI. Este procedimento foi efetuado em duplicado para cada composto e os resultados apresentados correspondem à média desses valores.

Através do método de difusão em disco também foram testados alguns antibacterianos de referência nestas estirpes, nomeadamente uma fluoroquinolona (ciprofloxacina) e um β-lactâmico (cefotaxima). O valor dos halos obtidos foram comparados com os valores definidos pelo CLSI (Documento M100-S17: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*).

2.2.1.2 Método de Microdiluição

Para determinar a CMI de todos os grupos estirpes/composto para as quais se obtiveram halos de inibição no método de difusão em disco foi utilizado o método de microdiluição. O procedimento foi efetuado segundo os critérios do CLSI para os antimicrobianos disponíveis comercialmente (M7- A7—*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition*). Inicialmente, prepararam-se as suspensões microbianas como referido para o método anterior. A microplaca utilizada era constituída por 96 poços aos quais se adicionaram 100 µL do meio de cultura TSB. Em cada coluna da microplaca, fez-se corresponder um grupo. Um dos poços serviu de controlo negativo (TSB), e outro de controlo positivo (TSB e estirpe microbiana). Nos restantes poços foram feitas diluições de 2x dos compostos (diluições de 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32), para

um volume final de 200 µL. No caso dos grupos estirpe/composto *E. coli*/ 2HF, *E. coli* TEM-1/ 2MQNX, *E. coli* TEM-1/ QNX e *E. coli* S3R9/ 2A3CQNX efetuaram-se diluições de 1,25x para que, em microplaca, se obtivesse, pelo menos, uma concentração superior e outra inferior ao valor de concentração mais baixa para a qual se observou halo de inibição pelo método de difusão em disco. Este ensaio foi efetuado em duplicado para cada grupo estirpe/composto. A microplaca foi colocada a incubar a 37°C durante 16-20h. Após este período, efetuou-se a leitura dos resultados, observando a presença ou ausência de turvação, que indica a presença ou ausência de crescimento, respetivamente. A menor concentração de composto com o qual se observou ausência de turvação corresponde à CMI.

2.2.2 Curvas de morte e viabilidade microbiana

Inicialmente, prepararam-se suspensões microbianas com densidade de 0,5 McFarland a partir de culturas puras obtidas em TSA, para os grupos estirpe/compostos que apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco. Transferiram-se 100 µL de cada suspensão para *ependorfs* estéreis contendo 1350µL de solução salina estéril (0,9% de NaCl) obtendo-se uma diluição de 1:10 (10^{-1}). De cada tubo com diluição 10^{-1} , homogeneizou-se e transferiu-se 100µL para outro *ependorf* contendo 900µL de solução salina, obtendo-se uma diluição de 1:100 (10^{-2}). Repetiu-se este procedimento até à diluição 1:1000000 (10^{-6}). Posteriormente, para determinar a diluição ótima, dividiu-se uma placa de meio de cultura em 7 regiões (TSA para bactérias e YEPD para levedura) e aplicou-se 20µL de cada diluição (em triplicado) na superfície do meio de cultura. Incubou-se a 37°C, durante aproximadamente 24h, e selecionou-se a diluição ótima para cada estirpe. A diluição ótima correspondia à diluição em que se observavam crescimento de colónias separadas e em número em que era possível efetuar a contagem das mesmas.

Posteriormente, prepararam-se novamente as suspensões microbianas em duplicado para cada estirpe (presença e ausência do composto). Uma das suspensões foi utilizada como branco (ausência de composto). A partir da outra suspensão microbiana, preparou-se uma solução com volume total 1,5 mL, contendo determinada quantidade do respetivo composto de forma a obter uma concentração final que corresponde à CMI determinada anteriormente. De 30 em 30 minutos, durante 180 minutos, e às 24h para as bactérias (tempo de geração aproximadamente 20 minutos) e de 30 em 30 minutos para

a levedura durante 210 minutos (tempo de geração é de aproximadamente 90 minutos) preparou-se a diluição ótima determinada para cada estirpe, e pipetou-se 20 µL (em triplicado) de cada *ependorf* (com e sem composto) para uma placa de meio de cultura sólido. As suspensões microbianas foram mantidas a 37°C. As divisões da placa do meio de cultura sólido correspondem ao tempo em minutos em que se efetuou determinada medição (0, 30, 60, 120, 150, 180 minutos e 24h). Incubaram-se as placas a 37°C durante aproximadamente 24h. Após incubação verificou-se se as células se encontravam viáveis (presença de colónias) e efetuou-se a contagem do número de colónias em cada medição (0, 30, 60, 120, 150, 180 minutos e 24h) Com o número de colónias foi possível determinar as unidades formadoras de colónias por mL (UFC/mL). Para tal utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{1,5 \text{ mL} \times \text{Número de colónias} \times \text{Fator de diluição}}{0,020 \text{ mL}}$$

Para finalizar, construíram-se as curvas de morte que relacionam o tempo (minutos) com o logaritmo de base 10 (Log_{10}) das UFC/mL de cada suspensão microbiana. A escala logarítmica permite representar escalas cujos valores dos dados são muito grandes facilitando a leitura do gráfico. Cada gráfico mostra a evolução do crescimento microbiano para uma estirpe na presença e na ausência dos compostos químicos. Este ensaio foi realizado em duplicado para validação dos resultados.

2.2.3 Curvas de crescimento num modelo eucariota não humano

Após conhecimento dos compostos que apresentam atividade antibacteriana procedeu-se à construção das curvas de crescimento para um modelo eucariota (*S. cerevisiae* PYCC 4072) na presença e ausência de cada um desses compostos (QNX, 2MQNX, 2A3CQNX, 3M2QNXC e 2HF). Apesar de não se ter detetado atividade antimicrobiana nos modelos eucariotas selecionados, pretendeu-se avaliar os efeitos que esses compostos apresentam no número de UFC/mL. Deste modo, será possível selecionar os compostos que devem ser testados em linhagens celulares.

Inicialmente determinou-se a diluição ótima para a *S.cerevisiae* do mesmo modo referido anteriormente para as bactérias. Posteriormente, prepararam-se suspensões microbianas com densidade entre 0,09 e 0,1 na escala de McFarland. Uma das suspensões foi utilizada como branco (ausência de composto). A partir das restantes

suspensões foram preparadas soluções com um volume total de 1,5mL e, cuja concentração final de cada composto seria de 500 µg/L. De 30 em 30 minutos, ao longo de 210 minutos, e às 24h, inocularam-se placas de YEPD com 20 µL de cada suspensão (presença e ausência do composto), em triplicado, e incubaram-se a 37°C durante 24h. Para cada grupo *S.cerevisiae*/composto utilizaram-se três placas de YEPD, em que, uma mostra os resultados dos 0 aos 90 minutos, outra placa dos 120 aos 210 minutos e por último, às 24h. Como as células se encontravam viáveis em todos os períodos de tempo, efetuou-se a contagem das colônias, calcularam-se as UFC/mL para cada período de tempo e construíram-se os gráficos UFC/mL *versus* tempo. Este ensaio também foi realizado em duplicado.

CAPÍTULO 3

Bioatividade do composto Quinoxalina -1,4-

dióxido (QNX)

3. Bioatividade de compostos derivados da QNX 1,4-dióxido

Este estudo teve como principal objetivo determinar a presença ou ausência de atividade antimicrobiana de oito compostos químicos (quinoxalinas 1,4-dióxido e seus derivados) em modelos procariotas Gram positivos e Gram negativos e modelos eucariotas. Como modelos procariotas Gram positivos utilizaram-se as estirpes de *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 6538P (resistente à penicilina) e *S. aureus* ATCC 29213. A *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* TEM CTX-M9, *E. coli* AmpC MOX-2, *E. coli* TEM-1, *E. coli* CTX-M2, *E. coli* CTX-M9, *E. coli* S3R9 (sensível à ciprofloxacina) e *E. coli* S3R22 (resistente à ciprofloxacina) constituíram os modelos procariotas Gram negativos. Os modelos eucariotas utilizados foram a *C. albicans* ATCC 10231 e *S.cerevisiae* PYCC 4072.

3.1 Atividade antimicrobiana do composto QNX

O primeiro método aplicado neste estudo foi o método de difusão em disco, considerado o método *standard* para avaliar a suscetibilidade de estirpes aos antimicrobianos. Este método permitiu avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana da QNX (e dos restantes compostos) nas estirpes selecionadas para este estudo. Uma vez que se verificou atividade contra uma das estirpes procedeu-se à determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pelo método de microdiluição. Após conhecer o valor da CMI foi avaliada a viabilidade através da presença/ausência de crescimento em meio sólido, e construída a curva de morte (Log_{10} UFC/mL *versus* tempo) para cada grupo estirpe/composto, na presença e ausência do composto. Este procedimento foi, também, aplicado aos restantes compostos estudados.

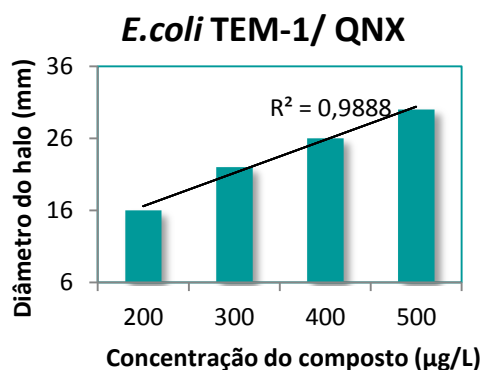
3.1.1 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana da QNX foi testada em todos os modelos eucariotas e procariotas já referidos. As concentrações inicialmente utilizadas nos ensaios de difusão em disco foram 500, 100, 50, 20, 5 e 0 $\mu\text{g/L}$. O zero corresponde ao controlo negativo, ou seja, trata-se de um disco em branco sem qualquer composto químico. Nestas concentrações apenas se observou a presença de halo de inibição de crescimento para *E.coli* TEM-1, na concentração de 500 $\mu\text{g/L}$ de QNX (halo de 30 mm de diâmetro).

Em meio sólido, à volta do disco em branco, não se observou halo de inibição, pelo que os resultados puderam ser validados.

Posteriormente, foi necessário testar as concentrações entre 500 e 100 µg/L, verificando-se que nas concentrações 400, 300 e 200 µg/L também ocorreu formação de halos de inibição com diâmetros de 26, 22 e 16 mm, respetivamente (Gráfico 1). Na concentração de 100µg/L, a QNX não apresentou atividade contra esta estirpe, pelo que não é representada no gráfico. O gráfico 1 permite verificar que existe uma relação de quase linearidade entre as concentrações testadas e o valor dos halos de inibição, uma vez que o valor do Coeficiente de Determinação (R^2) se encontra bastante próximo de 1 (0,9888). Assim, para o grupo *E.coli* TEM-1/QNX, 98% dos valores dos halos de inibição obtidos são explicados pela variação da concentração de QNX. Através deste gráfico é possível inferir o valor dos halos de inibição para concentrações entre 200 e 500µg/L. Apesar do gráfico mostrar atividade antibacteriana entre as concentrações de 200 e 500µg/L de QNX não se pode afirmar que o composto não apresenta atividade em concentrações mais baixas, isto porque se trata de um método influenciado por diversos fatores, nomeadamente pela velocidade de difusão do composto e outras limitações experimentais (disco, meio de cultura). Por exemplo, para uma dada concentração, o composto pode não se ter difundido no meio de cultura, devido às características deste na zona onde foi aplicado o disco ou até ao próprio disco. Portanto, a finalidade do teste de suscetibilidade, não é dar uma precisão matemática aos valores dos halos de inibição de crescimento. Contudo, o gráfico permite orientar na escolha das concentrações a serem testadas no método de microdiluição (quantitativo) para determinar a CMI para o grupo *E. coli* TEM-1/ QNX.

Gráfico 1. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ QNX.



Testaram-se discos de cefoxitin (30µg) e ciprofloxacina (5µg) numa placa de *Mueller-Hinton* inoculada a partir de uma suspensão de *E.coli* TEM-1, para verificar se esta estirpe era classificada como sensível, intermédia ou resistente a um β-lactâmico e a uma fluoroquinolona. Estes antibióticos serviram de controlo para esta estirpe e, em simultâneo, permitiram verificar se esta estirpe é resistente, sensível ou intermédia à ação de um antibiótico com estrutura semelhante à do composto estudado. Para a *E.coli* TEM-1 obtiveram-se halos de inibição de 36 mm e 20 mm de diâmetro para a ciprofloxacina e cefoxitin, respetivamente (Tabela 5). Deste modo, e tendo em conta os valores documentados pelo CLSI, esta estirpe é considerada sensível aos antibióticos testados (Tabela 6).

Tabela 5. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E.coli* TEM-1 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Ciprofloxacina 5 µg (CIP)	36
Cefoxitin 30 µg (FOX)	20

Tabela 6. Classificação das estirpes em resistente, intermédia ou sensível, de acordo com os valores dos diâmetros dos halos documentados pelo CLSI para enterobactérias.

	Classificação de acordo com diâmetro do halo de inibição (mm)		
	Resistente	Intermédia	Sensível
Ciprofloxacina (5µg)	≤15	16-20	≥21
Cefoxitin (30µg)	≤ 14	15-17	≥18

Tendo em conta que o método de difusão em disco é um método qualitativo, pode-se concluir que o composto QNX apenas apresentou atividade antimicrobiana na *E.coli* TEM-1. Por outro lado, não apresenta atividade antimicrobiana nas concentrações testadas nos modelos eucariotas e procariotas Gram positivos. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que o fato deste composto químico ter atuado especificamente numa estirpe, torna-o num composto de baixo espectro de atividade e, se

futuramente se comprovar que poderá ser utilizado para combater infecções causadas por *E.coli* TEM-1, provavelmente não interferirá de forma significativa com a flora comensal.

3.1.2 Método de Microdiluição

O método de microdiluição é um método quantitativo que também é bastante utilizado na avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. Este método apenas foi efetuado para os grupos estirpe/composto com os quais se observou atividade antimicrobiana no método de difusão em disco. Neste método, foi utilizado um controlo negativo, que correspondia ao poço da microplaca que continha apenas TSB, e um controlo positivo, que correspondia ao TSB juntamente com 10 µL da suspensão de *E. coli* TEM-1. Nos restantes cinco poços da microplaca foram efetuadas as diluições de 1:1,25, a partir da concentração inicial de 500 µg/L de QNX, de forma que fosse testada uma ou mais concentrações inferiores e superiores a 200 µg/L. Este valor corresponde à concentração mais baixa com a qual se observou formação de halo de inibição no ensaio de difusão em disco. Deste modo, foram obtidas as seguintes concentrações nesses poços da microplaca: 400, 320, 256, 204,8 e 163,8 µg/L. Após incubação por 16-20h, foi observada a presença ou ausência de turvação. A presença de turvação indica que houve crescimento microbiano. Como no controlo positivo havia turvação no meio de cultura e no controlo negativo não ocorreu turvação do meio, os resultados observados para os poços contendo as diluições puderam ser validados. Para as diluições observou-se presença de turvação apenas nos poços da microplaca que apresentavam concentrações de 204,8 e 163,8 µg/L de QNX. Nas restantes concentrações não se observou crescimento microbiano visível. A menor concentração em que não se observou turvação do meio (ausência de crescimento microbiano visível) foi na concentração de 256 µg/L. Assim, este valor corresponde à CMI de QNX capaz de inibir o crescimento da *E.coli* TEM-1. Este ensaio foi realizado em duplicado para validação dos resultados.

3.2 Curvas de morte *versus* viabilidade microbiana

Para construir o gráfico que relaciona o tempo com as Log₁₀ UFC/mL, na presença e na ausência do composto químico, inicialmente procedeu-se à determinação da diluição ótima para a *E.coli* TEM-1, como descrito anteriormente. Foram efetuadas

diluições de 10^{-1} a 10^{-6} a partir da suspensão microbiana com 0,5 McFarland e inoculadas em meio TSA. Após o período de incubação observou-se o número de colónias presentes em meio TSA e correspondente a cada diluição. A diluição na qual ocorreu crescimento de colónias de *E.coli* TEM-1 (células viáveis) em número em que era possível efetuar a sua contagem (colónias crescem isoladamente) corresponde à diluição ótima. Deste modo, a diluição ótima determinada para a *E.coli* TEM-1 foi 10^{-5} . (Tabela 7)

Tabela 7. Número de colónias de *E.coli* TEM-1 presentes em meio de cultura TSA para cada diluição.

