

Agentes Antimicrobianos

10

Patricia R. Neves
Nilton Lincopan

- 10.1 Metabólitos secundários: antibióticos, bacteriocinas e quimioterápicos
- 10.2 Microrganismos podem apresentar mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida
- 10.3 Mecanismos de ação de antibacterianos e resistência bacteriana
 - 10.3.1 Antibacterianos que alteram a integridade da membrana
 - 10.3.2 Antibióticos que inibem a síntese da parede
 - 10.3.2.1 As penicilinas impedem a síntese do peptidoglicano
 - 10.3.2.2 Mecanismos de resistência aos betalactâmicos
 - 10.3.2.3 Mecanismos de ação dos glicopeptídeos
 - 10.3.2.4 Mecanismos de resistência aos glicopeptídeos
 - 10.3.3 Antibióticos que inibem a síntese proteica
 - 10.3.4 Antibióticos que inibem a síntese de ácidos nucleicos
 - 10.3.4.1 Mecanismo de ação das rifamicinas
 - 10.3.4.2 Mecanismo de resistência às rifamicinas
 - 10.3.4.3 Mecanismos de ação das quinolonas e fluoroquinolonas
 - 10.3.4.4 Mecanismos de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas
 - 10.3.4.5 Mecanismo de ação das sulfonamidas e da trimetoprima
 - 10.3.4.6 Mecanismo de resistência às sulfonamidas e à trimetoprima
- 10.4 Sinergismo/antagonismo
- 10.5 Testes para avaliar a atividade de antibióticos
 - 10.5.1 Antibiograma
 - 10.5.1.1 Teste qualitativo ou teste de difusão
 - 10.5.1.2 Teste quantitativo ou teste de diluição
 - 10.5.1.3 Método de gradiente antimicrobiano
 - 10.5.2 Atividade bactericida do soro

Tendo como base o princípio darwiniano de sobrevivência do mais apto, a preservação e o domínio das diferentes espécies microbianas, que colonizam os diversos nichos ecológicos, têm sido governados pela versatilidade metabólica que lhes permite viver nas mais diversas condições ambientais (Capítulos 3 e 4). Além disso, são capazes de produzir substâncias cujas atividades matam outros microrganismos (microbiocidas) ou inibem o seu crescimento (microbiostáticas). Esses compostos incluem os antibióticos e bacteriocinas, além de outras substâncias.

Considerando-se a condição laboratorial em que um meio de cultura líquido é inoculado com solo — ambiente que abriga a maior parte de bactérias e fungos produtores de antibióticos —, rapidamente as diferentes populações entram em fase estacionária pela alta e rápida demanda alimentar. Essa condição de carência nutricional ou de inadequação ambiental estimula as espécies mais aptas à produção de metabólitos secundários, como bacteriocinas e antibióticos, com a finalidade de se perpetuar.

10.1 Metabólitos secundários: antibióticos, bacteriocinas e quimioterápicos

Metabólitos secundários são sintetizados geralmente na fase estacionária do crescimento e apresentam as seguintes características: não são essenciais à reprodução; sua síntese pode ser reprimida pelas condições do meio; são, frequentemente, produzidos como um grupo de substâncias estreitamente relacionadas (p. ex., uma espécie de fungo produz vários tipos de antibióticos relacionados). Os metabólitos secundários são moléculas orgânicas complexas, e sua síntese requer grande número de enzimas específicas. Algumas dessas enzimas estão envolvidas no metabolismo primário, mas a síntese do produto final requer uma enzima especial ativa na fase estacionária. Por exemplo, a polimixina, por ser sintetizada a partir de fenilalanina, requer enzimas do metabolismo primário, mas a final é do metabolismo secundário.

Antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular, diferindo das bacteriocinas pelo fato de não serem proteicos, portanto, não suscetíveis à clivagem por proteases, não sendo inativados rapidamente no estômago e intestino. Apresentam espectro de atividade restrito (Gram-positivos ou Gram-negativos) ou amplo (Gram-positivos e Gram-negativos), produzidos por uma grande variedade de microrganismos (incluindo fungos e bactérias).

Historicamente, em 1928, Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico, denominado penicilina, pois era produzido por um fungo, o *Penicillium notatum*. A atividade antibacteriana foi evidenciada pela inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ao redor do fungo. A descoberta da antibiose abriu as portas para um universo de compostos produzidos por microrganismos com mecanismos de ação contra outros seres vivos. Da mesma forma, rapidamente foram identificados mecanismos de resistência a esses compostos, seja pelos próprios produtores (autodefesa) ou contra os compostos produzidos por microrganismos agressores.

Os conhecimentos sobre a eficácia da penicilina foram alcançados por Howard Florey e Ernst Chain em 1940-1941 após sua produção e purificação em escala piloto. Sem dúvida, a descoberta dos antibióticos foi um dos maiores avanços na medicina no que se refere às doenças infecciosas. Porém, o uso exacerbado desses compostos em diversas áreas como medicina humana, veterinária e agronegócio tem comprometido seu uso, uma vez que tem favorecido a emergência e a seleção de bactérias multirresistentes, criando um cenário que hipotetiza o retorno a uma “era pré-antibiótica”. Essa emergência de resistentes era previsível do ponto de vista biológico, uma vez que, naturalmente, estavam presentes nas células tanto os mecanismos de antibiose como aqueles que permitem a defesa contra estes.

Uma das características mais importantes dos antibióticos, do ponto de vista clínico, é sua grande seletividade por alvos bacterianos, distintos das estruturas funcionalmente análogas, presentes nas células eucarióticas. Essas características foram criteriosamente priorizadas durante o processo de seleção de cepas produtoras de antibióticos. Um fato interessante é que aqueles antibióticos que não foram selecionados para a prática clínica no controle de infecções bacterianas, pois apresentavam uma alta toxicidade contra células eucarióticas, foram úteis para o desenvolvimento de agentes anticâncer usados em animais superiores.

Bacteriocinas são peptídios ou proteínas produzidos por bactérias tóxicas para outras bactérias. São codificadas por genes contidos em plasmídios especializados. Comumente o plasmídio e a proteína tóxica têm nome derivado do gênero ou espécie da bactéria produtora. Por exemplo, *E. coli* pode produzir uma colicina e transporta plasmídios colicinogênicos. As colicinas matam outras bactérias por vários mecanismos que causam a morte por inativação de alguma função crítica à célula, como: inativação da membrana celular pela formação de canais que permitem a saída de nutrientes do citoplasma ou pela presença de atividade de nucleases, que inativam DNA ou RNA. As bacteriocinas têm seu espectro de atividade mais restrito que os antibióticos, atingindo espécies estreitamente relacionadas ao seu nicho ecológico.

A pesquisa biotecnológica de bacteriocinas está direcionada para o controle microbiológico de alimentos, uma vez que o uso de antibióticos como preservantes está sendo mundialmente banido. Um exemplo da investigação de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus* spp. é mostrado na **Tabela 10.1**. O espectro de ação de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sake* foi avaliado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Destaca-se a inibição de *Listeria monocytogenes*, agente bacteriano de importância na microbiologia médica e de alimentos. Também foi constatado que as bacteriocinas liberadas por *Lactobacillus sake* não foram eficientes contra bactérias Gram-negativas.