Diluição	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Número de colónias de <i>E.coli</i> TEM-1	-	-	-	-	25	4

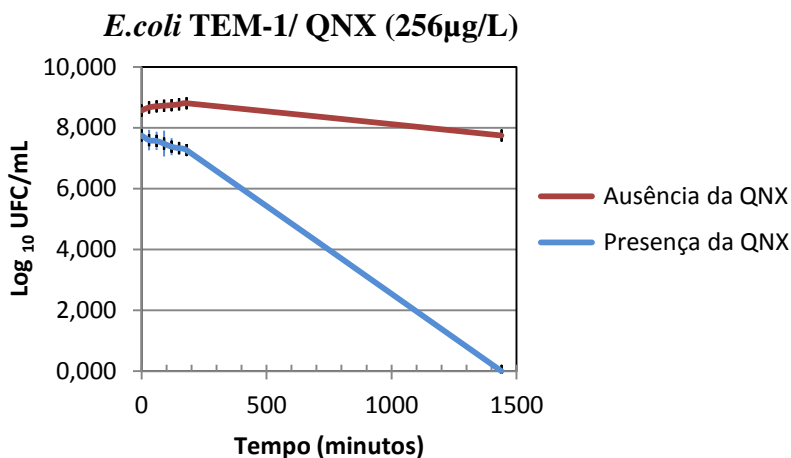
(-) Não foi possível efetuar contagem do número de colónias

Posteriormente, foram preparadas duas suspensões de *E.coli* TEM-1 em solução salina (NaCl a 0,9%). Uma das suspensões foi utilizada como branco, não sendo adicionado qualquer composto. A outra suspensão foi utilizada para preparar uma solução com volume total de 1,5 mL (suspensão microbiana e composto). De 30 em 30 minutos, durante 180 minutos e às 24h, prepararam-se as diluições ótimas. A partir de cada diluição, pipetaram-se 20 μ L (em triplicado) em meio de cultura TSA. A diluição ótima é importante pois facilita a contagem das colónias em meio sólido. O período de tempo selecionado deve-se ao facto das bactérias, em geral, apresentarem um tempo de geração de aproximadamente 20 a 30 minutos. Após as 24h de incubação a 37°C, procedeu-se à contagem das colónias viáveis (quando presentes) e determinaram-se as UFC/mL ao longo do tempo.

No Gráfico 2 é possível observar que, na ausência do composto químico, ocorre crescimento bacteriano até aproximadamente aos 180 minutos, uma vez que ocorreu um aumento nas UFC/mL. Contudo, às 24h observa-se uma diminuição nas UFC/mL para valores inferiores aos observados inicialmente (curva vermelha). O ligeiro aumento inicial nas UFC/mL deve-se ao crescimento bacteriano ao longo desse período de tempo. As bactérias têm capacidade para armazenar nutrientes que lhes permite crescer

em determinadas condições e períodos de tempo, nomeadamente onde não existem nutrientes disponíveis no meio extracelular. Portanto, entre os 180 minutos e as 24h não se sabe que variações ocorreram. Contudo, o objetivo consiste em conhecer se ao fim de 24h o valor de UFC/mL diminui ou aumenta comparativamente com o valor inicial e na presença ou ausência do composto. Esta explicação aplica-se aos gráficos dos próximos capítulos onde é feita referência à *E.coli* TEM-1. A curva azul no Gráfico 2 mostra a evolução no crescimento da *E.coli* TEM-1 na presença da QNX na CMI determinada (256µg/L). Na presença da QNX, comparativamente com ausência deste composto, observou-se uma diminuição nas UFC/mL ao longo do tempo, uma vez que o número de UFC/mL diminuiu. Às 24h não se observaram colónias viáveis no meio de cultura TSA, pelo que, no gráfico, 0 corresponde ao ponto (1440,0).

Gráfico 2. Evolução do crescimento da *E.coli*-TEM-1 ao longo do tempo (0, 30, 60, 120, 150 e 180 minutos), até às 24h (1440 minutos), na ausência da QNX (curva vermelho) e na presença da QNX na concentração de 256µg/L (curva azul).



Em suma, a presença da QNX na concentração 256 µg/L, inibe o crescimento da *E.coli* TEM-1, podendo constituir, no futuro, um novo agente antibacteriano.

CAPÍTULO 4

Bioatividade do composto 2-metilquinoxalina

1,4-dióxido (2MQNX)

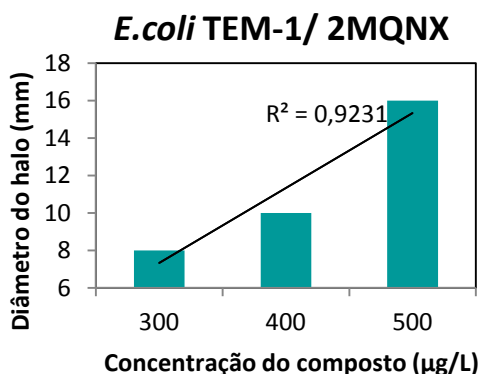
4. Bioatividade do composto 2MQNX

4.1 Atividade antimicrobiana do composto 2MQNX

4.1.1 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana deste composto foi testada nas concentrações de 500, 100, 50, 20, 5 e 0 µg/L para as estirpes referidas anteriormente. O zero corresponde ao controlo negativo (ausência de qualquer composto) e, neste ensaio, não ocorreu formação de halo de inibição de crescimento, pelo que os resultados puderam ser validados. Para as concentrações inicialmente testadas, apenas se observou halo de inibição para *E.coli* TEM-1 na concentração de 500 µg/L (16mm). Deste modo, testaram-se as concentrações entre 500 e 100 µg/L, verificando-se que, nas concentrações 400 e 300 µg/L, ocorreu formação de halos de inibição com diâmetro de 10 e 8 mm respetivamente. Nas restantes concentrações não se observaram halos de inibição do crescimento, pelo que não são representados no gráfico 3. Um valor de R^2 igual a 0,92 para o grupo *E. coli* TEM-1/ 2MQNX, indica que 92 % dos valores dos halos de inibição de crescimento obtidos são explicados pela variação da concentração de composto. Quanto maior a concentração de 2MQNX testada, maior é o diâmetro do halo (para concentrações entre 300 e 500µg/L). Como referido no capítulo anterior, esta estirpe é sensível à ciprofloxacina e também se mostrou sensível à ação deste composto derivado da QNX em determinadas concentrações, pelo que, se sugere que o método de ação possa ser semelhante. Este ensaio foi realizado em duplicado.

Gráfico 3. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ 2MQNX.



No método de difusão em disco, este composto apresentou atividade antimicrobiana apenas nas concentrações entre 300 e 500 µg/L para a *E.coli* TEM-1. Logo, tal como observado para o composto anterior, nas concentrações testadas, a 2MQNX não apresentou atividade contra o modelo eucariota e procariotas Gram positivos. Com base nestes resultados, pode-se sugerir que, o facto deste composto ter atuado apenas nesta estirpe torna-o num composto com baixo espectro de atividade, tal como a QNX. Se, futuramente, se comprovar que o 2MQNX pode ser utilizado no tratamento de infeções, provavelmente não interferirá significativamente com a flora comensal.

4.1.2 Microdiluição

Como ocorreu a formação de halo de inibição de crescimento para o grupo *E. coli* TEM-1/ 2MQNX utilizando o método de difusão em disco, efetuou-se o método de microdiluição. O procedimento adotado foi o mesmo descrito anteriormente. As concentrações finais nos poços contendo as diluições foram de 400, 320, 256, 204,8 e 163,8µg/L de 2MQNX. Como no controlo positivo havia turvação no meio de cultura e no controlo negativo não ocorreu turvação, os resultados observados para os poços contendo as diluições puderam ser validados.

Para as diluições, observou-se a presença de turvação nos poços da microplaca que apresentavam concentrações de 320, 256, 204,8 e 163,8 µg/L de 2MQNX. A menor concentração em que não se observou turvação do meio (ausência de crescimento microbiano) foi na concentração de 400µg/L. Assim, este valor corresponde à CMI de 2MQNX capaz de inibir o crescimento da *E.coli* TEM-1.

4.2 Curvas de morte versus viabilidade microbiana

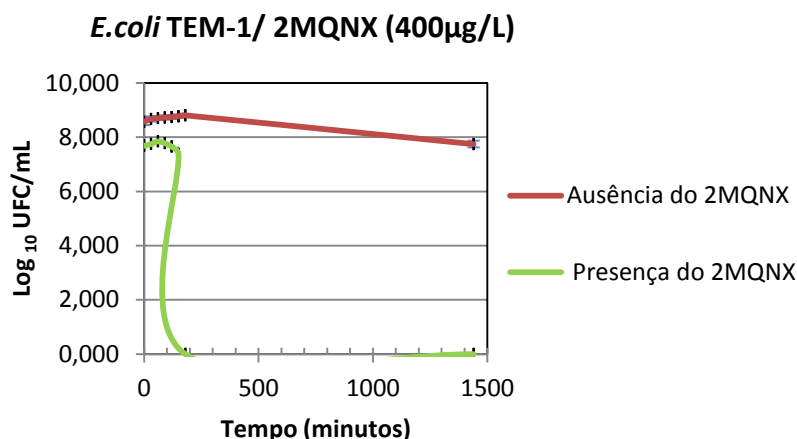
A atividade antimicrobiana para o composto 2MQNX foi observada apenas para a *E. coli* TEM-1, tal como se verificou para a QNX. A diluição ótima para esta estirpe corresponde a 10^{-5} . (Tabela 7)

Inicialmente, prepararam-se duas suspensões de *E.coli* TEM-1 em solução salina (NaCl a 0,9%). Uma das suspensões foi utilizada como branco, não sendo adicionado qualquer composto. A outra suspensão foi utilizada para preparar uma solução com volume final de 1,5 mL (suspensão microbiana e composto). De 30 em 30 minutos, durante 180 minutos, e às 24h, prepararam-se as diluições ótimas. A partir de cada diluição, pipetaram-se 20µL (em triplicado) em meio de cultura TSA. A viabilidade

celular, para a estirpe em estudo, foi indicada pela presença de crescimento em meio de cultura de TSA, em cada período de tempo estudado. Após a contagem do número de colônias viáveis, determinaram-se as UFC/mL ao longo do tempo que permitiu construir as curvas de morte na ausência e presença do composto.

Relativamente à curva vermelha presente no gráfico 4 (ausência do composto), a sua interpretação foi efetuada no capítulo anterior (mesma estirpe). Quanto à curva verde do mesmo gráfico, esta mostra a evolução no crescimento da *E.coli* TEM-1 na presença da 2MQNX na CMI (400 µg/L). Na presença deste composto (curva verde), comparativamente com ausência da 2MQNX (curva vermelha), observou-se um aumento no número de UFC/mL nos minutos iniciais (até 60 minutos) e, posteriormente, observa-se uma diminuição acentuada. Aos 180 minutos, já não foi possível observar células viáveis em meio de cultura sólido. Inicialmente, o aumento das UFC/mL indica que ocorreu crescimento bacteriano (presença de células viáveis), mesmo na presença do composto 2MQNX na CMI (400µg/L), uma vez que cada composto possui um determinado tempo para atuar. A diminuição das UFC/mL a partir dos 180 minutos, indica que o composto 2MQNX exerce uma ação no crescimento bacteriano mais precoce do que o composto anterior.

Gráfico 4. Evolução do crescimento da *E.coli*-TEM-1 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2MQNX (curva a vermelho) e na presença da 2MQNX na concentração de 400µg/L (curva verde).



Este composto é um derivado da quinoxalina 1,4-dióxido, diferindo estruturalmente deste pela presença do grupo metil (CH₃) na posição 2. A adição deste

grupo à quinoxalina não parece afetar a sua atividade, uma vez que, os resultados obtidos para a QNX e 2MQNX sugerem uma ação antibacteriana apenas contra a *E.coli* TEM-1 na CMI determinada para ambos. Contudo, o composto 2MQNX parece atuar mais rapidamente, uma vez que aos 180 minutos já não existiam células viáveis.

CAPÍTULO 5

Bioatividade do composto 2-metil-3-benzoilquinoxalina 1,4-dióxido (2M3BenzoilQNX)

5. Bioatividade do composto 2M3BenzoilQNX

5.1 Atividade antimicrobiana do composto 2M3BenzoilQNX

A atividade antimicrobiana do composto químico 2M3BenzoilQNX foi testada em todos os modelos procariotas (Gram positivos e negativos) e eucariotas utilizando método de difusão em disco. As concentrações testadas foram 500, 100, 50, 20, 5 e 0µg/L. Contudo, não se observou a formação de halos de inibição em nenhuma destas concentrações, pelo que não se prosseguiu para a determinação da CMI pelo método de microdiluição, nem para a determinação das curvas de morte e verificação da viabilidade. Este ensaio também foi realizado em duplicado. Portanto, as estirpes estudadas são resistentes à ação deste composto nas concentrações testadas. Futuramente, seria importante testar concentrações mais elevadas deste composto e, a manter-se a ausência de halos de inibição de crescimento, investigar os mecanismos que tornam estas estirpes resistentes à ação deste composto. Nessa resistência podem estar envolvidas características físicas e químicas da célula que impeçam a ação deste composto ou pode dever-se à própria estrutura química.

O composto 2M3BenzoilQNX é um derivado da quinoxalina 1,4-dióxido, diferindo desta por apresentar um grupo metil (CH₃) no carbono 2 do anel azotado e um grupo benzoil (C₆H₅CO) no carbono 3 do mesmo anel. Como no composto 2MQNX se observou atividade antimicrobiana e, este composto difere da quinoxalina 1,4-dióxido por apresentar apenas um CH₃ no carbono 2 do anel azotado, a adição do grupo benzoil (2M3BenzoilQNX) parece inibir a atividade antimicrobiana. Este pode ser o motivo pelo qual não ocorreu atividade antimicrobiana com nenhuma das estirpes, quer nos modelos procariotas, quer nos eucariotas. Um estudo recente, cujo objetivo consistia em testar treze compostos derivados da 2-ciano-3-(4-fenilpiperazina-1-carboxamida) quinoxalina 1,4-dióxido em estirpes de *Plasmodium falciparum* e *Leishmania infantum*, mostrou que a presença de grupos halogenados em determinadas posições da molécula melhoram a atividade antiparasitária desses compostos. (Barea *et al*, 2012) Portanto, a posição de um ou mais grupos funcionais e a natureza dos mesmos influenciam a atividade do composto. Deste modo, seria importante testar um composto derivado da quinoxalinas 1,4-dióxido que apresentasse apenas um grupo benzoil no carbono 3 do anel azotado para verificar se a ausência de atividade se mantém. Se permanecer sem atividade nas mesmas estirpes, poderá dever-se à presença apenas do grupo benzoil. Se,

por outro lado, apresentar atividade antimicrobiana pode significar que a presença, em simultâneo, do grupo metil no carbono 2 do anel azotado e do grupo benzoil no carbono 3 inibem a atividade do composto e nas concentrações testadas.

CAPÍTULO 6

Bioatividade de composto 2-metil-3-benzilquinoxalina 1,4-dióxido (2M3BQNX)

6. Bioatividade de composto 2M3BQNX

6.1 Atividade antimicrobiana do composto 2M3BQNX

A atividade do composto 2M3BQNX também foi testada em todas as estirpes já referidas nas concentrações 500, 100, 50, 20, 5 e 0µg/L. O primeiro método aplicado foi o de difusão em disco onde não se observou a formação de halos de inibição. Deste modo, não foram testadas novas concentrações (entre 500 e 100µg/L ou inferiores a 100), tal como aconteceu para outros compostos químicos. Para além disso, também não se procedeu à realização do método de microdiluição, nem da construção das curvas de mortes *versus* viabilidade celular. Deste modo, os modelos procariotas e eucariotas utilizados neste estudo também são resistentes à ação deste composto nas condições experimentais. Tal como foi referido para o composto anterior (2M3BenzoilQNX), a ausência de atividade antimicrobiana em todas as estirpes pode dever-se à sua estrutura química. Este composto também apresenta um grupo metil no carbono 2 do anel azotado e um grupo benzil (C₆H₅CH₂) do carbono 3 do mesmo anel (em vez do grupo benzoil presente no composto 2M3BenzoilQNX). Portanto, a adição do grupo benzil ou a sua presença em simultâneo com o grupo metil podem inibir a ação antimicrobiana deste composto nestas concentrações. Para obter esta resposta seria fundamental testar a atividade, nestas estirpes, de um derivado da quinoxalina 1,4-dióxido que apresentasse apenas um grupo benzil no carbono 3 do anel azotado.

Futuramente, também se poderia testar a atividade do composto 2M3BQNX nestas mesmas estirpes mas em concentrações elevadas, uma vez que poderá apresentar atividade em concentrações superiores às testadas.

CAPÍTULO 7

Bioatividade do composto 2-amino-3-cianoquinoxalina 1,4-dióxido (2A3CQNX)

7. Bioatividade do composto 2A3CQNX

7.1 Atividade antimicrobiana do composto 2A3CQNX

7.1.1 Método de difusão em disco

No método de difusão em disco foram testadas as concentrações de 500, 100, 50, 20, 5 e 0 $\mu\text{g/L}$ de 2A3CQNX para todos os modelos procariotas e eucariotas referidos anteriormente. O zero corresponde ao controlo negativo (disco em branco). Após o período de incubação das placas inoculadas contendo os discos nas diferentes concentrações, observou-se a formação de halos de inibição do crescimento para as estirpes *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* TEM-1, *E. coli* S3R9, *E. coli* S3R22. No disco em branco (0 $\mu\text{g/L}$), que não apresentava qualquer composto, não se observou halo de inibição, pelo que os resultados puderam ser validados.

Para a *E. coli* ATCC 25922, apenas se observou halo de inibição na concentração de 500 $\mu\text{g/L}$ (com 11 mm de diâmetro). Testaram-se as concentrações inferiores a 500 e superiores a 100 $\mu\text{g/L}$ (400, 300 e 200 $\mu\text{g/L}$). Para as novas concentrações testadas não se observou inibição do crescimento bacteriano. Como apenas se verificou inibição do crescimento para a concentração mais elevada, esta não foi representada graficamente. O valor da concentração com a qual se observou a presença de halo de inibição serve de orientação para determinar a CMI.

Quanto à ciprofloxacina e ao cefoxitin, esta estirpe mostrou-se sensível a ambos, tal como se esperava, uma vez que se obtiveram halos de inibição com 29 e 21 mm de diâmetro, respetivamente (Tabela 8). Para classificação desta estirpe como sensível, teve-se em conta os valores definidos pelo CLSI, e referidos na tabela 6 (Capítulo 6). O mecanismo de ação para o composto testado poderá ser semelhante ao da ciprofloxacina, visto apresentarem semelhanças estruturais.

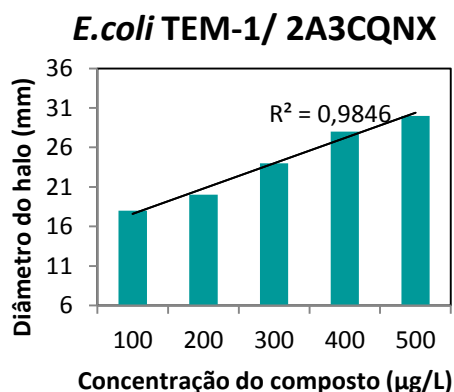
Tabela 8. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E.coli* ATCC 25922 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Ciprofloxacina 5 μg (CIP)	29
Cefoxitin 30 μg (FOX)	21

O crescimento da *E.coli* TEM-1 foi inibido na concentração de 500 µg/L (halo com 30 mm) e 100 µg/L (halo com 18 mm) de 2A3CQNX. Deste modo, testaram-se novas concentrações, nomeadamente as concentrações 400, 300, 200, 80, 60, 40 e 20µg/L. De todas as concentrações testadas apenas ocorreu a inibição do crescimento desta estirpe nas concentrações 500, 400, 300, 200 e 100µg/L com halos de inibição de 30mm, 28mm, 24mm, 20mm e 18mm de diâmetro. No Gráfico 5, assim como nos gráficos apresentados anteriormente, verifica-se que, quando aumenta a concentração de composto, o diâmetro do halo também aumenta. Para além disso, o valor de R^2 também se encontra bastante próximo de 1 (0,98), mostrando que 98% dos valores do diâmetro do halo são explicados pelas variações na concentração de composto. O 2A3CQNX inibe o crescimento desta estirpe em concentrações no intervalo de 500 a 100µg/L (utilizando o método em disco), que serve de orientação para seleção das concentrações a testar para determinar a CMI.

A *E.coli* TEM-1 também é sensível aos antibióticos testados (ciprofloxacina e cefoxitin), como referido no capítulo inicial. Isto sugere que o mecanismo de ação do 2A3CQNX também poderá ser semelhante ao das quinolonas, devido à semelhança de estruturas.

Gráfico 5. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ 2A3CQNX.



Para a *E.coli* S3R9 (sensível à ciprofloxacina), o composto químico 2A3CQNX apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 500µg/L uma vez que se observou a formação de halo de inibição num diâmetro de 16 mm. Testaram-se concentrações entre 500 e 100 µg/L e ocorreu inibição do crescimento bacteriano na

concentração de 400 e 300 µg/L num diâmetro de 10 e 8 mm, respectivamente. O valor de R^2 encontrado para este grupo foi de 0,92 (Gráfico 6).

Esta estirpe também era sensível à ciprofloxacina (como era esperado) e ao cefoxitin, uma vez que o diâmetro dos halos foi de 26 e 22mm, respectivamente (Tabela 9). Para classificação desta estirpe como sensível, teve-se em conta os valores definidos pelo CLSI apresentados no capítulo anterior (Tabela 6).

Gráfico 6. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R9/ 2A3CQNX.

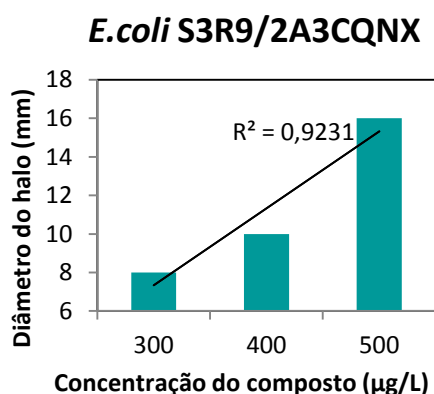


Tabela 9. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* S3R9 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Ciprofloxacina 5 µg (CIP)	26
Cefoxitin 30 µg (FOX)	22

Quanto à estirpe resistente à ciprofloxacina, (*E.coli* S3R22) os resultados foram iguais aos apresentados para a estirpe *E.coli* S3R9 (sensível à ciprofloxacina), como é possível observar no gráfico 7. Embora as estirpes de *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22 apresentem padrões de resistência e sensibilidade diferentes para diversos antimicrobianos conhecidos, o composto 2A3CQNX parece apresentar a mesma atividade em ambas. A atividade antimicrobiana para estas estirpes manifesta-se entre as concentrações 300 e 500µg/L. O valor de R^2 é igual ao anterior. A *E.coli* S3R22 é

sensível ao cefoxitin (halo de 12 mm) e resistente à ciprofloxacina (6mm de diâmetro corresponde ao diâmetro do disco)(Tabela 10).

Gráfico 7. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R22/ 2A3CQNX.

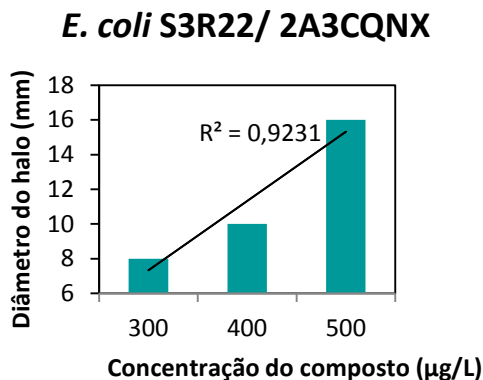


Tabela 10. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* S3R22 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Ciprofloxacina 5 µg (CIP)	6
Cefoxitin 30 µg (FOX)	12

Após a aplicação do método qualitativo, verificou-se que o composto 2A3CQNX apenas apresentou atividade antimicrobiana em estirpes Gram negativas (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* TEM-1, *E. coli* S3R9 e *E. coli* S3R22).

7.1.2 Método de Microdiluição

Como ocorreu a formação de halo de inibição de crescimento para os grupos *E. coli* ATCC 25922/ 2A3CQNX, *E.coli* TEM-1/ 2A3CQNX, *E. coli* S3R9/ 2A3CQNX e *E. coli* S3R22/ 2A3CQNX utilizando o método de difusão em disco, efetuou-se o método de microdiluição, tendo em conta os resultados obtidos no método anterior. Cada coluna da microplaca apresentava um controlo positivo, um negativo e cinco diluições para cada um dos quatro grupos estirpe/composto, como descrito anteriormente. O poço da microplaca que correspondia ao controlo negativo (continha

apenas TSB) não apresentou turvação após o período de incubação, ou seja, não ocorreu crescimento microbiano. Neste ensaio foram efetuados quatro controles positivos, um por estirpe: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* TEM-1, *E. coli* S3R9 e para a *E. coli* S3R22. Após o período de incubação da microplaca, todos os poços apresentaram crescimento bacteriano uma vez que se observou turvação do meio de cultura. Como no controle positivo havia turvação do TSB e no controle negativo não ocorreu turvação, os resultados observados para os poços contendo as diluições puderam ser validados.

No método anterior verificou-se que, para o grupo *E. coli* ATCC 25922/2A3CQNX, apenas ocorreu formação de halo de inibição para a concentração de 500 µg/L. Sendo assim, para que a concentração final de composto no primeiro poço das diluições fosse 500 µg/L (ou superior), foi necessário preparar uma solução com concentração superior a esta (1g/L). A partir desta solução foram efetuadas as diluições sucessivas de 2x nos poços da microplaca obtendo-se as seguintes concentrações finais em cada um dos poços da microplaca: 500, 250, 125, 62,5 e 31,3 µg/L. É importante referir que também foram testadas concentrações entre 500 e 250 µg/L, por se tratar de valores bastante afastados, e observou-se crescimento microbiano. A presença de turvação do meio de cultura foi observada em todos os poços com exceção daquele que apresentava a concentração mais elevada (500µg/L). Portanto, 500µg/L de 2A3CQNX corresponde à CMI de composto capaz de inibir o crescimento visível desta estirpe. (Tabela 11)

Para o grupo *E. coli* TEM-1/2A3CQNX, a concentração mais baixa com a qual se observou halo de inibição no método anterior foi de 100 µg/L. Por isso, para que num dos poços fosse testada essa concentração, foram efetuadas diluições sucessivas de 2x a partir concentração inicial de 200 µg/L, obtendo-se as concentrações finais de 100, 50, 25, 12,5 e 6,3µg/L em cada um dos cinco poços da microplaca. Após incubação, observou-se turvação em todos os poços à exceção do poço com a concentração de 100µg/L. Deste modo, a ausência de crescimento visível permite definir este valor como a CMI para este grupo. (Tabela 11)

Para o grupo *E. coli* S3R9/ 2A3CQNX e *E. coli* S3R22/ 2A3CQNX foram efetuadas diluições sucessivas de 1:1,25 de forma a obter concentrações inferiores e superiores a 300µg/L (valor mínimo com o qual se observou halo de inibição no método de difusão em disco para ambas as estirpes). A concentração inicial utilizada foi de 500 µg/L de forma a obter concentrações finais em cada um dos poços de 400, 320, 256,

204,8 e 163,8µg/L. A presença de turvação do meio de cultura líquido, que indica crescimento microbiano, foi observada nos poços contendo a concentração de 256, 204,8 e 163,8µg/L de 2A3CQNX. Nas restantes concentrações (400 e 320µg/L) não ocorreu crescimento bacteriano visível. Assim, como 320 µg/L corresponde à concentração mais baixa de 2A3CQNX onde não se observou turvação do meio de cultura, este valor corresponde à CMI. (Tabela 11)

Tabela 11. Valor das CMI (µg/L) de 2A3CQNX para as estirpes *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22.

Estirpes microbianas	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> TEM-1	<i>E.coli</i> S3R9	<i>E.coli</i> S3R22
CMI (µg/L)	500	100	320	320

7.2 Curva de morte versus viabilidade celular

Para construção das curvas de morte para as estirpes *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22 na presença e na ausência do composto 2A3CQNX, foi necessário determinar a diluição ótima para cada estirpe. A sua determinação é fundamental para que se consiga efetuar a contagem de colónias ao longo dos períodos de tempo testados e posteriormente determinar as UFC/mL na suspensão. A tabela 12 mostra que a diluição ótima para todas as estirpes com as quais se observou atividade antimicrobiana com o composto 2A3CQNX foi de 10⁻⁵.

Tabela 12. Número de colónias das estirpes presentes em meio de cultura TSA para cada diluição.

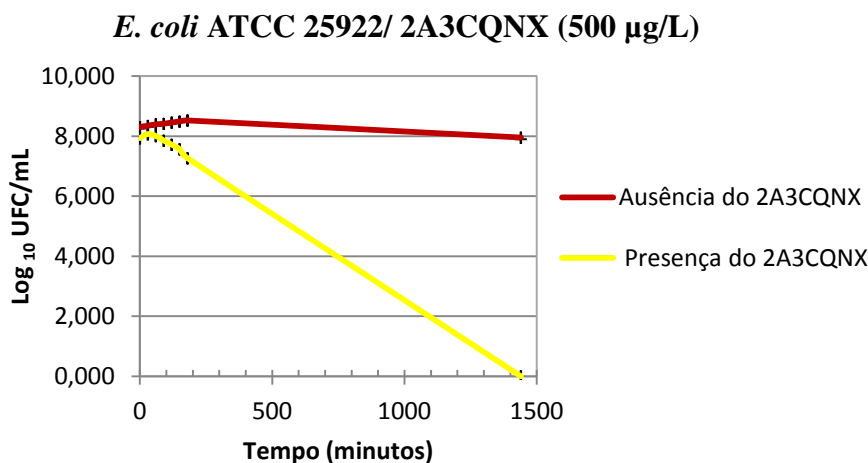
	Diluições	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶
Número de colónias	<i>E.coli</i> ATCC	-	-	-	-	16	4
	25922						
	<i>E.coli</i> TEM-1	-	-	-	-	25	4
	<i>E.coli</i> S3R9	-	-	-	-	14	5
	<i>E.coli</i> S3R22	-	-	-	-	15	1

(-) Não foi possível efetuar contagem do número de colónias

Inicialmente, prepararam-se duas suspensões bacterianas em solução salina (NaCl a 0,9%) para cada estirpe (*E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22) e diluídas para 10^{-5} (diluição ótima). Uma das suspensões foi utilizada como branco (ausência do composto), em cada tempo de contagem. Na outra suspensão (para cada estirpe), adicionou-se o composto 2A3CQNX de forma a obter uma concentração final que corresponde à CMI determinada anteriormente. A viabilidade celular das estirpes em estudo, na presença e ausência do composto, foi observada pela presença de crescimento em meio de cultura de TSA em cada período de tempo estudado para ambas as suspensões. Após a contagem do número de colônias determinaram-se as UFC/mL ao longo do tempo que permitiu construir as curvas de morte na ausência e presença do composto.

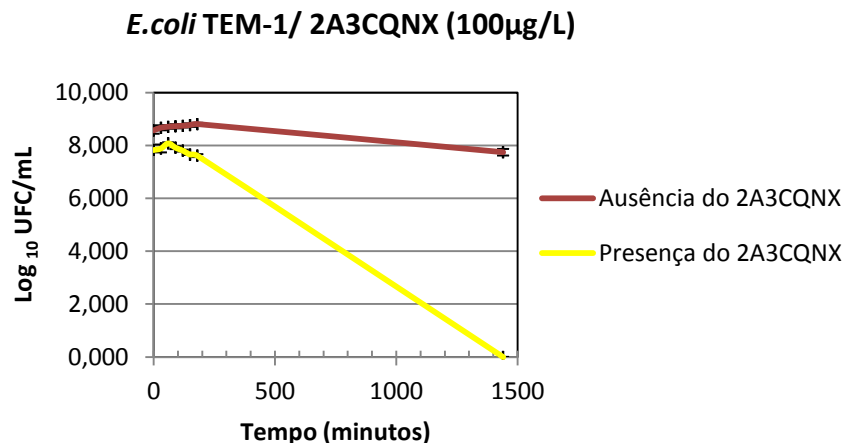
No gráfico 8 (*E.coli* ATCC 25922/ 2A3CQNX) é possível observar que, na ausência do composto químico (curva vermelha), ocorre crescimento bacteriano até aproximadamente aos 180 minutos, uma vez que ocorreu um aumento nas UFC/mL. Contudo, às 24h observa-se uma diminuição nas UFC/mL para valores inferiores aos observados inicialmente. O ligeiro aumento inicial nas UFC/mL deve-se ao crescimento microbiano utilizando as reservas de nutrientes que possuem. A posterior diminuição no crescimento, a partir dos 180 minutos, é observada devido à ausência de reservas e de nutrientes no meio extracelular. Entre os 180 minutos e as 24h não se sabe que variações ocorreram. Contudo, o objetivo consiste em conhecer se ao fim de 24h o valor de UFC/mL diminui ou aumenta comparativamente com o valor inicial e na presença ou ausência do composto. Por outro lado, na presença do composto 2A3CQNX na concentração de 500 µg/L (curva amarela), ocorreu um declínio na curva da *E.coli* ATCC 25922 indicando uma diminuição brusca nas UFC/mL às 24h. Portanto, este composto na concentração testada, exerce efeitos no crescimento inicial da *E.coli* ATCC 25922, uma vez que se observou uma diminuição no crescimento até aos 180 minutos. Às 24h não foram observadas células viáveis na presença do 2A3CQNX, contrariamente ao observado na ausência do composto, pelo que, se sugere uma ação antibacteriana. Como se irá perceber mais à frente todos os compostos com atividade antimicrobiana nesta estirpe, apresentaram atividade antimicrobiana nas restantes estirpes Gram negativas (exceto *E.coli* CTX-M2 e *E.coli* CTX-M9). As estirpes Gram negativas que se mostraram suscetíveis a outros compostos para além deste são estirpes com resistência antimicrobiana.