Tabela 10.1 Espectro de inibição de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake*.

Espécie testada	Inibição pelo sobrenadante de uma cultura de <i>L. sake</i> *
Gram-positivos	
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Carnobacterium piscicola</i>	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+
<i>Enterococcus faecium</i>	+
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	(+)
<i>Lactobacillus casei</i>	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-

(-) ausência de inibição, (+) inibição parcial (halos entre 0,5 - 1,0 mm), + inibição total (halos > 1,0 mm).

Uma bacteriocina amplamente utilizada em microbiologia de alimentos é a nisina, produzida por linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (cepa ATCC 11454), cujo mecanismo de ação sugerido seria a formação de poros na membrana citoplasmática. Essa bacteriocina integra a composição de fermentos lácticos para o processamento de derivados do leite como queijos e produtos enlatados. A nisina tem ação bactericida contra bactérias Gram-positivas, incluindo espécies esporuladas como *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp.

Os **quimioterápicos**, ao contrário dos antibióticos e das bacteriocinas, são compostos sintéticos. Curiosamente, o êxito da pesquisa de antimicrobianos iniciou-se com a descoberta dos quimioterápicos, que precedeu a descoberta dos antibióticos. Paul Ehrlich (1854-1915) foi pioneiro na quimioterapia, desenvolvendo em 1909 o salvarsan, primeiro composto antibacteriano utilizado com sucesso no tratamento da sífilis. Os estudos de Ehrlich foram baseados na modificação de corantes, estratégia consolidada em 1935 por Domagk, com a descoberta do prontossil. Pela hidrólise do prontossil rubrum, um corante vermelho, originam-se *in vivo* os derivados antibacterianos conhecidos como sulfas ou sulfonamidas.



Há vários produtos naturais com atividade antibacteriana

Compostos naturais com atividade antibacteriana têm sido utilizados extensamente na medicina popular de muitos países. Compostos extraídos de plantas medicinais tradicionais como óleos essenciais, ou alcaloides, flavonoides etc. têm sido estudados para verificar suas atividades contra fungos, bactérias, parasitas e vírus. A alicina, extraída do alho, na sua forma pura, exibe atividade antimicrobiana contra i) bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ii) fungos, principalmente *Candida albicans*, e iii) parasitas intestinais, como os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. A alicina é sintetizada por conversão do aminoácido sulfuroso alina por ação da enzima alinase (Figura 10.1). As propriedades antimicrobianas da alicina são decorrentes de múltiplos efeitos inibitórios sobre vários sistemas enzimáticos, agindo, principalmente, como inibidores do desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* spp., mas também com atividade antiparasitária, por exemplo, contra *Schistosoma mansoni*. Um aspecto muito interessante sobre a atividade da alicina é a dificuldade que as bactérias exibem para desenvolver resistência a esse composto, devido a seu mecanismo de ação múltiplo, totalmente diferente dos antibióticos comercialmente disponíveis.

Outros produtos naturais com propriedades antimicrobianas, utilizados desde épocas ancestrais, têm sido o mel de abelha, própolis e geleia real. A atividade biológica desses produtos é atribuída principalmente aos compostos fenólicos presentes, como os flavonóides, que teriam atividades antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antialérgica. Por outro lado, também é conhecido que o mel de abelha contém lisozima, um poderoso agente que lisa a parede de bactérias Gram-positivas.

Antibacterianos são agrupados segundo seu mecanismo de ação, atividade bacteriostática ou bactericida, espectro de atividade e estrutura química. Os principais antibióticos e quimioterápicos são agrupados segundo o seu alvo bacteriano e mecanismos de ação. Esses compostos podem agir inibindo a síntese da parede bacteriana ou alterando a integridade da membrana ou inibindo a síntese proteica ou a síntese de ácidos nucleicos (Figura 10.2).

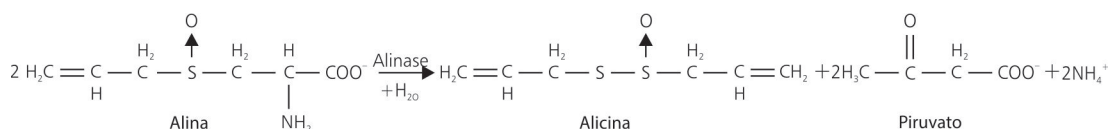


Figura 10.1 Produção de alicina a partir da alina contida no alho.

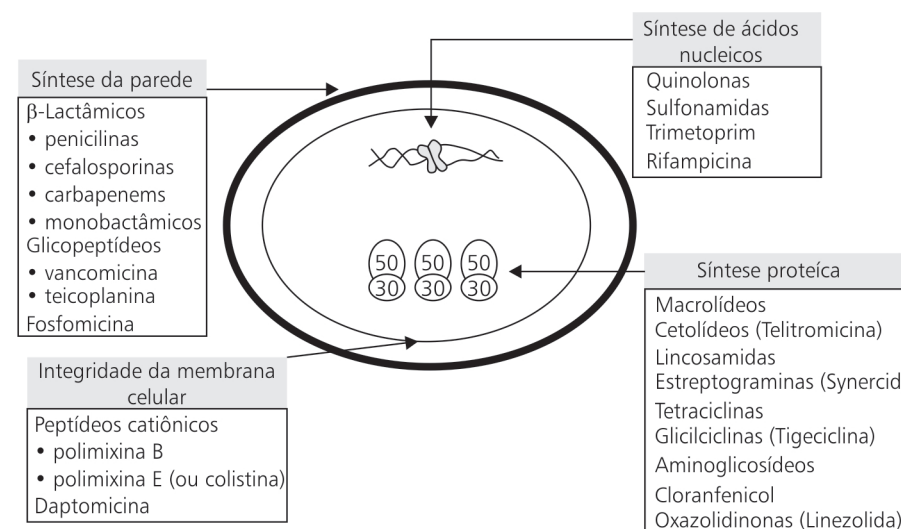


Figura 10.2 Antibióticos e quimioterápicos podem inibir a síntese da parede bacteriana, alterar a integridade da membrana, inibir a síntese proteica ou inibir a síntese de ácidos nucleicos.

10.2 Microrganismos podem apresentar mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida

Como mecanismos de defesa, as bactérias apresentam resistência aos antibacterianos. Algumas bactérias são naturalmente resistentes a determinados antibióticos. A maior parte dos antibacterianos possui maior atividade contra bactérias Gram-positivas, uma vez que bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa de natureza hidrofóbica e de carga negativa, que funciona como uma barreira seletiva que causa o lento influxo (difusão retardada) das drogas, favorecendo a expressão de fenótipos resistentes. Assim, em Gram-negativos a impermeabilidade é um importante mecanismo de resistência intrínseca para algumas classes de antibióticos. Nesse contexto, antibacterianos que se caracterizam por serem altamente hidrofílicos atingem seus alvos somente após atravessar a membrana externa, por canais iônicos, as porinas (Capítulo 2). Porém, há aspectos físico-químicos que impedem o influxo dos antibacterianos: as porinas, com um canal muito pequeno, são limitantes (Figura 10.3) para a passagem até mesmo do cloranfenicol. Essa resistência mediada pela impermeabilidade pode ser mais abrangente em espécies que carecem de porinas que permitem o transporte de determinados antibióticos. Mesmo para drogas lipofílicas, a permeabilização da membrana externa é difícil, uma vez que existem lipídios carregados negativamente, como o lipopolissacarídeo (LPS).

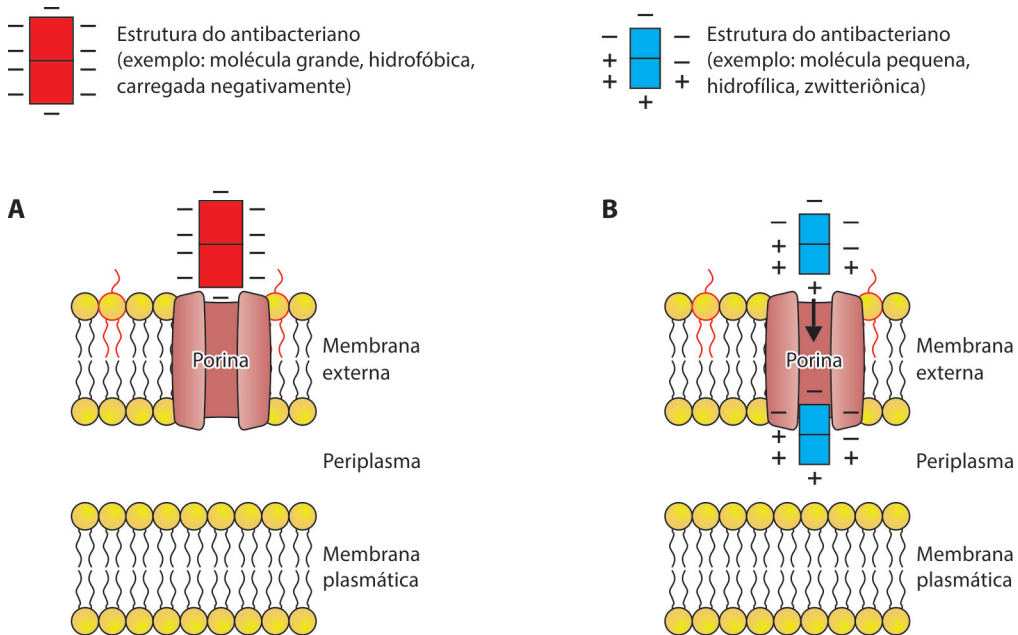


Figura 10.3 Fatores que influenciam o influxo de antibacterianos através da membrana externa de bactérias Gram-negativas. **A.** Antibióticos estruturalmente grandes, hidrofóbicos e/ou carregados negativamente não conseguem atravessar a membrana externa através das porinas. **B.** Antibióticos menores, hidrofílicos, eletricamente neutros mas com cargas opostas (zwitteriônicos) conseguem atravessar a membrana externa.

A resistência pode ser adquirida por transferência de material genético ou por mutação do gene que codifica a proteína alvo (resistências adquiridas). Muitas espécies podem apresentar resistência a múltiplos antibacterianos por um único mecanismo, por exemplo, a expressão de uma bomba de efluxo, ou pela presença de vários genes responsáveis por diferentes mecanismos de resistência integrados dentro de um contexto genético conhecido (integron, plasmídeo ou transposon).

De modo geral, a resistência adquirida pode ser agrupada em quatro mecanismos: bombas de efluxo, inativação enzimática, alteração do alvo e vias metabólicas alternativas (Figura 10.4).

10.3 Mecanismos de ação dos antibacterianos e resistência bacteriana

10.3.1 Antibacterianos que alteram a integridade da membrana

Apesar de a membrana bacteriana ser uma bicamada lipoproteica, sua composição é distinta das membranas de eucariotos, e as diferenças constituem alvos para a ação de antibióticos.

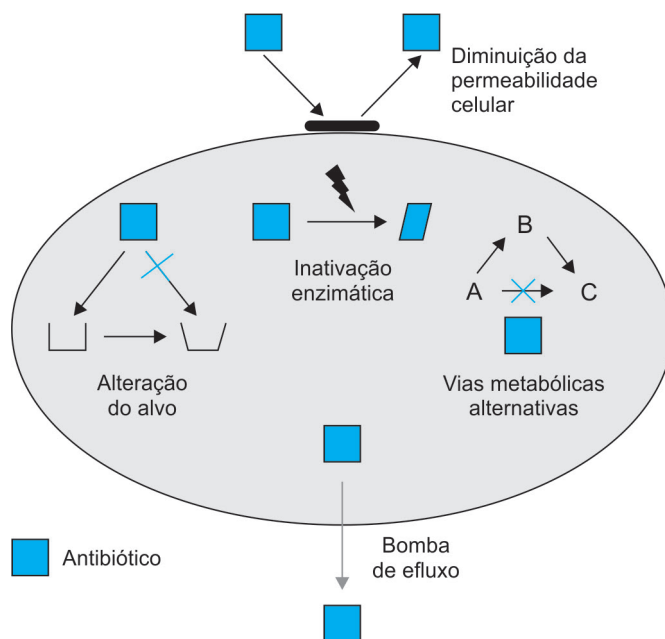


Figura 10.4 Mecanismos de resistência a antibióticos.

Exemplos de agentes que atuam sobre a membrana plasmática são antibióticos constituídos por polipeptídeos. Devido à sua composição química, o antibiótico atua como um detergente catiônico, pois a região polar liga-se ao exterior da membrana e a região apolar intercala-se nas cadeias hidrofóbicas dos ácidos graxos da membrana, provocando distúrbios na sua organização e a falência de sua permeabilidade seletiva. As membranas contendo fosfatidiletanolamina são particularmente sensíveis às polimixinas - daí a maior sensibilidade das bactérias Gram-negativas ao antibiótico, uma vez que as Gram-positivas em geral não apresentam aquele fosfolípido em suas membranas. As polimixinas, produzidas por várias cepas de *Bacillus polymyxa*, têm aplicação restrita em terapia, por também apresentarem afinidade por membranas de células de mamíferos, ainda que menor do que a que apresentam por membranas bacterianas.

Outros agentes que atuam na membrana plasmática são os **ionóforos**, antibióticos que facilitam o transporte de íons através da membrana plasmática. A **gramicidina A**, por exemplo, produzida por *Bacillus brevis*, é constituída por um peptídeo composto por 15 aminoácidos hidrofóbicos, D e L. Duas cadeias do antibiótico, com conformação em α -hélice, dispõem-se transversalmente à membrana, formando um canal por onde passam íons K^+ .