Gráfico 8. Evolução do crescimento da *E.coli* ATCC 25922 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 500µg/L (curva amarela).



No gráfico 9 (*E.coli* TEM-1/ 2A3CQNX), a curva a vermelho representa o logaritmo do número de UFC/mL de *E.coli* TEM-1 ao longo do tempo. Tal como se observou para a *E.coli* ATCC 25922, houve uma fase de crescimento inicial (aumento no número de UFC/mL), até cerca dos 180 minutos, e uma diminuição às 24h, uma vez que o número de UFC/mL era mais baixo comparativamente com o valor inicial. Analisando o mesmo gráfico, e tendo em conta a curva a amarelo (presença do 2A3CQNX), verifica-se que ocorreu um ligeiro aumento no crescimento bacteriano até aproximadamente aos 60 minutos, uma vez que as UFC/mL aumentaram. Posteriormente, houve uma diminuição no crescimento bacteriano (diminuição no número de células viáveis) ao longo do tempo e, às 24h não se observaram células viáveis. Deste modo, o composto 2A3CQNX na concentração de 100 µg/L influencia o crescimento da *E.coli* TEM-1 e, estes resultados sugerem uma ação antibacteriana.

Gráfico 9. Evolução do crescimento da *E.coli* TEM-1 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 500µg/L (curva amarela).



No gráfico 10 e 11, a curva a vermelho mostra que as estirpes *E. coli* S3R9 e *E. coli* S3R22 na ausência do 2A3CQNX crescem nos minutos iniciais (aumento no número de UFC/mL), e às 24h ocorre uma diminuição, comparativamente com os valores iniciais. A justificação para as alterações no crescimento já foram apresentadas anteriormente. Na presença do composto 2A3CQNX, na concentração de 320 µg/L (gráfico 10, curva amarela), a *E. coli* S3R9 apresenta oscilações no crescimento após exposição ao composto. Contudo, a partir dos 100 minutos, o crescimento diminui e, às 24h, já não se observaram células viáveis. Assim, os resultados obtidos para *E. coli* S3R9, sugerem que o composto na CMI apresenta uma ação antibacteriana. Por outro lado, a *E. coli* S3R22, após exposição ao composto diminui o crescimento (diminuição das UFC/mL), e às 24h também não se observaram células viáveis em meio de cultura. Deste modo, a presença do composto diminui a viabilidade celular ao longo do tempo (Gráfico 11, curva amarela).

Gráfico 10. Evolução do crescimento da *E. coli* S3R9 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 320µg/L (curva amarela).

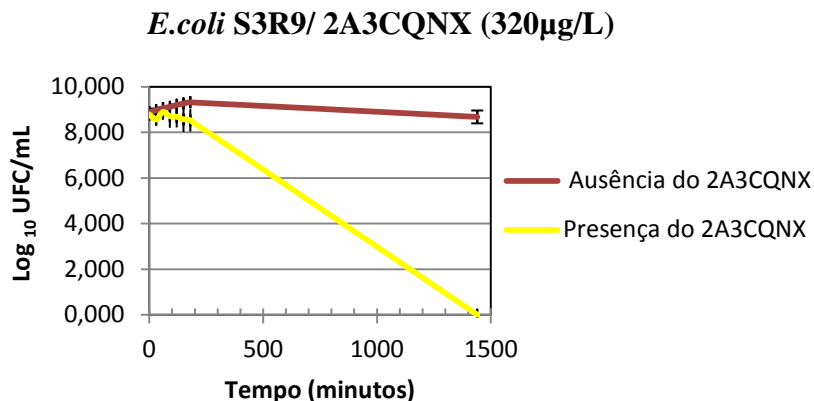
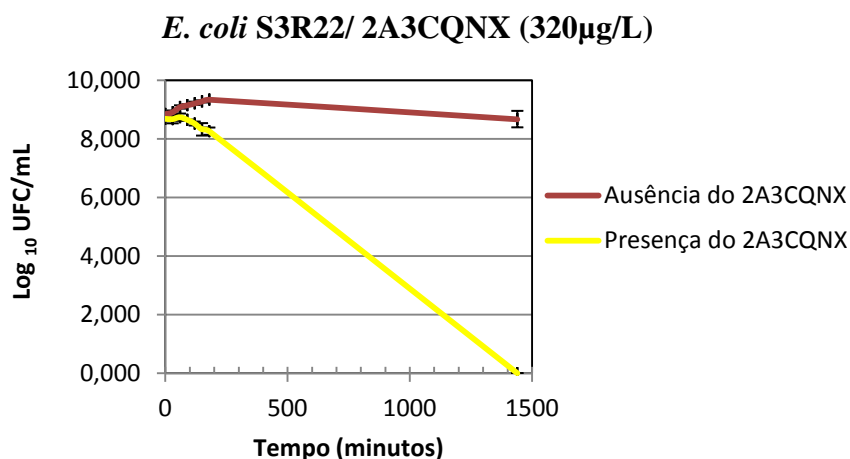


Gráfico 11. Evolução do crescimento da *E. coli* S3R22 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 320µg/L (curva amarela).



Em suma, o composto 2A3CQNX apresentou atividade antimicrobiana nas estirpes referidas anteriormente. A presença, em simultâneo, do grupo amina (NH₂) no carbono 2 e ciano (CN) no carbono 3, comparativamente com a QNX parece aumentar a atividade antimicrobiana, uma vez que é ativo contra quatro das estirpes estudadas.

CAPÍTULO 8

Bioatividade do composto 3-metil-2-
quinoxalinacarboxamida-1,4-dióxido (3M2QNXC)

8. Bioatividade do composto 3M2QNXC

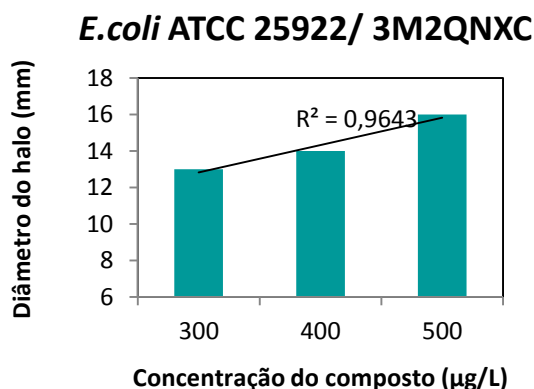
8.1 Atividade antimicrobiana do composto 3M2QNXC

8.1.1 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana do composto 3M2QNXC foi avaliada em todos os modelos procariontes e eucariontes utilizando o método de difusão em disco. As concentrações testadas inicialmente foram 500, 100, 50, 20, 5 e 0 µg/L. O zero corresponde ao controlo negativo (disco em branco). Após o período de incubação das placas inoculadas contendo os discos nas diferentes concentrações, observou-se a formação de halos de inibição para as estirpes *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM CTX-M9, *E.coli* AmpC MOX-2, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22. No disco em branco, que não apresentava qualquer composto, não se observou halo de inibição, pelo que os resultados puderam ser validados.

Contrariamente ao que acontece com os antimicrobianos disponíveis comercialmente, não se conhece a suscetibilidade da *E.coli* ATCC 25922 aos compostos estudados. Após testar a atividade do composto nesta estirpe, apenas se observou halo de inibição de crescimento na concentração de 500 µg/L (com 16 mm de diâmetro) quando testadas as concentrações iniciais (500, 100, 50, 20, 5 e 0 µg/L). Deste modo, testaram-se as concentrações entre 500 e 100 µg/L de forma a verificar se ocorreria a formação de halos de inibição em alguma dessas concentrações (400, 300 e 200 µg/L). A *E.coli* ATCC 25922 também era suscetível à ação deste composto nas concentrações 400 e 300 µg/L com halos de inibição no valor de 14 e 13 mm de diâmetro, respetivamente. Portanto, este método mostra que o crescimento desta estirpe é inibido nas concentrações entre 300 e 500 µg/L. Quanto maior a concentração, maior é o halo de inibição observado. O valor de R^2 (0,96) mostra que existe uma forte relação entre as variáveis (Gráfico 12) Apesar do gráfico mostrar que existe atividade antibacteriana entre as concentrações referidas, não se pode afirmar que não existe atividade em concentrações mais baixas, uma vez que, se trata de um método que pode ser influenciado por diversos fatores referidos anteriormente. O resultado obtido por este método para este grupo permite orientar a escolha das concentrações finais das diluições efetuadas na microdiluição.

Gráfico 12. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* ATCC 25922/ 3M2QNXC.



Para a *E.coli* TEM CTX-M9 também se observou a presença de halo de inibição de crescimento apenas na concentração de 500 µg/L (halo com 24 mm de diâmetro), após terem sido testadas as concentrações de 500, 100, 50, 20, 5 e 0 µg/L de 3M2QNXC. Nas concentrações 400, 300, e 200 µg/L observou-se a formação de halos com 22, 20 e 16 mm de diâmetro. Este método mostra inibição do crescimento da *E.coli* TEM CTX-M9 entre 200 e 500 µg/L de 3M2QNXC nos diâmetros apresentados. O valor de R^2 também foi próximo de 1 (0,96) tal como se observou para a estirpe anterior. (Gráfico 13)

Relativamente aos antibióticos ciprofloxacina e cefoxitin, esta estirpe mostrou-se resistente à ciprofloxacina (halo de 6mm) e sensível ao cefoxitin (halo de 20 mm). Estes antibióticos serviram de controlo para esta estirpe e, em simultâneo permitiram verificar se esta estirpe é sensível, intermédia ou resistente a um antibiótico com estrutura base semelhante ao composto estudado. O facto de esta estirpe ser resistente à ciprofloxacina e sensível ao composto estudado, sugere um mecanismo de ação diferente das quinolonas.

Gráfico 13. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM CTX-M9/ 3M2QNXC.

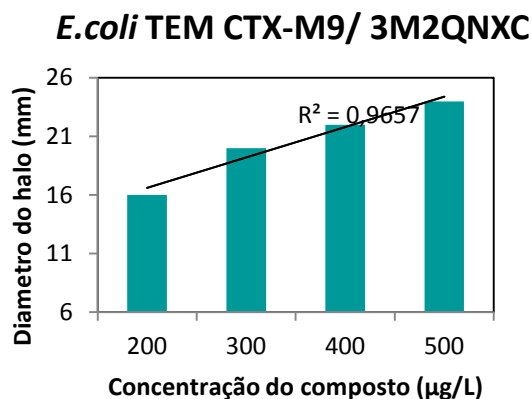


Tabela 13. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* TEM CTX-M9 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Ciprofloxacina 5 µg (CIP)	6
Cefoxitin 30 µg (FOX)	20

Como para a *E. coli* AmpC MOX-2 observou-se a formação de halos de inibição de crescimento na concentração de 500 e 100 µg/L de 3M2QNXC (24 e 12 mm de diâmetro, respectivamente). Testaram-se também as concentrações entre esses valores (400, 300 e 200 µg/L) e inferiores a 100 µg/L (80, 60, e 40 µg/L). Para as concentrações 400, 300, 200, 80, 60 e 40 µg/L obtiveram-se halos de inibição com 24, 20, 16, 10, 8 e 6 mm de diâmetro. Um diâmetro com 6 mm corresponde à ausência de halo de inibição uma vez que corresponde ao diâmetro do disco. Esta estirpe apresentou halos de inibição para um grande intervalo de concentrações de 3M2QNXC (entre 60 e 500µg/L). Tal como se tem observado em capítulos anteriores, a dimensão do halo aumenta com a concentração do composto químico. O valor de R^2 obtido para este grupo estirpe/composto foi próximo de 1 (0,97). Portanto, existe uma forte relação entre as variáveis, e pode-se afirmar que 97% dos valores dos halos de inibição obtidos, são explicados pela variação da concentração de 3M2QNXC. (Gráfico 14) Quanto ao fenótipo desta estirpe verificou-se que é sensível à ciprofloxacina (halo com 28 mm) e resistente ao cefoxitin (halo com 6 mm). (Tabela 14) A resistência ao cefoxitin era esperada uma vez que de acordo com Meyer *et al* (2011) as enzimas predominantes em

estirpes AmpC resistentes ao cefoxitin são cefaminases que degradam cefamicinas, nomeadamente o cefoxitin. A *E. coli* AmpC MOX-2 estudada é sensível à ciprofloxacina, e como ocorreu formação de halo de inibição de crescimento com diversas concentrações de 3M2QNXC, sugere um mecanismo de ação semelhante.

Gráfico 14. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* AmpC MOX-2/ 3M2QNXC.

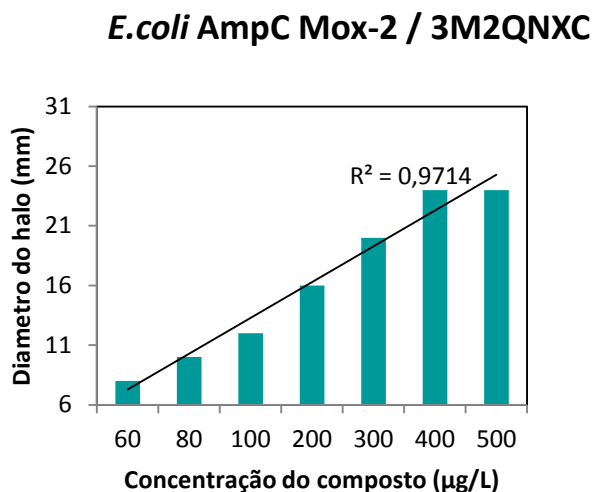


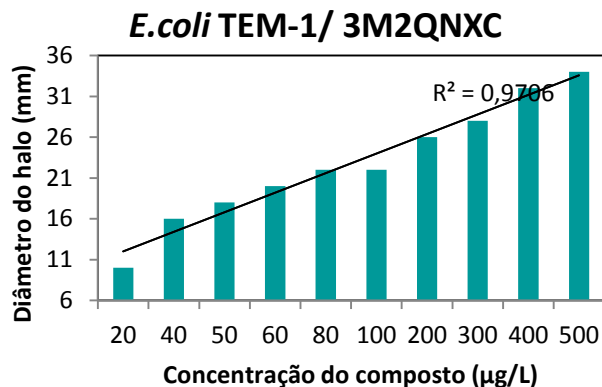
Tabela 14. Diâmetro do halo de inibição do crescimento da *E. coli* AmpC MOX-2 após aplicação dos discos de CIP e FOX.

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)
Ciprofloxacina 5 µg (CIP)	28
Cefoxitin 30 µg (FOX)	6

O composto 3M2QNXC também apresentou atividade contra a *E.coli* TEM-1 nas concentrações 500, 100, 50 e 20 µg/L (halos com 34, 22, 18 e 10 mm de diâmetro). Posteriormente testaram-se as concentrações 400, 300, 200, 80, 60 e 40µg/L obtendo-se halos de inibição com 32, 28, 26, 20, 22, 16 mm de diâmetro. Esta estirpe, foi a que apresentou halos de inibição para um maior intervalo de concentrações de 3M2QNXC (entre 20 e 500µg/L). (Gráfico 15) O valor de R^2 encontrado foi de 0,97, podendo-se afirmar que 97% dos valores dos halos de inibição obtidos, são explicados pela variação da concentração de 3M2QNXC. Como referido em capítulos anteriores, esta estirpe é

sensível à ciprofloxacina e ao cefoxitin. Os resultados obtidos neste método auxiliam a determinação da CMI.