10.3.2 Antibióticos que inibem a síntese da parede

A penicilina tem seu mecanismo de ação direcionado à inibição da síntese da parede, seletivamente para bactérias Gram-positivas.

10.3.2.1 As penicilinas impedem a síntese do peptidoglicano

As penicilinas atuam nas enzimas do tipo PBP (*penicilin-binding protein*), responsáveis pela formação da ligação cruzada (transpeptidação) entre as cadeias peptídicas dos polímeros de peptidoglicano

(PG). As transpeptidases catalisam uma ponte peptídica entre aminoácidos de pentapeptídios paralelos que formam uma ligação entre as fitas do PG. Betalactâmicos apresentam estrutura semelhante à do dipeptídeo D-Ala-D-Ala (substrato natural das PBPs) e competem com o sítio ativo da enzima, inibindo irreversivelmente as PBPs. Com a perda da estabilidade do citoesqueleto de peptidoglicano, as bactérias ficam suscetíveis à lise pela pressão osmótica. Na **Figura 10.5** é apresentada a catálise da transpeptidação por PBPs e sua inibição por penicilina.

Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas possuem diferentes PBPs pelas quais os diversos beta-lactâmicos apresentam diferentes graus de afinidade.

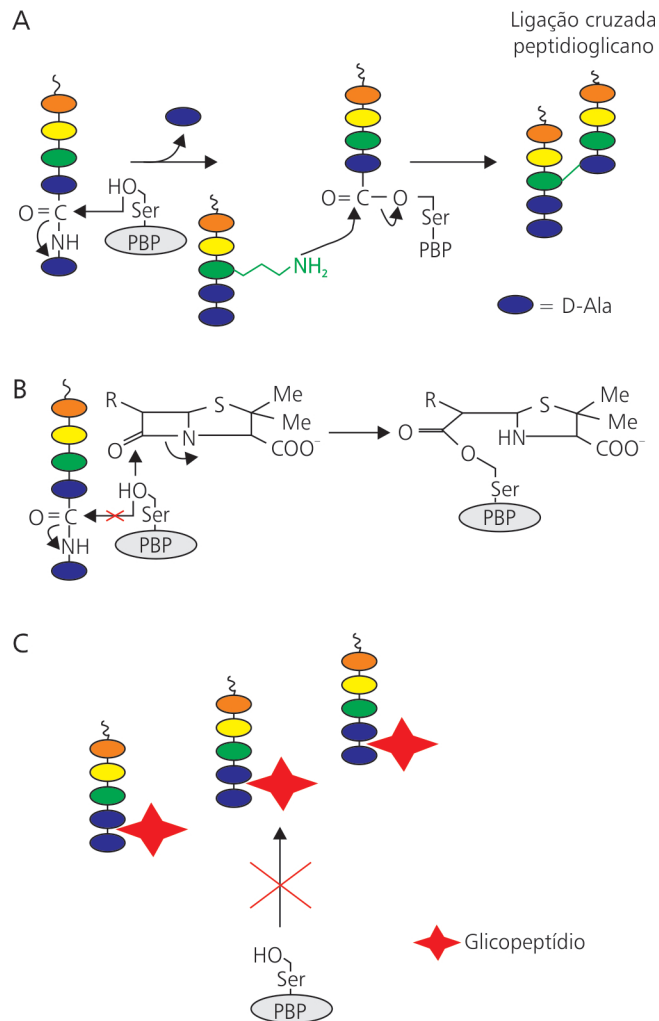
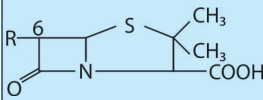
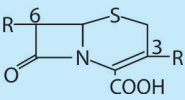


Figura 10.5 Catálise da transpeptidação por PBPs (*penicilin-binding proteins*) A., sua inibição por penicilinas B. e glicopeptídios C..

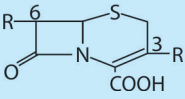
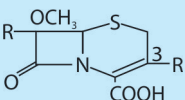
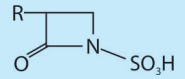
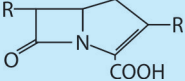
Conforme explicado anteriormente, os lipídios da membrana externa não permitem o transporte da penicilina, apesar de a transpeptidase estar presente, nos Gram-negativos. Modificações na estrutura básica da penicilina resultam em derivados betalactâmicos semissintéticos com espectro de atividade estendido (Tabela 10.2). A modificação química facilita a permeabilização por porinas, possibilitando a ligação a um maior número de PBPs, dependendo da espécie bacteriana. Modificações similares em cefalosporinas, cefamicinas e carbapenêmicos geram semissintéticos mais eficazes.

Tabela 10.2 Estrutura química das principais classes de betalactâmicos, espectro de atividade e principal mecanismo de resistência associado em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Estrutura química	Classe	Nome	Espectro de atividade	Principal mecanismo de resistência
	Penicilinas naturais	Penicilina	Gram-positivos: <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	β -lactamases
	Penicilinas semi-sintéticas	Meticilina Oxacilina Cloxacilina	Gram-positivos: <i>Staphylococcus</i>	Alvo PBP alterado (estáveis à hidrólise por β -lactamases)
		Ampicilina Amoxicilina	Gram-positivos e gram-negativos: <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	β -lactamases
		Piperacilina Carbenicilina Ticarilina	Gram-positivos e gram-negativos: <i>Pseudomonas</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> ,	β -lactamases
	Cefalosporinas 1ª geração	Cefazolina Cefalexina Cefalotina	Gram-positivos: <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> ,	β -lactamases
	2ª geração	Cefuroxima Cefaclor	Gram-positivos e gram-negativos: Enterobacteriaceae, <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	β -lactamases
	3ª geração	Cefotaxima Ceftriaxona Cefoperazona Cefpodoxima Ceftazidima Ceftiofur	Gram-positivos e gram-negativos: Enterobacteriaceae, <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	β -lactamases (ESBL)

Continua

Continuação

Estrutura química	Classe	Nome	Espetro de atividade	Principal mecanismo de resistência
	4ª geração	Cefepime Cefpiroma	Gram-positivos e gram-negativos: Enterobacteriaceae, <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	β -lactamases (AmpC)
	5ª geração	Ceftobiprole Ceftaroline	Gram-positivos e gram-negativos: <i>MRSA</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Pseudomonas</i>	β -lactamases
	Cefaminicas	Cefoxitin	Gram-positivos e gram-negativos: Enterobacteriaceae, <i>Neisseria</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Streptococcus</i>	β -lactamases (AmpC), deleção de porinas
	Monobactâmicos	Aztreonam	Gram-negativos: <i>Pseudomonas</i>	β -lactamases (ESBL)
	Carbapenens	Imipenem Meropenem Ertapenem Doripenem	Gram-positivos e gram-negativos: Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	β -lactamases (Carbapenemases tipo M β L, OXA, KPC), deleção de porinas, efluxo

10.3.2.2 Mecanismos de resistência aos betalactâmicos

Logo após a introdução da penicilina, foram identificados os primeiros mecanismos de resistência em bactérias como *Staphylococcus*, anteriormente sensíveis. A produção de uma enzima, a betalactamase ou penicilinase, capaz de hidrolisar a penicilina, tornou ineficaz sua ação em microrganismos resistentes. Apesar de a indústria farmacêutica ter produzido uma penicilina semissintética cuja estrutura dificultava a ação das betalactamases, após dois anos apareceram cepas de *S. aureus* resistentes a essa penicilina, identificados como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ou à oxacilina (ORSA). A resistência à meticilina (ou à oxacilina) em *Staphylococcus* spp. é determinada pela produção de uma PBP alterada, denominada PBP2a ou PBP2', codificada pelo gene *mecA*. A PBP2a é produzida em conjunto com as PBPs normalmente produzidas por *Staphylococcus* spp., que reconhece os resíduos de peptidoglicano, mas não se liga aos antibióticos betalactâmicos com uma afinidade tão alta como as PBPs normais. Na era pós-antibiótica, cepas MRSA/ORSA foram isoladas em todo o mundo, sendo associadas a infecção hospitalar, e nos últimos anos disseminaram-se para a comunidade. Como as cepas MRSA apresentam resistência a todos os betalactâmicos, a indústria farmacêutica desenvolveu as cefalosporinas de quinta geração, o primeiro betalactâmico com atividade *in vitro* e *in vivo* contra MRSA.

As betalactamases são amplamente disseminadas em bacilos Gram-negativos, com localização periplasmática. Os Gram-positivos liberam-nas no ambiente extracelular, porém sua produção não caracteriza o principal mecanismo de resistência aos betalactâmicos.

É interessante destacar que genes cromossomais que codificam betalactamases em bactérias Gram-negativas foram identificados em plasmídios adquiridos por bactérias de outras espécies, evidenciando a grande capacidade de disseminação desse mecanismo de resistência.

A deleção de porinas e a superexpressão de bombas de efluxo também podem funcionar como mecanismo de resistência aos betalactâmicos (Figura 10.6). A superexpressão de bombas de efluxo tem

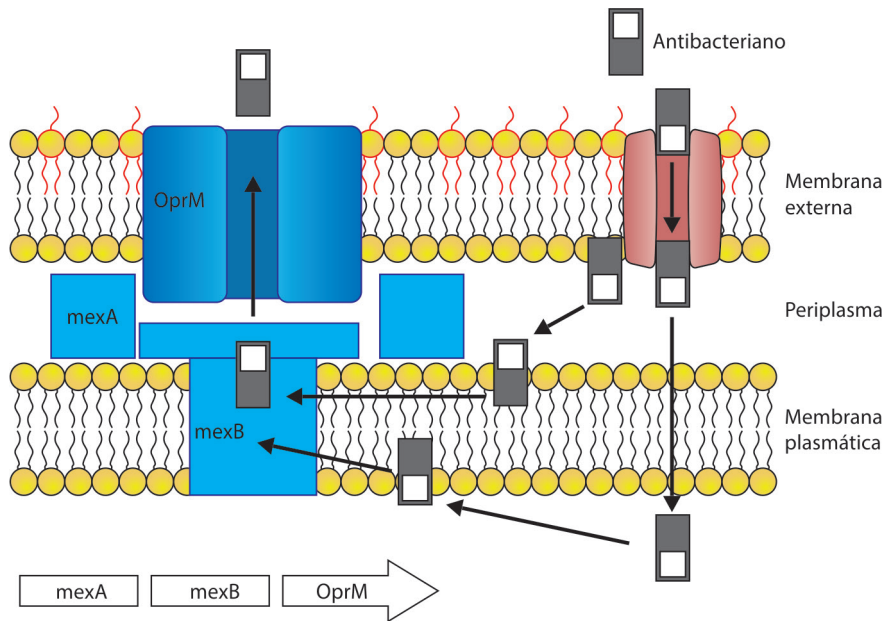


Figura 10.6 Porinas podem permitir a entrada de antibióticos, enquanto bombas de efluxo os lançam para fora, impedindo sua ação. A bomba de efluxo confere resistência a um grande número de antibióticos simultaneamente.

maior seletividade a drogas hidrofóbicas, levando à resistência cruzada (p.ex., resistência múltipla a vários antibióticos, uma característica que contribui para o fenótipo multirresistente).

10.3.2.3 Mecanismos de ação dos glicopeptídeos

Assim como os betalactâmicos, os glicopeptídeos (vancomicina) atuam na síntese do peptidoglicano. Seu espectro é restrito para Gram-positivos, uma vez que são incapazes de permear a membrana externa dos Gram-negativos.

Os glicopeptídeos se ligam ao resíduo dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala das cadeias laterais peptídicas do peptidoglicano (PG), impedindo que a respectiva transpeptidase (PBP) realize a reação de transpeptidação, inibindo assim a síntese da parede (Figura 10.6C).

10.3.2.4 Mecanismos de resistência aos glicopeptídios

A resistência ocorre pela expressão de enzimas que modificam as estruturas dos resíduos peptídicos das cadeias laterais do PG. Em vez de sintetizar o dipeptídeo D-Ala-D-Ala, é sintetizado o dipeptídeo D-Ala-D-lactato, o qual tem uma menor afinidade pelo antibiótico glicopeptídico.

10.3.3 Antibióticos que inibem a síntese proteica

Conforme abordado no Capítulo 2, os ribossomos dos procaríotos são 70S, portanto diferentes daqueles de eucariotos, sendo alvo de antibióticos.

Os antibacterianos que inibem a síntese de proteínas podem se ligar seletivamente às diferentes subunidades do ribossomo bacteriano. A **Figura 10.7** mostra onde agem alguns antibióticos inibidores da síntese proteica.

O **cloranfenicol** liga-se à porção 50S do ribossomo e forma uma barreira, inibindo a formação das ligações peptídicas durante o alongamento da cadeia polipeptídica. Produzida por bactérias do gênero *Streptomyces*, a ligação do cloranfenicol ao ribossomo é reversível e apresenta ação bacteriostática devida à inibição da atividade da peptidiltransferase (que transfere o peptídeo ligado a um tRNA, ligando o ao aminoácido ligado no outro tRNA).

Como a ligação do antibiótico ao ribossomo é reversível, as bactérias inibidas por esse agente rapidamente recuperam a capacidade de síntese proteica quando a concentração do antibiótico cai abaixo do nível no qual é efetivo.