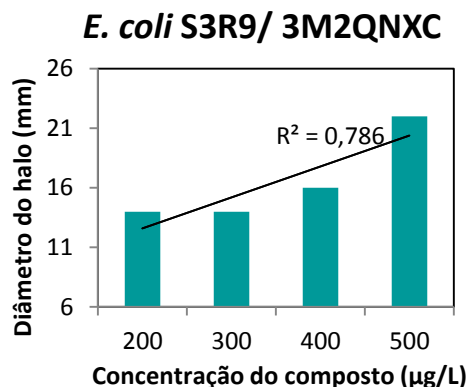
Gráfico 15. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* TEM-1/ 3M2QNXC.



Para o grupo *E.coli* S3R9/ 3M2QNXC observou-se formação de halo de inibição apenas na concentração de 500 µg/L (22 mm de diâmetro) quando se testaram as concentrações iniciais 500, 100, 50, 20, 5 e 0 µg/L. Nas concentrações 400, 300 e 200 µg/L de 3M2QNXC observaram-se halos de 16, 14 e 14mm de diâmetro, respectivamente. Portanto ocorreu formação de halos entre as concentrações 200 e 500 µg/L. (Gráfico 16) O valor de R^2 obtido para este grupo estirpe/composto foi de 0,78. Comparativamente com todos os valores de R^2 apresentados anteriormente, este foi o mais baixo.

Esta estirpe é considerada sensível à ciprofloxacina (5µg) e ao cefoxitin (30µg), tal como apresentado no capítulo anterior. Deste modo, o mecanismo de ação do composto 3M2QNXC nesta estirpe poderá ser semelhante ao da ciprofloxacina, uma vez que a estrutura química de ambos é semelhante.

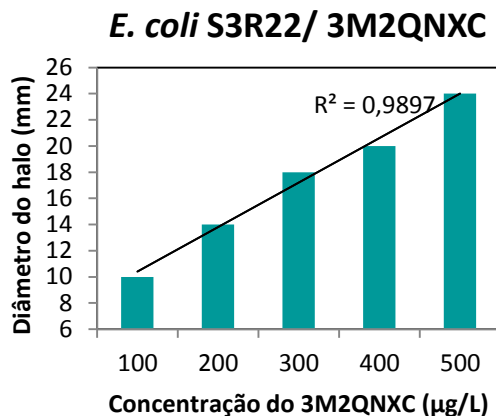
Gráfico 16. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R9/ 3M2QNXC.



A estirpe *E. coli* S3R22 mostrou-se suscetível ao composto 3M2QNXC nas concentrações 500 e 100 µg/L, com halos de inibição de 24 e 10 mm de diâmetro respectivamente. Posteriormente testaram-se as concentrações 400, 300, 200, 80, 60, e 40 µg/L obtendo-se halos de 20, 18, 14, 6, 6 e 6 mm, respectivamente. Como 6 mm de diâmetro corresponde ao valor do diâmetro do disco (valor mínimo do halo), então não ocorreu formação de halo de inibição de crescimento. Deste modo, o grupo *E. coli* S3R22/3M2QNXC apresenta halos de inibição entre as concentrações 100 e 500 µg/L. (Gráfico 17) O valor de R^2 para este grupo foi bastante próximo de 1 (0,98) podendo-se afirmar que 98% dos valores dos halos de inibição obtidos, são explicados pela variação da concentração de 3M2QNXC.

Esta estirpe é considerada resistente à ciprofloxacina (5µg) e sensível ao cefoxitin (30µg), tal como apresentado no capítulo anterior. Deste modo, o mecanismo de ação do composto 3M2QNXC poderá ser semelhante ao da ciprofloxacina.

Gráfico 17. O gráfico Concentração *versus* Diâmetro do halo de inibição, mostra a relação entre as variáveis para o grupo *E.coli* S3R22/ 3M2QNXC.



8.1.2 Método de Microdiluição

O método para determinação da CMI foi aplicado aos grupos *E.coli* ATCC 25922/ 3M2QNXC, *E.coli* TEM CTX-M9/ 3M2QNXC, *E.coli* AmpC MOX-2/ 3M2QNXC, *E.coli* TEM-1/ 3M2QNXC, *E.coli* S3R9/ 3M2QNXC e *E.coli* S3R22/ 3M2QNXC uma vez que se observou atividade antimicrobiana no ensaio anterior. Na microplaca foi efetuado um controlo positivo (meio TSB com a respetiva estirpe) e um controlo negativo (apenas TSB) para cada estirpe. Após o período de incubação da microplaca todos os poços que correspondiam ao controlo negativo apresentaram turvação do meio de cultura indicando crescimento microbiano e, o controlo negativo não apresentava turvação. Deste modo, os resultados obtidos para as diluições puderam ser validados. Cada coluna da microplaca correspondia a um grupo estirpe/composto, e para além do controlo foram efetuadas cinco diluições do composto 3M2QNXC para cada coluna.

Na coluna que correspondia ao grupo *E.coli* ATCC 25922/ 3M2QNXC efetuaram-se diluições 1:2 de 3M2QNXC. Como no método de difusão em disco a concentração mais baixa com a qual ocorreu formação de halo de inibição foi 300µg/L, efetuaram-se diluições de 1:2 de modo a obter um ou mais poços da microplaca com valores superiores e inferiores a 300, uma vez que a CMI anda próxima desse valor. Deste modo, obtiveram-se as seguintes concentrações finais em cada poço da microplaca: 350, 175, 87,5, 43,8 e 21,9µg/L. Após adição da *E.coli* ATCC 25922 aos poços das diluições e incubação a 37°C, a leitura da microplaca mostrou ausência de turvação no poço que apresentava a concentração 350 µg/L. (Tabela 15) Isto indica

ausência de crescimento da *E.coli* ATCC 25922 para esta concentração e, a presença de turvação nos restantes poços indica que houve crescimento bacteriano. O valor de 350 µg/L corresponde à CMI, uma vez que, foi o poço com menor concentração onde não se observou turvação do meio de cultura. A diferença do valor encontrado no método anterior (300 µg/L) para o valor de CMI (350 µg/L) está relacionado com facto de se tratar de métodos diferentes. No método de difusão em disco apenas algumas estirpes são sujeitas à ação do composto enquanto no método de microdiluição todas estão expostas à ação do 3M2QNXC na respetiva concentração.

Para o grupo *E.coli* TEM CTX-M9/ 3M2QNXC efetuaram-se diluições de 1:2 de modo a obter concentrações finais nos poços da microplaca superiores e inferiores a 200 µg/L (concentração mais baixa onde se observou formação de halo). Para obtenção das concentrações finais de 250, 125, 62.5, 31.3 e 15.6 µg/L, utilizou-se a concentração inicial de 500 µg/L de 3M2QNXC. A concentração de 125µg/L corresponde à CMI uma vez que se trata da concentração mais baixa com a qual se verificou ausência de turvação. (Tabela 15) Nos poços com concentrações inferiores houve crescimento microbiano.

Para o grupo *E.coli* AmpC MOX-2/ 3M2QNXC também se efetuaram diluições sucessivas de 1:2, obtendo-se as concentrações finais de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/L de 3M2QNXC nos poços da microplaca. Como no método de difusão em disco a concentração baixa deste composto em que ocorreu formação de halo de inibição foi de 60 µg/L, testaram-se no método da microdiluição valores de concentração superiores e inferiores a 60 µg/L. Após incubação da microplaca observou ausência de turvação do meio de cultura nos poços com as concentrações 200 e 100 µg/L, ou seja não ocorreu crescimento bacteriano nestas concentrações de 3M2QNXC. O crescimento desta estirpe é inibido na presença deste composto na concentração de 100µg/L. (Tabela 15)

Nos poços da microplaca que correspondiam à *E.coli* TEM-1/ 3M2QNXC foram efetuadas diluições de 1:2 obtendo-se concentrações superiores e inferiores a 20 µg/L (menor concentração com halo de inibição), nomeadamente 80, 40, 20, 5 e 2,5 µg/L. O composto 3M2QNXC na concentração 80 µg/L corresponde à CMI uma vez que foi o único poço da microplaca que não apresentou turvação do meio de cultura (ausência de

crescimento). Assim, o crescimento da *E.coli* TEM-1 é inibido pelo 3M2QNXC na concentração de 80 µg/L. (Tabela 15)

No método de difusão em disco para o grupo *E.coli* S3R9/3M2QNXC a menor concentração do composto com a qual se observou formação de halo de inibição foi de 200 µg/L pelo que se efetuaram diluições de 1:2 de modo a testar concentrações finais próximas de 200 µg/L, nomeadamente 250, 125, 62,5, 31,5 e 15,6 µg/L. Como a concentração mais baixa onde não se observou turvação do meio TSB foi 125 µg/L, este valor corresponde à CMI. Deste modo, o crescimento da estirpe S3R9 é inibido na presença do composto 3M2QNXC na concentração de 125 µg/L. (Tabela 15)

Para o grupo *E.coli* S3R22/ 3M2QNXC foram efetuadas diluições de 1:2, de forma a obter as seguintes concentrações finais: 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/L. O objetivo era obter concentrações finais superiores e inferiores a 100 µg/L uma vez que este corresponde à concentração mais baixa de 3M2QNXC com a qual se observou formação de halo de inibição no método anterior. Após o período de incubação da microplaca apenas se observou ausência de turvação no poço que continha a concentração final mais elevada (200 µg/L). Portanto, esta corresponde à CMI para o grupo *E.coli* S3R22/ 3M2QNXC. (Tabela 15)

Tabela 15. Valor das CMI (µg/L) de 3M2QNXC para as estirpes *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM CTX-M9, *E.coli* AmpC MOX-2, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22.

Estirpes	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
microbianas	ATCC	TEM	AmpC	TEM-1	S3R9	S3R22
	25922	CTX-M9	MOX-2			
CMI (µg/L)	350	125	100	80	125	200

8.2 Curva de morte versus viabilidade celular

Para construção das curvas de morte para as estirpes *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM CTX-M9, *E.coli* AmpC MOX-2, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22 na presença e na ausência do composto 3M2QNXC, determinaram-se as diluições ótimas para as estirpes em que essa diluição ainda não era conhecida. A Tabela 18 resume o

número de colónias encontradas em cada diluição para cada estirpe, verificando-se que a diluição ótima para é de 10^{-5} para todas as bactérias.

Tabela 18. Diluições ótimas para todas as estirpes com as quais se observou atividade antimicrobiana com o composto 3M2QNXC foi de 10^{-5} .

Estirpes/Diluições	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
ATCC 25922	-	-	-	-	16	4
<i>E.coli</i> TEM CTX-M9	-	-	-	-	20	2
<i>E.coli</i> AmpC MOX-2	-	-	-	-	15	3
<i>E.coli</i> TEM-1	-	-	-	-	25	4
<i>E.coli</i> S3R9	-	-	-	-	14	5
<i>E.coli</i> S3R22	-	-	-	-	15	1

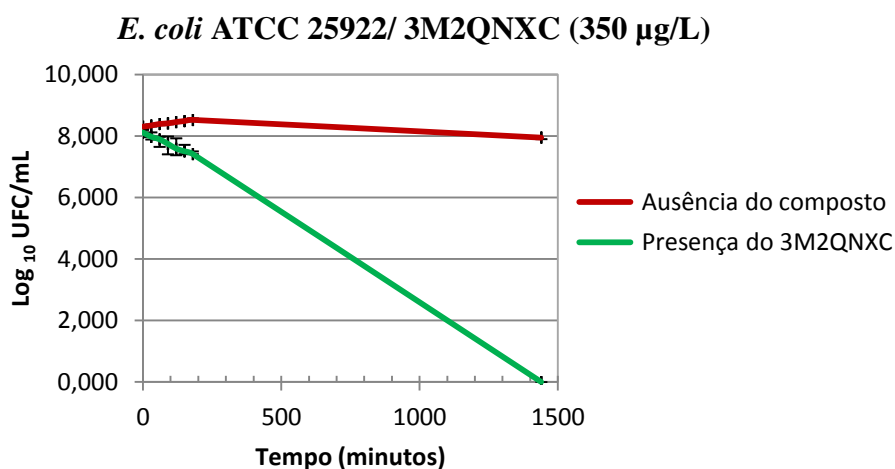
(-) Não foi possível efetuar contagem do número de colónias

Inicialmente prepararam-se duas suspensões bacterianas em solução salina (NaCl a 0,9%) para cada estirpe (ATCC 25922, *E.coli* TEM CTX-M9, *E.coli* AmpC MOX-2, *E.coli* TEM-1, S3R9 e S3R22). Numa das suspensões para cada estirpe adicionou-se o composto 3M2QNXC, de forma a que, a concentração final fosse igual à CMI determinada anteriormente. A outra suspensão (continha apenas a estirpe) permitiu observar a evolução do crescimento microbiano ao longo do tempo na ausência do composto. Posteriormente, determinaram-se as UFC/mL na presença e ausência do composto, para cada grupo estirpe/composto e, construíram-se as curvas de morte que mostram a evolução do crescimento destas estirpes ao longo do tempo. A viabilidade foi observada pela presença de crescimento em meio de cultura TSA, a partir do qual se efetuaram as contagens de colónias e se determinaram as UFC/mL.

A curva vermelha do gráfico 18 (*E.coli* ATCC 25922/ 3M2QNXC) mostra a evolução no crescimento da *E.coli* ATCC 25922 na ausência do composto. Inicialmente ocorreu um aumento ligeiro nas UFC/mL e, um declínio nesse valor às 24h comparativamente com o valor inicial. O ligeiro aumento inicial nas UFC/mL deve-se ao crescimento bacteriano como resultado da utilização das suas reservas de nutrientes. Aproximadamente aos 180 minutos, observa-se no gráfico uma diminuição nas UFC/mL até às 24h devido à escassez de nutrientes. Por outro lado, a curva verde representa a evolução do crescimento desta estirpe na presença do composto

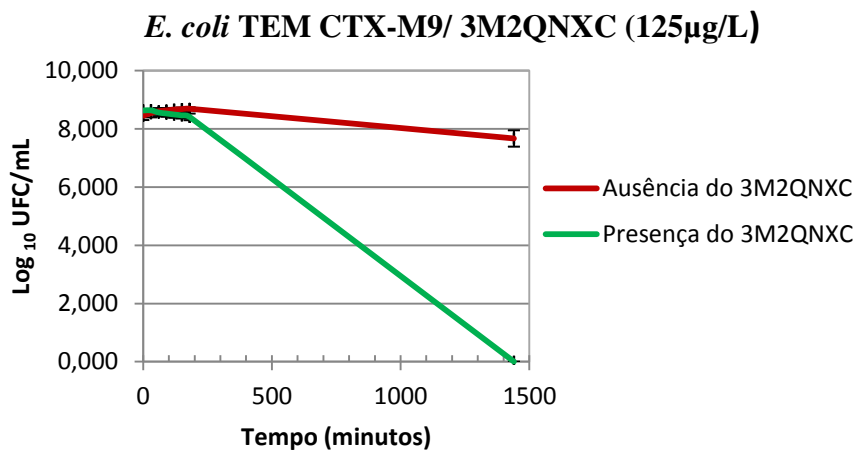
3M2QNXC na concentração de 350 µg/L. No gráfico observa-se uma diminuição brusca no crescimento bacteriano desde a exposição inicial da estirpe ao composto, até às 24h. Portanto, o composto 3M2QNXC na concentração de 350 µg/L também exerce efeitos no crescimento da *E. coli* ATCC 25922, sugerindo uma ação antibacteriana.

Gráfico 18. Evolução do crescimento da *E.coli* ATCC 25922 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência da 2A3CQNX (curva a vermelho) e na presença da 2A3CQNX na concentração de 320µg/L (curva verde).