A resistência ao cloranfenicol pode ser mediada por:

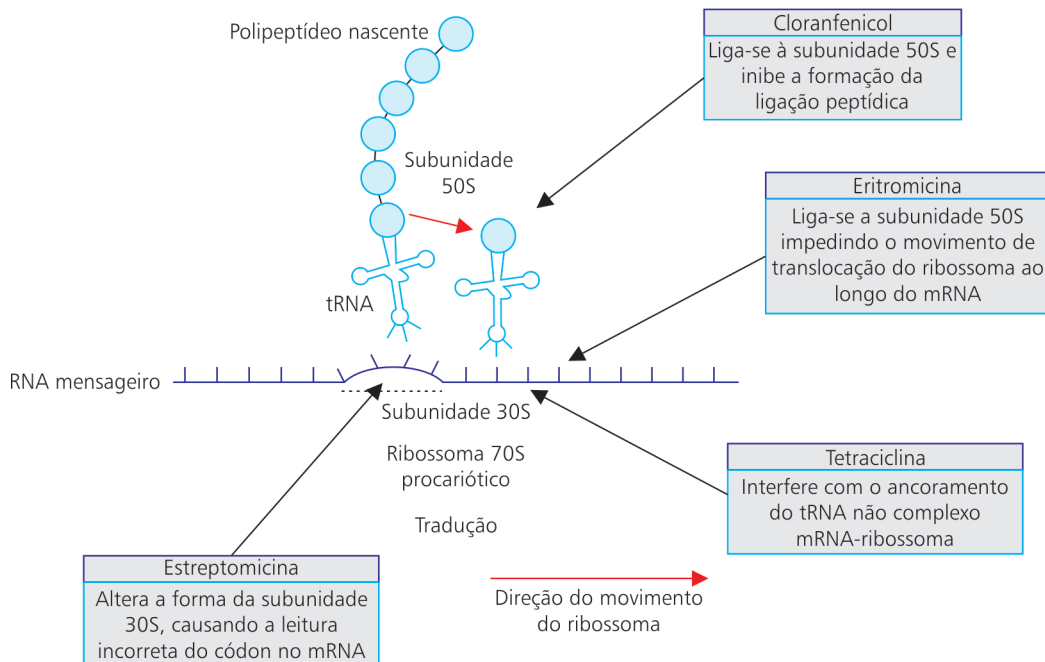


Figura 10.7 Antibióticos que atuam na síntese proteica.

- a. redução da permeabilidade;
- b. mutação na subunidade 50S do ribossomo;
- c. produção de uma acetiltransferase que liga covalentemente um ou dois grupos acetil à molécula de cloranfenicol, inibindo sua ligação ao ribossomo; ou
- d. expressão de bombas de efluxo.

A **estreptomicina** é produzida por *Streptomyces griseus*, apresentando ação bactericida. Liga-se a uma proteína componente da subunidade 30 S, de ribossomos procarióticos. A ligação da estreptomicina a ribossomos provoca erros de leitura do código genético, levando à síntese de proteínas anômalas. Outros antibióticos da mesma classe que a estreptomicina, os **aminoglicosídeos**, canamicina, neomicina e gentamicina, têm mecanismos de ação semelhantes, mas ligam-se a sítios ribossomais diferentes.

Mutações que afetam proteína à qual se liga a estreptomicina podem conferir resistência ao antibiótico e até dependência de sua presença.

A resistência bacteriana a antibióticos aminoglicosídeos manifesta-se por:

- a. redução do influxo do antibiótico que parece estar associada a impermeabilidade da membrana da célula bacteriana;
- b. alteração do alvo ribossômico (p.ex., metilação da porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S);
- c. produção de enzimas modificadoras da estrutura dos aminoglicosídeos.

A produção de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos é tida como o principal mecanismo de resistência bacteriana a esses antibióticos.

A **eritromicina** é um **macrolídeo** produzido por *Streptomyces erythreus* e liga-se à subunidade ribossomal 30S dos microrganismos sensíveis, inibindo o movimento do ribossomo ao longo do mRNA, o que impede a síntese proteica.

A resistência aos **macrolídeos** pode ocorrer por três mecanismos diferentes:

- a. mudança conformacional no sítio alvo de ligação ao ribossomo;
- b. resistência mediada por bombas de efluxo;
- c. inativação da droga mediada por enzimas que hidrolisam o anel de lactona do núcleo macrocíclico e fosfotransferases que inativam macrolídeos.

As **tetraciclina**s são antibióticos poliketídicos (4 anéis benzênicos) de amplo espectro. Com ação bacteriostática, as tetraciclina inibem a subunidade 30S do ribossomo, impedindo a ligação dos aminoacil-tRNA, uma vez que existe inibição estérica da ligação códon-anticódon entre o tRNA e o mRNA no ribossomo. Assim, são inibidas tanto a adição de novos aminoácidos da cadeia proteica como a liberação da proteína.

A resistência às tetraciclina é mediada pela:

- a. modificação ribossomal;
- b. expressão de bombas de efluxo.

A linezolida é um bacteriostático sintético, com espectro restrito contra bactérias Gram-positivas, cujo mecanismo de ação reside na inibição do rRNA 23S da porção 50S do ribossomo bacteriano, o que impede sua ligação com a subunidade 30S, para a funcionalidade do ribossomo. Uma vez que a translocação não pode ser iniciada, a síntese de proteínas é inibida.

A resistência à linezolida está associada a:

- a. mutações que afetam o gene rRNA 23S;

- b. mutações em genes que codificam proteínas ribossomais;
- c. presença de gene que codifica uma enzima que modifica o resíduo rRNA 23S.

10.3.4 Antibióticos que inibem a síntese de ácidos nucleicos

10.3.4.1 Mecanismos de ação das rifamicinas

As rifamicinas são um grupo de antibióticos produzidos por *Amycolatopsis rifamycinica* (previamente classificado como *Streptomyces mediterranei* e *Amycolatopsis mediterranei*). A rifampicina (derivado semissintético da rifamicina B) se liga à subunidade β da RNA polimerase, inibindo a transcrição. Especificamente, há um impedimento da etapa inicial da formação da cadeia de RNA, inibindo, portanto, a síntese de mRNA, resultando em um efeito bactericida. Embora tenha um amplo espectro de atividade (principalmente contra Gram-positivos), o uso de rifampicina tem sido direcionado para o tratamento de infecções produzidas por *Mycobacterium tuberculosis*.

10.3.4.2 Mecanismos de resistência das rifamicinas.

A resistência à rifampicina é causada por modificações na subunidade beta da RNA polimerase.

10.3.4.3 Mecanismos de ação de quinolonas e fluoroquinolonas

O primeiro antibiótico sintético do grupo das quinolonas/fluoroquinolonas foi o ácido nalidíxico, utilizado principalmente para o controle de bactérias Gram-negativas. Como o espectro de ação do ácido nalidíxico é restrito, mais tarde, a inclusão de um átomo de flúor levou às fluoroquinolonas, estendendo seu espectro de atividade para bactérias Gram-positivas e micobactérias.

As quinolonas/fluoroquinolonas ligam-se à DNA girase e topoisomerase IV (essenciais para a manutenção e replicação do DNA), inibindo a atividade dessas enzimas, e tem um efeito bactericida.

10.3.4.4 Mecanismos de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas

Mutações nos genes codificadores das enzimas alvo possibilitam o surgimento da resistência. Além desse mecanismo, houve recentemente o reconhecimento da participação do efluxo ativo, com decorrente queda do acúmulo da quinolona. Adicionalmente, há proteínas que conferem proteção à DNA girase contra o ciprofloxacino e transferases que podem modificar o antibiótico, inativando-o.

10.3.4.5 Sulfonamidas e trimetoprima: mecanismos de ação

As sulfonamidas, ou sulfas, são agentes bacteriostáticos que inibem competitivamente a enzima di-hidropteroato sintetase (DHPS), presente apenas nas bactérias que sintetizam o tetra-hidrofolato. As sulfas atuam como antimetabólitos do ácido para-aminobenzoico, substrato natural da DHPS, impedindo assim a síntese do di-hidropteroato. De forma similar, a trimetoprima inibe a enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), impedindo a redução do ácido di-hidrofólico a ácido tetra-hidrofólico. Ambas as enzimas atuam na via de síntese do ácido fólico, importante cofator necessário para a biossíntese das bases pirimídicas que constituem o DNA. As sulfas e a trimetoprima são utilizadas sinergicamente (cotrimoxazol) no bloqueio do metabolismo de folato (Figura 10.8). Os animais não

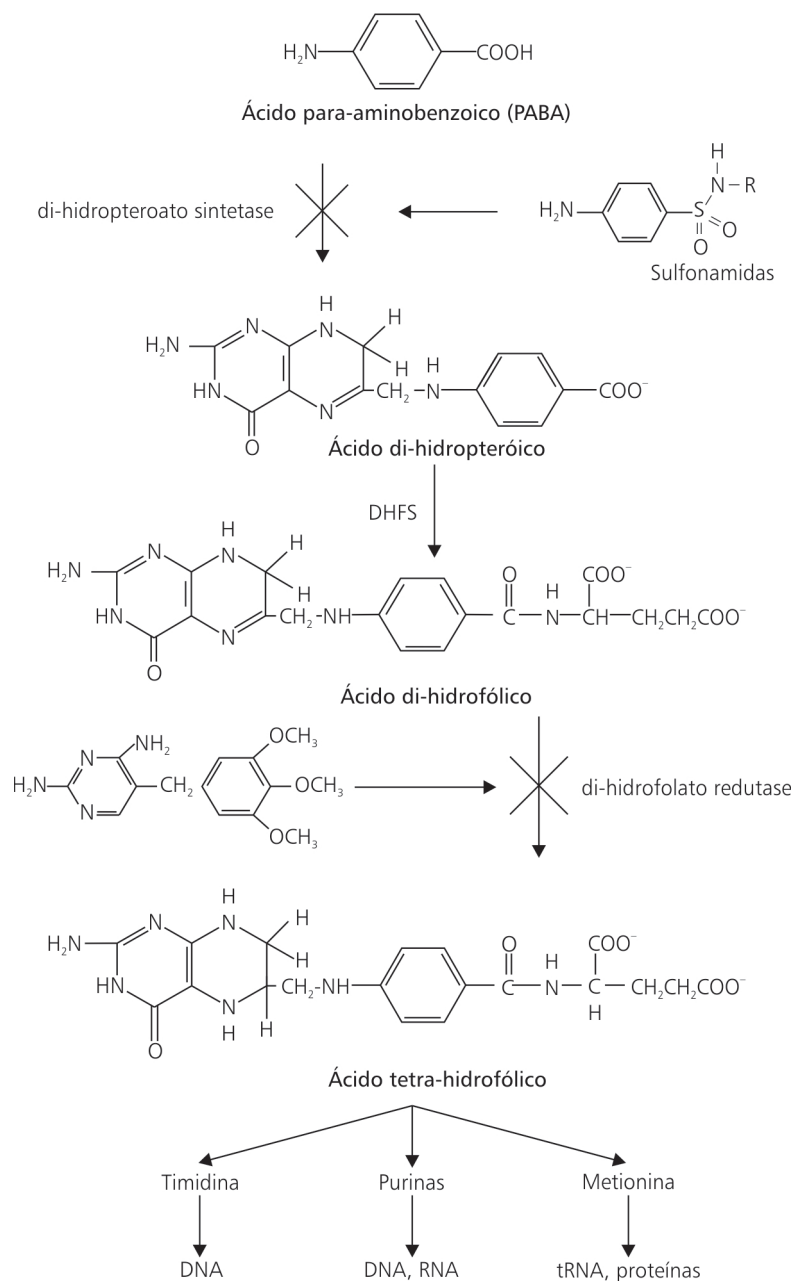


Figura 10.8 Biossíntese de tetra-hidrofolato em bactérias e antibacterianos que bloqueiam algumas etapas do seu metabolismo. As sulfas e a trimetoprima inibem competitivamente as enzimas di-hidropteroato sintetase (DHPS) e di-hidrofolato redutase (DHFR), respectivamente, impedindo a biossíntese de bases pirimídicas que constituem o DNA.

sintetizam folato, adquirindo esse composto da dieta na forma de vitamina, motivo pelo qual não são afetados por esses quimioterápicos.

10.3.4.6 Mecanismos de resistência às sulfonamidas e à trimetoprima

A resistência às sulfonamidas e à trimetoprima é mediada pela produção de enzimas mutadas.

10.4 Sinergismo/Antagonismo

Por vezes o sucesso da antibioticoterapia depende do uso combinado de dois antibióticos. Nesse caso, vale-se do sinergismo, ou seja, uma interação positiva, na qual o efeito combinado dos antibióticos é significativamente maior que seus efeitos independentes. Utilizando-se penicilina e estreptomicina combinadas para o tratamento da endocardite bacteriana causada por *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva), o dano causado nas paredes bacterianas pela penicilina torna mais fácil a penetração da estreptomicina.

Por outro lado, devem ser tomados cuidados para se evitarem efeitos antagônicos de antibióticos, como no uso de penicilina e tetraciclina. A atividade bacteriostática da tetraciclina impede a ação da penicilina, que necessita do crescimento bacteriano para sua ação.

10.5 Testes para avaliar a atividade de antibióticos

10.5.1 Antibiograma

O antibiograma é uma técnica utilizada para a determinação do perfil de sensibilidade ou resistência bacteriana *in vitro* perante diferentes agentes antimicrobianos. O teste tem o objetivo de prever o que acontecerá *in vivo*, auxiliando o corpo clínico na instauração terapêutica mais adequada ao tratamento de infecções causadas pelo microrganismo a ser testado.

Os resultados do antibiograma são disponibilizados de acordo com a técnica utilizada: qualitativa ou de difusão (sensível, intermediário ou resistente, no caso de discodifusão em ágar) e quantitativa ou de diluição (expressa pela concentração inibitória mínima, ou CIM, em µg/mL).