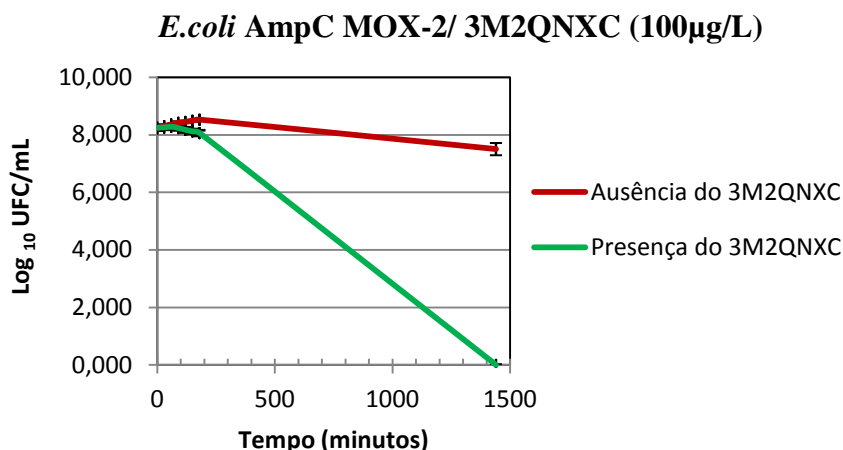
No gráfico 19 (*E.coli* TEM CTX-M9/ 3M2QNXC) a curva vermelha representa o logaritmo do número das UFC/mL desta estirpe ao longo do tempo na presença e ausência do composto. Tal como se observou para as estirpes anteriores, houve uma fase de crescimento inicial (aumento no número de UFC/mL) até cerca dos 180 minutos e uma diminuição às 24h uma vez que o número de UFC/mL. A justificação desta evolução já foi apresentada para as estirpes anteriores, uma vez que as curvas na ausência do composto são muito semelhantes. Analisando o mesmo gráfico e tendo em conta a curva verde (presença do 3M2QNXC) verifica-se que ocorreu uma diminuição muito ligeira no crescimento bacteriano até aproximadamente aos 180 minutos, uma vez que o número de UFC/mL diminuiu. Às 24h não se observaram células viáveis, o que indica perda de viabilidade entre os 180 minutos e as 24h. Deste modo, o composto 3M2QNXC na concentração de 125µg/L apresenta uma ação antibacteriana nesta estirpe.

Gráfico 19. Evolução do crescimento da *E.coli* TEM CTX-M9 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 125 µg/L (curva verde).



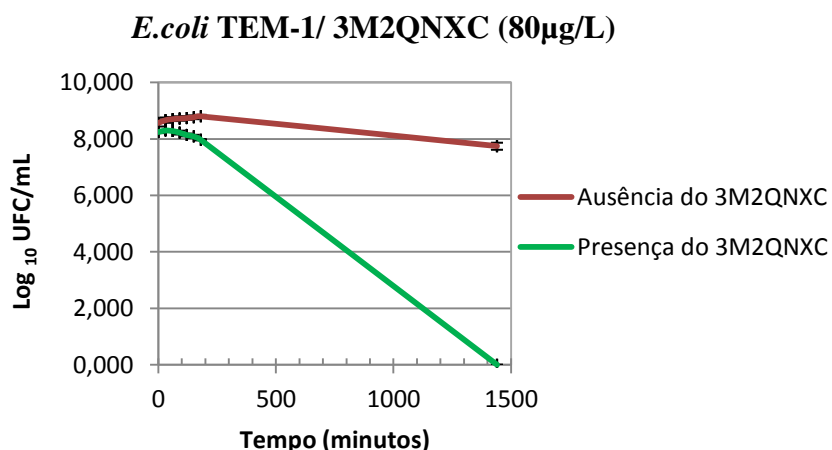
Relativamente à curva vermelha presente no gráfico 20 (ausência de 3M2QNXC) a sua interpretação é a mesma efetuada para o gráfico 19, apesar de se tratar de estirpes diferentes. Embora os valores de UFC/mL sejam diferentes a evolução do crescimento é semelhante. A curva verde no gráfico 20 mostra a evolução no crescimento da *E.coli* AmpC MOX-2 na presença da 3M2QNXC na CMI (100 µg/L). Nesta curva observa-se que os valores de UFC/mL após o contato com o composto diminuem ligeiramente, e às 24h não existiam células viáveis. Portanto, o composto 3M2QNXC na CMI influencia o crescimento desta estirpe, sugerindo uma ação antibacteriana.

Gráfico 20. Evolução do crescimento da *E.coli* AmpC MOX-2 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 100 µg/L (curva verde).



No gráfico 21, a interpretação da evolução do crescimento da *E.coli* TEM-1 é semelhante à apresentada para as estirpes anteriores, para a curva vermelha. A curva a verde no gráfico representa a evolução no crescimento da *E.coli* TEM-1 na presença do 3M2QNXC na CMI (80 µg/L). No período de tempo inicial (0 aos 180 minutos), ou seja, desde a exposição da *E.coli* TEM-1 ao composto, ocorreu uma diminuição nas UFC/mL (diminuição no crescimento bacteriano). Às 24h não se observaram células viáveis, pelo que o 3M2QNXC parece apresentar uma ação antibacteriana nesta estirpe

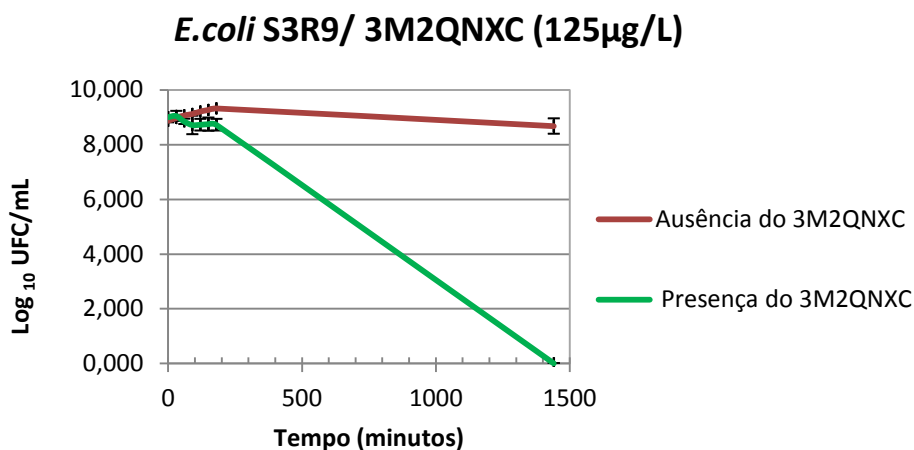
Gráfico 21. Evolução do crescimento da *E.coli* TEM-1 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 80 µg/L (curva verde).



Para os grupos *E.coli* S3R9/ 3M2QNXC e *E.coli* S3R22/ 3M2QNXC, a curva vermelha também mostra a evolução no crescimento da *E.coli* S3R9 (gráfico 22) e

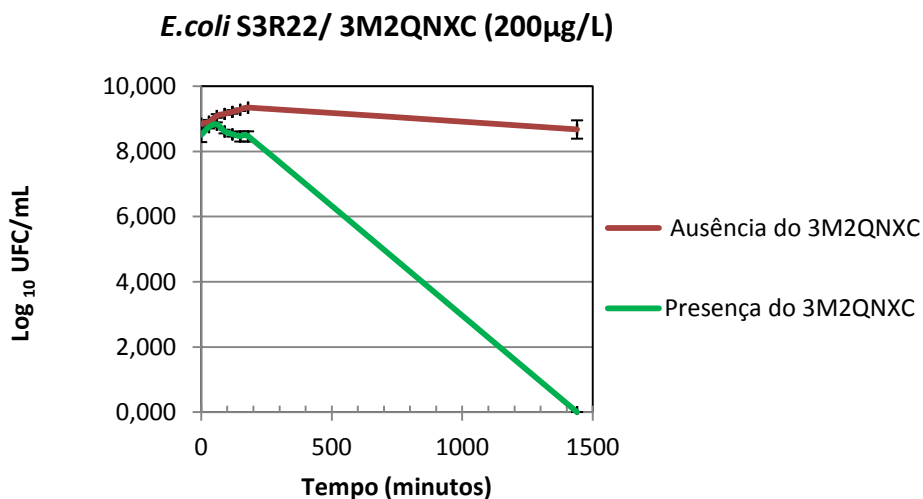
E.coli S3R22 (gráfico 24) na ausência do composto e, a sua interpretação é a mesma das estirpes anteriores. Quanto à curva verde do gráfico 22, esta mostra que ocorreu um declínio nas UFC/mL nos minutos iniciais e a partir dos 180 minutos houve um decréscimo na viabilidade celular, uma vez que às 24h já não se observaram células viáveis. Assim, o composto 3M2QNXC na CMI influencia o crescimento da *E. coli* S3R9, conduzindo à perda de viabilidade até às 24h após exposição.

Gráfico 22. Evolução do crescimento da *E.coli* S3R9 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 125 µg/L (curva verde).



Na curva verde do gráfico 23 (*E.coli* S3R22/ 3M2QNXC) observa-se que na presença do composto 3M2QNXC, também ocorreram variações no crescimento desta estirpe uma vez que o número de UFC/mL varia durante os 180 minutos iniciais. Observou-se um ligeiro aumento inicial seguido de um declínio no número de UFC/mL, até aos 180 minutos. O facto da diminuição no crescimento ter ocorrido aproximadamente após uma hora, pode dever-se ao tempo necessário para o composto atuar nesta estirpe. Tal como se verificou para as estirpes anteriores, não se observaram células viáveis às 24h. Se, se compararem as curvas do mesmo gráfico, observa-se que na presença do composto na CMI, as células perdem viabilidade até à 24h após exposição ao composto.

Gráfico 23. Evolução do crescimento da *E.coli* S3R22 ao longo do tempo, até às 24h (1440 minutos), na ausência do 3M2QNXC (curva a vermelho) e na presença do 3M2QNXC na concentração de 200 µg/L (curva verde).



O composto 3M2QNXC apresentou atividade antibacteriana para as estirpes *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* TEM CTX-M9, *E.coli* AmpC MOX-2, *E.coli* TEM-1, *E.coli* S3R9 e *E.coli* S3R22, em diferentes concentrações. A atividade antibacteriana foi observada em todas as estirpes Gram negativas estudadas, exceto *E.coli* CTX-M2 e *E.coli* CTX-M9. A presença em simultâneo do grupo metil no carbono 3 da quinoxalina 1,4-dióxido e do grupo carboxamida (- NH₂CO) na posição 2, parecem conferir à molécula uma ampla atividade antibacteriana comparativamente com os compostos dos capítulos anteriores.

As curvas de morte permitiram verificar a perda de viabilidade na presença do composto na respetiva CMI, até às 24h após a exposição. Deste modo, o 3M2QNXC parece ser adequado para prevenir ou tratar infeções causadas por estas estirpes, podendo constituir uma futura opção terapêutica.

CAPÍTULO 9

Bioatividade do composto 2-hidrofenzina-n-
dióxido (2HF)

9. Bioatividade do composto 2HF

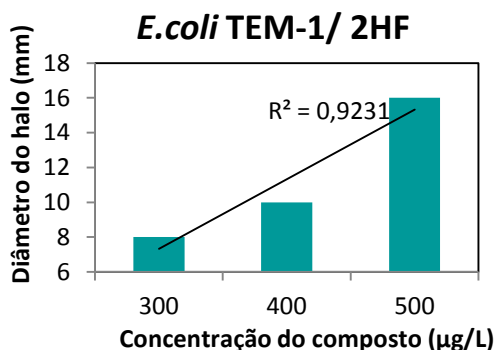
9.1 Atividade antimicrobiana do composto 2HF

9.1.1 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana do composto 2HF foi avaliada em todos os modelos procariotas e eucariotas utilizando o método de difusão em disco. As concentrações testadas inicialmente em todos os modelos eucariotas e procariotas foram 500, 100, 50, 20, 5 e 0 $\mu\text{g/L}$. O zero corresponde ao controlo negativo (disco em branco), para cada medição ao longo do tempo. Após o período de incubação das placas inoculadas e contendo os discos com as diferentes concentrações de composto, observou-se a formação de halo de inibição apenas para a estirpe *E.coli* TEM-1. O disco em branco que não apresentava qualquer composto não se observou halo de inibição, pelo que os resultados puderam ser validados.

Para as concentrações inicialmente testadas, apenas se observou halo de inibição para *E.coli* TEM-1 na concentração de 500 $\mu\text{g/L}$ (16 mm de diâmetro). Deste modo, testaram-se as concentrações entre 500 e 100 $\mu\text{g/L}$, verificando-se que nas concentrações 400 e 300 $\mu\text{g/L}$ ocorreu formação de halos de inibição com diâmetro de 10 e 8 mm respetivamente. (Gráfico 24) O valor de R^2 encontrado para este grupo foi de 0,92, indicando que 92% da variação dos valores dos halos de inibição são explicados pela variação na concentração do composto. A *E.coli* TEM-1 é sensível à ciprofloxacina e ao cefoxitin (apresentado em capítulos anteriores).

Gráfico 24. Relação entre a Concentração *versus* diâmetro do halo de inibição para a estirpe *E.coli* TEM-1 na presença do composto 2HF em diferentes concentrações.



9.1.2 Método de Microdiluição

O método para determinação da CMI foi aplicado ao grupo *E.coli* TEM-1/ 2HF uma vez que se observou atividade antimicrobiana no ensaio anterior. Na microplaca foi efetuado um controlo positivo (meio TSB com a respetiva estirpe) para esta estirpe e um controlo negativo (apenas TSB). Após o período de incubação da microplaca o poço que correspondia ao controlo negativo apresentou turvação do meio de cultura indicando crescimento microbiano, e o controlo negativo não apresentava turvação. Deste modo, os resultados obtidos para as diluições puderam ser validados.

Nos restantes cinco poços da microplaca foram efetuadas as diluições de 1:1,25 de 2HF, de forma que fosse testada uma ou mais concentrações inferiores e superiores 300 µg/L (concentração mais baixa com a qual ocorreu formação de halo de inibição). Deste modo, obtiveram-se as seguintes concentrações finais: 400, 320, 256, 204,8, 163,8 µg/L. A presença de turvação foi observada apenas nos poços com as concentrações de 256, 204,8, 163,8 µg/L de 2HF, indicando crescimento bacteriano. A menor concentração em que não se observou turvação do meio (ausência de crescimento microbiano) foi na concentração de 320 µg/L. Assim, este valor corresponde à CMI de 2HF capaz de inibir o crescimento da *E.coli* TEM-1, e que mantém as células viáveis após exposição ao composto.

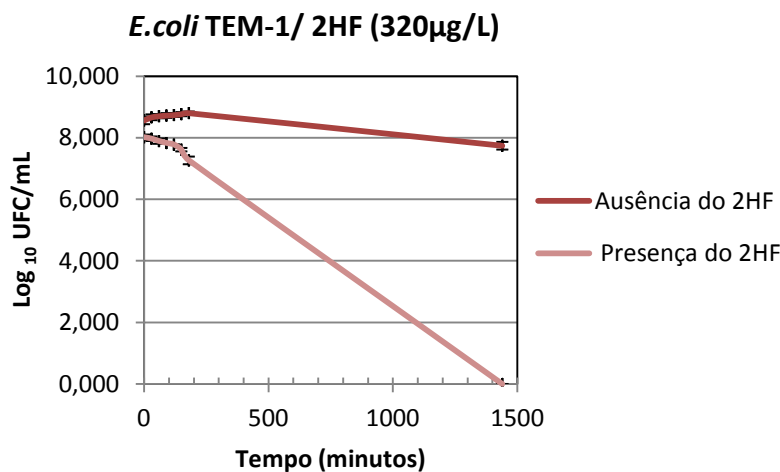
9.2 Curva de morte versus viabilidade celular

O composto 2HF apresenta atividade antimicrobiana apenas contra a *E.coli* TEM-1, como se observou no método de difusão em disco, e parece inibir o seu crescimento na concentração de 320 µg/L, como mostrou o método anterior. Posteriormente pretendia-se conhecer a influência do 2HF na CMI no crescimento da *E.coli* TEM-1 comparativamente com a ausência do 2HF. Como já tinha sido determinada a diluição ótima para esta estirpe em ensaios anteriores procedeu-se à preparação de duas suspensões bacterianas de *E.coli* TEM-1 em solução salina (NaCl a 0,9%) e diluídas para 10^{-5} . Numa das suspensões foi adicionado o composto 2HF na CMI (320µg/L) determinada anteriormente. A outra suspensão permite observar a evolução do crescimento microbiano ao longo do tempo na ausência do composto. Posteriormente determinaram-se as UFC/mL na presença e ausência do composto para cada grupo estirpe/composto e, construíram-se as curvas de morte que mostram a evolução do crescimento destas estirpes ao longo do tempo na presença e ausência do

composto. A viabilidade, foi observada pela presença de crescimento em meio de cultura TSA, a partir do qual, se efetuaram as contagens de colônias e se determinaram as UFC/mL.

No gráfico 25 (*E.coli* TEM-1/ 2HF) a curva vermelha representa o logaritmo do número das UFC/mL desta estirpe na ausência do composto. A evolução do crescimento na ausência do composto é semelhante para todas as estirpes e, portanto, a sua interpretação é a mesma. Analisando o mesmo gráfico e tendo em conta a curva cor-de-rosa (presença do 2HF na concentração de 320 µg/L) verifica-se que nos minutos iniciais, a presença do composto provocou uma diminuição no crescimento bacteriano uma vez que o número de UFC/mL diminuiu. À 24h não foram observadas colônias viáveis, indicando que o composto 2HF apresenta uma ação antibacteriana na concentração de 320 µg/L para esta estirpe.

Gráfico 25. Evolução do crescimento das estirpes bacterianas ao longo do tempo, dos 0 aos 180 minutos e às 24h (1440 minutos), na ausência da 2HF (curva vermelha) e na presença da 2HF na concentração de 320 µg/L (curva cor-de-rosa).



Concluindo, o composto 2HF apenas apresentou atividade antimicrobiana contra a estirpe *E.coli* TEM-1. O 2HF e a QNX diferem apenas na presença da hidrofenzazina na posição 2 do composto 2HF, e esta diferença parece estar envolvida na diferença das CMI determinadas.

CAPÍTULO 10

Bioatividade do composto 3-metil-N-(2-metilfenil)quinoxalinacarboxamida-1,4-dióxido

[3MN(2MF)QNXC]

10. Bioatividade do composto 3MN(2MF)QNXC

10.1 Atividade antimicrobiana do composto 3MN(2MF)QNXC

O composto 3MN(2MF)QNXC é um dos compostos estudados que não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma das estirpes estudadas nas concentrações de 500, 100, 50, 20 e 5µg/L. Deste modo, não foram efetuados novos ensaios tal como se observou para os compostos que apresentaram atividade antimicrobiana.

Tendo em conta a estrutura química de todos os compostos estudados, aqueles que apresentavam um grupo metil no carbono 2 ou 3 do anel azotado apresentaram atividade antimicrobiana para algumas estirpes. Contudo, quando associados a grupos benzoil ou benzil parecia perderem a atividade antimicrobiana, tal como se observou para os compostos 2M3BenzoilQNX e 2M3BQNX. O composto 3M2QNXC apresenta um grupo metil no carbono 3 e um grupo carboxamida no carbono 2 e apresentou atividade antimicrobiana. Quanto ao composto 3MN(2MF)QNXC, na sua estrutura química possui um grupo metil no carbono 3 do anel azotado, um grupo metil no carbono 2 do anel aromático adicionado à estrutura base da quinoxalina e um grupo carboxamida. Deste modo, a ausência de atividade pode ter sido determinada pela presença do novo anel aromático com um grupo metil no seu carbono 2.

CAPÍTULO 11

Curva de crescimento para um Modelo

Eucariota (*S.cerevisiae* PYCC 4072)

11. Curva de crescimento para um Modelo Eucariota

As células bacterianas diferem das células humanas em muitos aspectos fundamentais, de forma que há mais oportunidades para desenvolvimento de novos medicamentos. Em contraste, fungos, parasitas e vírus compartilham estruturas com as células humanas. Deste modo, este ensaio permite avaliar a ação dos compostos que apresentaram atividade antimicrobiana nas bactérias, num modelo eucariota não humano (*S.cerevisiae* PYCC 4072).

Foram preparadas suspensões microbianas em NaCl (0,9%) com uma densidade de 0,5 McFarland. Uma das suspensões foi utilizada como branco (ausência de composto), para comparação do crescimento ao longo do tempo com as suspensões na presença dos compostos. A partir das restantes suspensões foram preparadas soluções com um volume total de 1,5 mL, com uma concentração final de cada composto de 500 µg/L.

De 30 em 30 minutos, ao longo de 210 minutos, e às 24h, inocularam-se placas de YEPD com 20 µL de cada suspensão (presença e ausência do composto), em triplicado, e incubaram-se a 37°C durante 24h. Para cada grupo *S.cerevisiae*/composto utilizaram-se três placas de YEPD, em que, uma mostra os resultados dos 0 aos 90 minutos e a outra placa dos 120 aos 210 minutos. (Figura 23) Como houve crescimento celular, o que indica que as células se encontravam viáveis em todos os períodos de tempo, efetuou-se a contagem das colónias, calcularam-se as UFC/mL para cada período de tempo e construíram-se os gráficos UFC/mL *versus* tempo. Estes gráficos mostram a evolução do crescimento, ao longo do tempo, da *S.cerevisiae* na presença e ausência dos compostos.

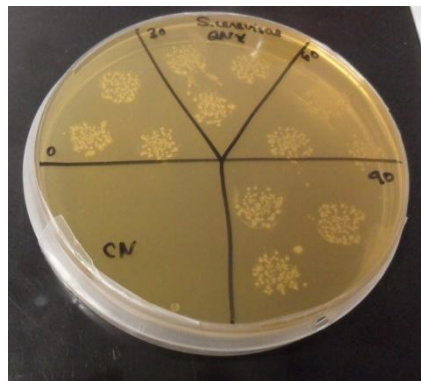


Figura 23. Controlo negativo e viabilidade da *S.cerevisiae* na presença da QNX aos 0, 30, 60 e 90 minutos.

A curva a vermelho dos gráficos apresentados, mostra a evolução do crescimento da levedura ao longo do tempo na ausência de qualquer composto. Inicialmente, observa-se um aumento ligeiro no crescimento microbiano devido ao aumento das UFC/mL (aumento da viabilidade), e, posteriormente, observa-se uma diminuição desse crescimento até às 24h. O aumento do crescimento inicial deve-se à capacidade das estirpes crescerem na ausência de nutrientes uma vez que utilizam as suas reservas de nutrientes. A diminuição no crescimento, ao longo do tempo, observa-se quando já ocorreu a depleção das reservas, uma vez que a suspensão foi efetuada em solução salina e não em meio de cultura rico em nutrientes.

No gráfico 26, observa-se que as UFC/mL na presença da QNX (curva a azul), aumentam bastante até aos 210 minutos, indicando um aumento na viabilidade celular comparativamente com a ausência do composto. Entre os 210 minutos e as 24h, o número de UFC/mL diminuiu ligeiramente. Contudo, o número de UFC/mL na presença do composto é bastante superior ao observado na ausência do composto. Uma vez que não existem nutrientes disponíveis no meio, esse aumento sugere que esta estirpe utiliza o composto químico como fonte de energia. Dikicioglu et al (2011) refere que a fonte de carbono preferida desta levedura é a glucose e a principal fonte de azoto é o glutamato. Assim, os resultados obtidos no presente estudo podem indicar que as quinoxalinas e seus derivados constituem excelentes fontes de carbono e azoto. De acordo com Conway *et al* (2012), a *S.cerevisiae* (estirpe S288C), na ausência de glucose, azoto ou fósforo, entra numa fase de quiescência, em que não ocorre crescimento nem divisão celular. Contudo, os compostos utilizados neste estudo constituem apenas fontes de carbono e azoto, e ocorreu aumento das UFC/mL ao longo do tempo. A diferença nos resultados do presente estudo e do estudo deste autor pode estar associada às estirpes utilizadas.

Na presença dos restantes compostos (Gráfico 27, 28, 29 e 30), onde a *S.cerevisiae* foi exposta, respetivamente, aos compostos 2MQNX, 2A3CQNX 3M2QNX e 2HF, também se observou um aumento das UFC/mL ao longo do tempo (dos 0 aos 210 minutos). Isto indica um aumento de viabilidade da *S. cerevisiae* na presença de qualquer um destes compostos e na ausência de nutrientes. Como referido anteriormente, esta estirpe parece utilizar estes compostos como fonte de carbono e azoto (quimiotrófica).

Gráfico 26. Influência dos compostos QNX no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

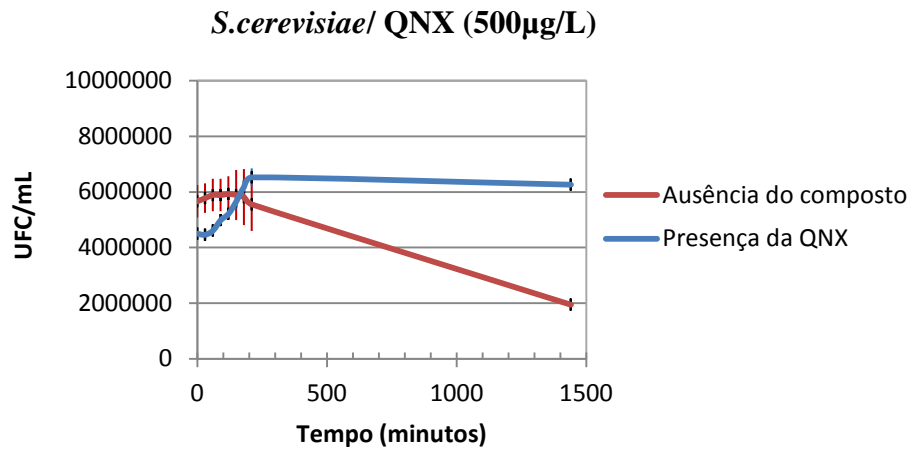


Gráfico 27. Influência do composto 2MQNX no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

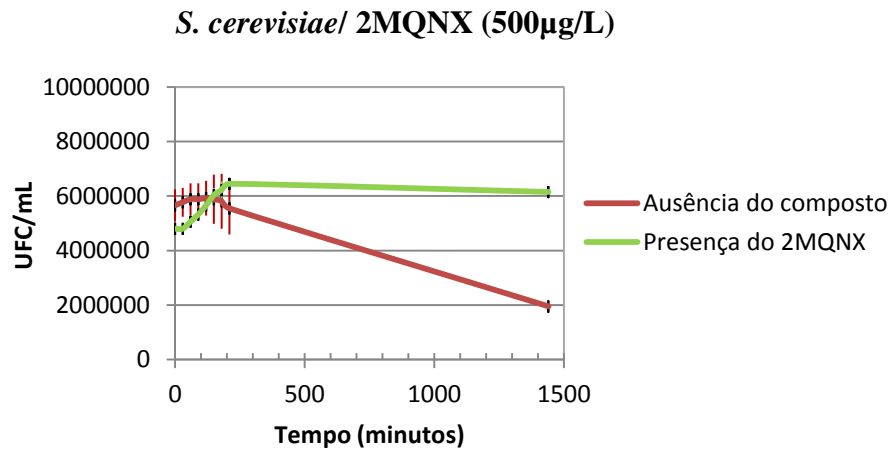


Gráfico 28. Influência do composto 2MQNX no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

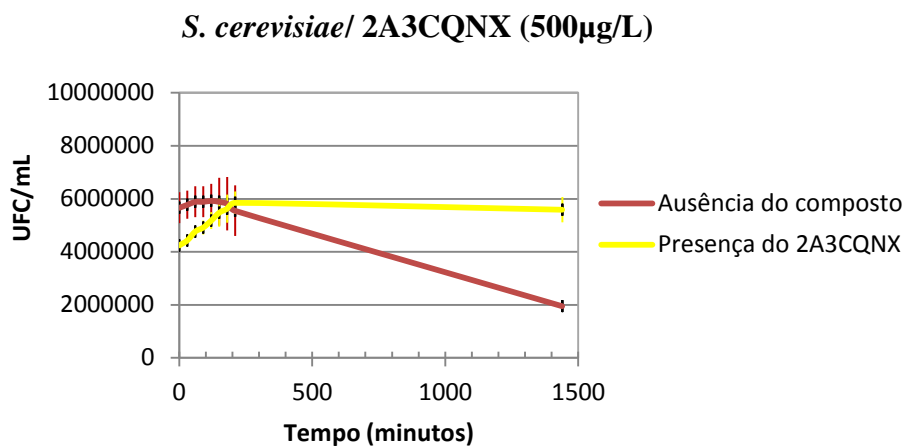


Gráfico 29. Influência do composto 3M2QNXC no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.

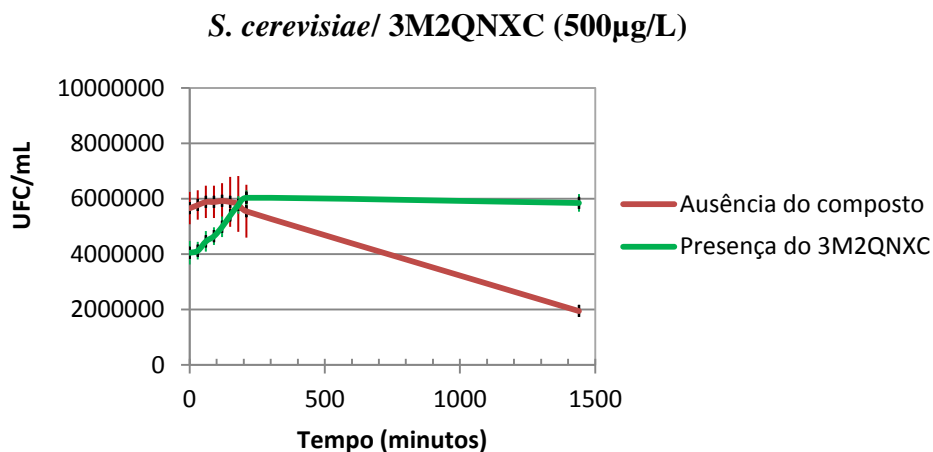
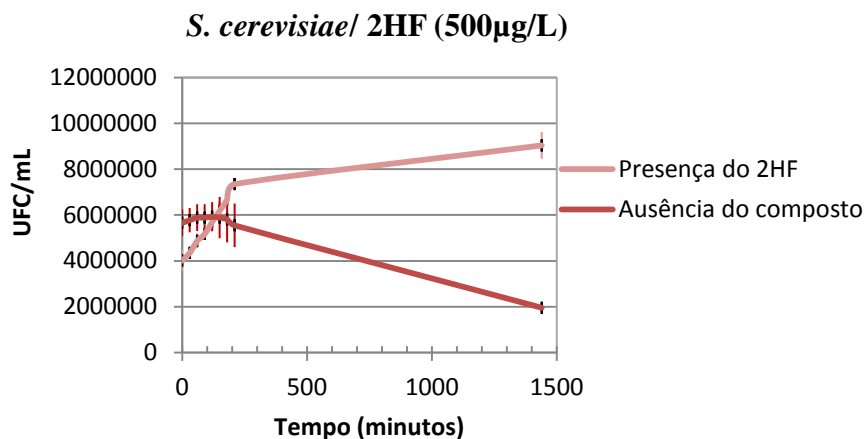


Gráfico 30. Influência do composto 2HF no crescimento da *S. cerevisiae* na concentração de 500µg/L.



Pela análise dos resultados apresentados acima, verifica-se que o número de UFC/mL de *S. cerevisiae*, na presença dos compostos estudados, aumentou desde a exposição aos compostos até aos 210 minutos. É de salientar o facto de que aos 210 minutos, o número de UFC/mL ser superior ao observado na ausência dos compostos. Assim, estes compostos não são citotóxicos para o modelo eucariótico não humano, selecionado para este estudo (*S. cerevisiae*). Deste modo, todos os compostos que apresentaram atividade antibacteriana nos ensaios anteriores, constituem potenciais agentes quimioterápicos para a terapia antibacteriana e sugere-se uma baixa toxicidade em modelos celulares humanos.

Conclusão

Conclusão

A principal conclusão retirada do trabalho desenvolvido ao longo deste estudo, é que, dos oito compostos estudados, cinco apresentaram atividade antimicrobiana em modelos procariotas Gram negativos, à exceção da *E. coli* CTX-M2, *E. coli* CTM-M9. A ausência de atividade em modelos procariotas Gram positivos e modelos eucariotas, sugerem que as diferenças estruturais entre bactérias Gram positivas e negativas, e entre estas e as células eucariotas, possam estar envolvidas na ausência de atividade. Para além disso, a presença de grupos funcionais em determinadas posições das moléculas estudadas parecem contribuir para presença ou ausência de atividade antimicrobiana. A presença do grupo CH₃ no carbono 3 potencia a atividade antimicrobiana como se observou para o composto 3M2QNXC. Contudo, quando este surge em simultâneo com outros grupos aromáticos [3MN(2MF)QNXC], a sua atividade antimicrobiana parece ser eliminada. Para a presença do grupo CH₃ no carbono 2, tal como se verifica para o composto 2MQNX, este também apresentou atividade antimicrobiana e, quando surge em simultâneo com outros grupos aromáticos também parece perder a atividade (2M3BenzilQNX e 2M3BenzoilQNX).

A maioria dos compostos exerce uma ação antibacteriana na CMI determinada. Apesar dos efeitos no crescimento/viabilidade de determinadas estirpes, os compostos com atividade antimicrobiana não apresentaram atividade contra o modelo eucariota não humano, como ainda se comprovou que a presença parece contribuir para o seu crescimento.

Deste modo, se estes compostos fossem utilizados para combater infeções causadas por microrganismos Gram negativos, provavelmente não apresentariam toxicidade nas células eucarióticas humanas. Assim, é importante investir em novos ensaios, sobretudo em linhagens celulares, utilizando os compostos com atividade antimicrobiana. Futuramente não esquecer que os restantes compostos podem apresentar atividade noutras concentrações ou noutras estirpes.

Em suma, este estudo permitiu conhecer a atividade antimicrobiana de novos compostos químicos derivados da quinoxalina 1,4-dióxido que poderá ser um grande contributo para a ciência no desenvolvimento de novas terapêuticas.

Perspetivas futuras

Perspetivas futuras

Os resultados obtidos neste estudo da avaliação da atividade antimicrobiana na QNX e seus derivados permitiram conhecer novos compostos que podem constituir possíveis agentes antimicrobianos para tratamento de infeções.

- Deste modo, o próximo passo é conhecer o fenótipo das estirpes que se apresentaram suscetíveis aos compostos químicos, comparando os fenótipos na presença e na ausência dos compostos. Isto permitirá sobretudo confirmar se os compostos estudados podem causar alterações fenotípicas nas bactérias após exposição a estes.

- Posteriormente, pretende-se ainda estudar os mecanismos de ação dos compostos com atividade antimicrobiana de forma a verificar se os mecanismos envolvidos já são conhecidos ou se se tratam de novos mecanismos de ação.

- Conhecer os mecanismos de resistências das estirpes com as quais não se observou atividade e verificar se há envolvimento de algum grupo funcional específico do composto, nessa resistência.

- Para os compostos com boa atividade antimicrobiana em modelos procariotas pretende-se avaliar a sua toxicidade em modelos eucariotas (linhagens celulares normais).

- Pretende-se ainda, testar a atividade antitumoral de todos os compostos, em linhagens celulares normais e tumorais, uma vez que existem estudos que indicam atividade antitumoral em moléculas semelhantes às estudadas neste trabalho.

Bibliografia

Bibliografia

Autoridade Nacional de Segurança Alimentar e Económica (2010). *Riscos e alimentos: Alimentos de origem animal*. Último acesso a 21/08/2012 em <http://www.asae.pt/>

Azqueta, A., Pachón, G., Cascante, M., Creppy, E., Cerain, A.L. (2005). DNA damage induced by a quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivative (hypoxic selective agent) in Caco-2 cells evaluated by the comet assay. *Mutagenesis*, 20 (3), 165-71.

Azqueta, A., Arbillaga, L., Pachón, G., Cascante, M., Creppy, E., Cerain, A.L. (2007). A quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivative induces DNA oxidative damage not attenuated by vitamin C and E treatment. *Chemico-Biological Interactions*, 168, 95-105.

Barea, C., Pabón, A., Galeano, S., Pérez-Silanes, S., Gonzalez, G., Deysard, C. *et al* (2012) Antiplasmodial and Leishmanicidal Activities of 2-Cyano-3-(4-phenylpiperazine-1-carboxamido)Quinoxaline 1,4-Dioxide Derivatives. *Molecules*, 17, 9451-61.

Botstein, D. & Fink, D. (2011). Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics Society of America*, 189, 695-704.

Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., Jolivet-Gougeon, A. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds – a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, 381-89.

Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A. (1995). A Functional Classification Scheme for β -lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, p1211-33.

Bradford, P.A. (2001). Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4), 933-51.

Brusselaers, N., Vogelaers, D., Blot, S. (2011) The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. *Annals of Intensive Care*, 1, 1-7.

Cafiso, V., Bertuccio, T., Spina, D., Purrello, S., Campanile, F., Pietro, C., *et al* (2012). Modulating Activity of Vancomycin and Daptomicin on the Expression of Autolyses

Cell-Wall Turnover and Membrane Charge Genes in hVISA and VISA strains. *PLoS Pathogens*, 7 (1).

Carta, A., Paglietti, G., Nikookar, M.E.R., Sanna, P., Sechi, L., Zanetti, S. (2002). Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with in vitro antimicrobial and anticandida activity. *European Journal of Medical Chemistry*, 37, p.355-66.

Cercenado, E. (2010). Actualización en las resistencias de las bacterias Gram positivas. *Medicina Clínica*, 135, 10-15.

Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). Último acceso a 21/08/2012 em <http://www.ebi.ac.uk/chebi/>

Chopra, I., & Roberts, M (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2), 232-60.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.)

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast; Approved Guideline – Second Edition*. CLSI document M44-A2 (ISBN 1-56238-703-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition*. CLSI document M7-A7 (ISBN 1-56238-587-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory

Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005).

Conway, M., Grunwald, D., Heideman, W. (2012) Glucose, Nitrogen, and Phosphate Repletion in *Saccharomyces cerevisiae*: Common Transcriptional Responses to Different Nutrient Signals. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2, 1003-17.

Coque, T.M., Baquero, F., Canton, R. (2008) Increasing Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*, 13 (47).

Collignon, P., Powers, J.H., Chiller, T.M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F. M. (2009). World Health Organization Ranking of Antimicrobials According To Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. *Clinical Infectious Disease*, 49, 132-41.

Collin, F., Karkare S., Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 479-97.

Dhillon, R. & Clark, J. (2012). ESBLs: A Clear and Present Danger? *Critical Care Research and Practise*, 2012.

Diab-Assef, M., Haddadin, M.J., Yared, P., Assaad, C., Gali-Muhtasib, H.U. (2002). Quinoxaline 1,4-dioxides: hypoxia-selective therapeutic agents. *Molecular Carcinogenesis*, 33, 198-205.

Dikicioglu, D., Karabekmez, E., Rash, B., Pir, P., Kirdar, B., Oliver, S. (2011) How Yeast re-programmes its transcriptional profile in response to different nutrient impulses. *BMC Systems Biology*, 5, 1-16.

Drawz, S.M., Bonomo, R.A. (2010). Three decades of β -lactamases Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (1), 160-201.

Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.E., Tristan, A., Vandenesch, F. (2010) Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. *Medecine/Science*, 26, 943-49.

El-Hawash, S.A.M., Habib, N.S., Kassem, M.A. (2006). Synthesis of some New Quinoxalines and 1,2,4-Triazolo [4,3-*a*]-quinoxalines for Evaluation of *in vitro* Antitumor and Antimicrobial Activities. *Archiv der Pharmacie – Chemistry in Life Science*, 339, 564-71.

Estevez, Y., Quilano, M.,Burguete, A., Cabanillas, B., Zimic, M., Málaga, E. (2011). Trypanocidal properties, structure-activity relationship and computational studies of quinoxaline 1.4-di-N-oxide derivatives. *Experimental parasitology*, 127 (4), 745-51.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2008). *Annual Report 2008: On-going surveillance of S.pneumoniae, S.aureus, E.coli, E.faecium, E.faecalis, K.pneumoniae, P.aeruginosa*.

Fernandes R., Amador P., Prudêncio C. (2012) β -lactams: chemical structure, modes of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*. (in press)

Fry, D.E., & Barie, P.S. (2011). The Changing Face of *Staphylococcus aureus*: A Continuing Surgical Challenge. *Surgical Infections*, 12 (3), 191-203.

Galeone, M., Coluci, R., D'Erme, A.M., Moretti, S., Lotti, T. (2012) Potential Infectious Etiology of Bençet's Disease. *Pathology Research International*, 2012.

Gao, W., Chua, K., Davies, J.K.,Newton, H.J.,Seemann, T., Harrison, P.F. *et al* (2010) Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. *PLOS Pathogens*, 6 (6), e1000944.

García-Hernández, A.M.,García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yague, G., Herrero, J.A. *et al* (2011)Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, 24 (2), 57-66.

Garnacho-Montero, J., Amaya-Villar, R., Gómez-Grande, M.L.,Jerez, V., Gómez-Coronado, Lorente-Ramos, L. *et al* (2011). Papel de daptomicina en el tratamiento empírico y dirigido de infecciones por cocos Gram positivos del paciente crítico. *Revista Española de Quimioterapia*, 24 (1), 13-24.

Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases producing *E.coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Frontiers in Microbiology*, 2.

Giedraitiene, A., Vitkauskiene, A., Naginiene, R., Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina*, 47 (3), 137-46.

Harada, S., Ishii, Y., Yamagushi, K. (2008). Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28, 401-12.

Hamoud, S., Keidar, Z., Hayek, T. (2011) Recurrent *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia in a Otherwise Healthy Patient. *Israel Medical Association Journal*, 13, 575-76.

International Working Group on the Classification Staphylococcal Cassette Chromosome (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2), p.4961-67.

James, R.C., Pierce, J.G., Okano, A., Xie, J., Boger, D. (2012). Redesign of Glycopeptides Antibiotics: Back to the Future. *American Chemical Society*, 7, 797-804.

Kleim, J.P., Bender, R., Billhardt, U.M., Meichsner, C., Riess, G., Rosner, M. *et al* (1993). Activity of a novel Quinoxaline Derivative against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Viral Replication. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 37 (8), 1659-64.

LaFayette, S.L., Collins, C., Zaas, A.K., Schell, W.A., Betancourt-Quiroz, M., Gunatilaka, A.A.L. *et al* (2010) PKC Signaling Regulates Drug Resistance of the Fungal Pathogen *Candida albicans* via Circuitry Comprised of Mkc1, Calcineurin, and Hsp90. *PLOS Pathogens*, 6 (8), e1001069.

Laudano, J.B. (2011). Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, p.iii11-iii18.

- Lewis, R.E., Viale, P., Kontoyiannis, D.P. (2012) The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. *Virulence*, 3, 368-76.
- Magnet, S., Arbeloa, A., Mainardi J.L., Hugonnet, J.E., Fourgeaud, M., Dubost, L. *et al* (2007) Specificity of L,D-Transpeptidases from Gram-positive Bacteria Producing Different Peptidoglycan Chemotypes. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, p.13151-59.
- Malachowa, N., & DeLeo, F.R. (2010). Mobile Genetics Elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Science*, 67, 3057-71.
- Martinez, J.L. (2009) Environmental pollution by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157, 2893 – 2902.
- McAdow, M., Kim, H.K., DeDent, A.C., Hendrickx, A.P., Schneewind, O., Missiakas, D.M. (2011). Preventing *Staphylococcus aureus* Sepsis through the Inhibition of its Agglutination in Blood. *PLoS Pathogens*, 7 (10).
- McCallum, N., Berger-Bachi, B., Senn, MM. (2010). Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, p.118-29.
- Mendes, J.J (2010) Resistência Antibiótica no *Staphylococcus aureus*; da Investigação básica à prática Clínica.
- Michon, A., Allou, N., Chau, F., Podglagen, I., Fantin, B., Cambau, E. (2011) Plasmidic *qnrA3* Enhances *Escherichia coli* Fitness in Absence of Antibiotic Exposure. *PLOS ONE*, 6 (9), e24552.
- Mulvey, M.R. & Simor, A.E. (2009) Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?. *Canadian Medical Association Journal*, 180 (4), 408-15.
- Naseer, U. & Sundsfjord, A. (2011) The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and *Escherichia coli* Clones. *Microbial Drug Resistance*, 17 (1), 83-97.
- Nastaly, P., Grinholc, M., Bielawski, K.P. (2010). Molecular Characteristics of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains for clinical medicine. *Archives of microbiology*, 192, 603-17.

Oliveira, J.H., Granato, A.C., Hirata D.B., Hokka C.O., Barbosa, M. (2009). Ácido Clavulânico e cefamicinas C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Química Nova*, 32 (8), 2142-50.

Onwubico, E.N. & Sadiq, N.M. (2011). Antibiotic sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* from clinical isolates in a tertiary health institution in Kano, Northwester Nigeria. *Pan African Medical Journal*, 8.

Oshitani, N., Hato, F., Jinno, Y., Sawa, Y., Nakamura, S., Matsumoto, T. (2001) IgG subclasses of anti *Saccharomyces cerevisiae* antibody in inflammatory bowel disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 31, 221-25.

Otto, M. (2010). Basis of virulence in community-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology*, 64, 143-62.

Overton, I.M., Graham, S., Gould, K.A., Hinds, J., Botting, C.H., Shirran, S. *et al* (2011). Global network analysis of drug tolerance, mode of action and virulence in methicillin-resistant *S.aureus*. *BMC Systems Biology*, 5 (68), 2-16.

Papp-Walace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A. (2011). Carbapenemos: Past, Present and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (11), 4943-60.

Pfaller, M.A.(2012) Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*, 125 (1A), S3-S13.

Plata, K., Rosato, A.E., Węgrzyn, G. (2009). *Staphylococcus aureus* as na infectious agente: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*, 56 (4), 597-612.

Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P. (2012). Plasmide-mediated quinolona resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-7.

Report of WHO working group consultation (2006). Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use.

Ribeiro da Silva, M., Gomes, J., Gonçalves, J., Sousa, E., Pandley, S., Acree, W. (2004) Thermochemistry of 2-amino-3-quinoxalinecarbonitrile-1,4-dioxide. Evaluation of the

mean dissociation enthalpy of the (N-O) bond. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2, 2507-12.

Robert, M.C. (2003). Tetracycline Therapy: Update. *Antimicrobial Resistance*, 36, 462-67.

Robert, M.C. (2011). Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Frontiers of Microbiology*, 2, 1-8.

Rice, L.B. (2012). Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Symposium on Antimicrobial Therapy*, 87 (2), 198-208.

Richter, S.S., Satola, S.W., Crispell, E.K., Heilmann, K.P., Dohn, C.L., Riahi, F. (2011). Detection of *Staphylococcus aureus* Isolates with Heterogeneous Intermediate-Level Resistance to Vancomycin in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (12), p.4203-7.

Rogers, B.A., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L. (2011). *Escherichia coli* O25b:ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1-14.

Saravolatz, L.D., Stein, G.E., Johnson, L.B. (2011). Ceftaroline: A Novel Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious disease*, 52 (9), 1156-63.

Schubert, S., Barker, K.S., Znaidi, S., Schneider, S., Dierolf, F., Dunkel, N. (2011) Regulation of Efflux Pump Expression and Drug Resistance by the Transcription Factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (5), p.2212-23.

Skold, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research*, 32, 261-73.

Suter, W., Rosselet, A., Knüsel, F. (1978). Mode of Action of Quinoxin and substituted Quinoxaline-di-N-Oxides on *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p 770-83.

Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34, S3-10.

Vandeputte, V., Ferrari, S., Coste, A.T. (2011) Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*, 2012.

Vicente, E., Villar, R., Burguete, A., Solano, B., Pérez-Silanes, S., Aldana, I., Maddry, J.I. *et al* (2008) Efficacy of Quinoxaline-2-Carboxylate 1,4-di-N-oxide Derivates in Experimental tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (9), p.3321-26.

Villar, R., Vicente, E., Solano, B., Pérez-Silanes, S., Aldana, I., Maddry, J.I. *et al* (2008). In vitro and in vivo antimycobacterial activities of ketone, and amide derivatives of quinoxalina 1,4-di-N-oxide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, p.547-54.

Vinh, D.C. (2011) Insights into human antifungal immunity from primary immunodeficiencies. *The Lancet Infectious Disease*, 11, 780-92.

Yamakawa, J., Aminaka, M., Okuzumi, K., Kobayashi, H., Katayama, Y., Kondo, S. (2012). Heterogeneously vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus (hVISA) emerged before the clinical introduction of vancomycin in Japan: a retrospective study. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18, p.406-9.

World Health Organization (2012). *Microbes and Antimicrobials*. Último acesso a 21/08/2012 em http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/en/index.html

World Health Organization (2011) *Drug resistance*. Último acesso a 21/08/2012 em <http://www.who.int/world-health-day/2011/world-health-day2011-brochure.pdf>

World Health Organization (2007). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine.

World Health Organization (2011). World Health Day 2011. Último acesso a 21/08/2012 em http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2011/whd_20110406/en/index.html

Zervos, M.J., Hershberger, E., Nicolau, D.P., Ritchie, D.J., Blackner, L.K., Coyle, E.A. *et al* (2003). Relationship between Fluoroquinolone Use and Changes in Susceptibility

to Fluoroquinolones of Selected Pathogens in 10 United States Teaching Hospitals,
1991-2000. *Clinical Infectious Disease*, 37, 1643-8.