10.5.1.1 Teste qualitativo ou teste de difusão

O teste de disco difusão em ágar, ou teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), foi descrito em 1966, por Kirby-Bauer, e continua sendo utilizado, graças à simplicidade de execução, ao baixo custo e à confiabilidade dos resultados. O princípio básico do teste consiste na leitura e interpretação dos halos de inibição de crescimento bacteriano, proporcionadas pela difusão do antimicrobiano na superfície do ágar. O teste é realizado, inicialmente, semeando-se o inóculo da bactéria causadora da infecção, padronizado, em uma placa de ágar Müller-Hinton (meio específico para a realização de antibiogramas). Discos de papel-filtro, impregnados com antimicrobianos em concentrações fixas, disponíveis comercialmente, são colocados sobre as placas, que são incubadas adequadamente, e os resultados então são analisados. Os diâmetros das zonas de inibição do crescimento ao redor de cada antibiótico são medidos e expressos em mm, e os resultados da suscetibilidade aos antibióticos são disponibilizados como: S (Sensível), I (Intermediário) e R (Resistente). O diâmetro da zona de inibição está diretamente

relacionado com a difusão do antibiótico no meio. Por esse motivo, os resultados são interpretados comparando-se o diâmetro da zona de inibição com padrões determinados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa. Para evitar interferências que possam dificultar a leitura e interpretação dos halos após a incubação, deve-se dispor os discos na placa, respeitando a distância entre eles (Figura 10.9A).

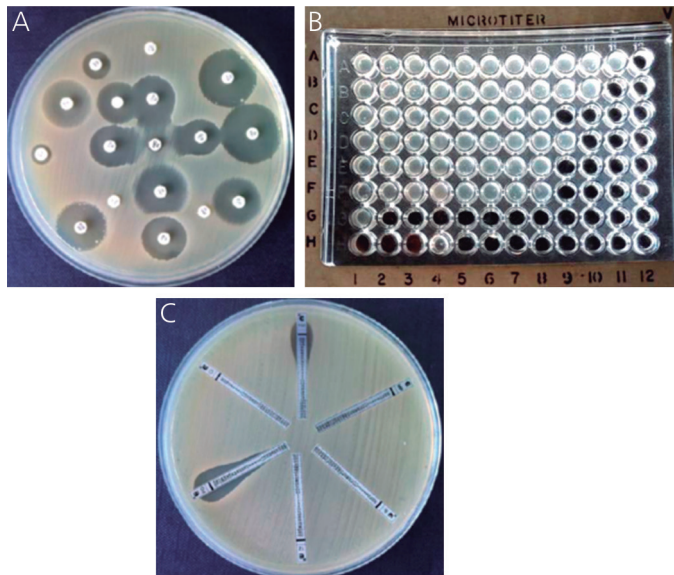


Figura 10.9 Antibiograma qualitativo e quantitativo. **A.** Antibiograma (Kirby-Bauer) para um isolado de *Escherichia coli*: percebem-se a zona de inibição de crescimento ao redor dos discos, um indicativo de sensibilidade aos antibióticos, e a ausência de inibição do crescimento bacteriano próximo aos discos, um indicativo de resistência bacteriana ao antibiótico. **B.** Método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) diante de sete antibióticos diferentes (poços de A a H) em concentrações crescentes (poços de 1 a 12). **C.** Método episilométrico (Etest®) realizado para determinação da CIM de seis diferentes antibióticos.

10.5.1.2 Testes quantitativos ou testes de diluição

São testes baseados na diluição seriada de antibióticos em caldo ou em ágar e os resultados determinam a concentração inibitória mínima, ou CIM, que consiste no valor, em $\mu\text{g/mL}$, da menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento bacteriano. Quando em caldo, os resultados são determinados através da análise de crescimento bacteriano macroscopicamente visível evidenciado pela turbidez (Figura 10.8B).

No teste de diluição em ágar, o antibiótico é incorporado em várias placas do meio Müller-Hinton, de maneira que cada placa irá conter uma concentração diferente do antibiótico. O inóculo bacteriano padronizado é depositado sobre a superfície do ágar. A interpretação dos resultados é realizada da mesma maneira que nos testes de diluição em caldo, confirmados através da análise de crescimento bacteriano macroscopicamente visível, e a menor concentração de antibiótico que inibe o crescimento bacteriano representa a CIM. As vantagens desse método são várias: baixo custo e relativa facilidade de execução da técnica, poder testar diferentes isolados de uma única vez, a obtenção da CIM do antibiótico

e a possibilidade de testar organismos fastidiosos e anaeróbios, que exibem dificuldade de crescimento em meios líquidos.

10.5.1.3 Método de gradiente antimicrobiano

O gradiente antimicrobiano, ou método epsilométrico, é usado para determinação da CIM. Esse teste utiliza fitas plásticas contendo concentrações crescentes de um antibacteriano, impressas em uma face da fita, para guiar a leitura do resultado (Figura 10.9C). O preparo do teste de gradiente antimicrobiano é realizado da mesma maneira que o teste de difusão em ágar (Kirby-Bauer). Após a semeadura, com o auxílio de um *swab*, sobre uma placa de ágar Müller-Hinton, as fitas Etest® são dispostas sobre a placa, de maneira que a face da fita que contém o gradiente de antibiótico fique voltada para o ágar e as placas são incubadas para posterior determinação dos resultados. A concentração inibitória mínima será correspondente à concentração na qual a zona de inibição elíptica atravessa a fita de teste. A principal vantagem é a facilidade da metodologia, uma vez que diversas fitas contendo diferentes antibióticos podem ser dispostas em uma placa de meio de cultura Müller-Hinton. Entretanto, o alto custo das fitas torna a metodologia limitante.

10.5.2 Atividade bactericida do soro

A determinação da atividade bactericida ou poder bactericida do soro é realizada para monitorar a terapia antibiótica em pacientes submetidos a diálise ou que apresentam osteomielite, endocardite, meningite e/ou septicemia.

Esse teste tem por finalidade avaliar a efetividade do fármaco através da determinação da atividade bacteriostática ou bactericida do soro do paciente sob antibioticoterapia, contra o seu próprio isolado bacteriano. Além de ser útil no acompanhamento terapêutico, permite a mudança da via de administração do antibiótico quando os resultados não estão em títulos satisfatórios.



Exercícios e Problemas

1. Um indivíduo acometido de uma infecção nas vias respiratórias automedicou-se com cloranfenicol durante dois dias. Após esse período os sintomas persistiram. Foram-lhe, então, recomendadas a coleta do material e a realização de um exame laboratorial, que indicou o uso de ampicilina. Com esse antibiótico o paciente curou-se.
 - a) Justificar a ineficácia do cloranfenicol no tratamento.
 - b) Qual o exame laboratorial adequado para a indicação da ampicilina?
 - c) Como é interpretado esse exame, e qual deve ter sido a diferença nos resultados obtidos para a ampicilina e para o cloranfenicol?

2. Animais que apresentavam sintomas de infecções respiratórias foram usados para o estudo da ação da penicilina. Após a coleta das secreções, os animais foram adequadamente tratados com o antibiótico. Os resultados do tratamento permitiram dividi-los em dois grupos:
 - I - animais que se curaram da infecção.
 - II - animais que não se curaram.

Exames químicos feitos com a urina dos animais demonstraram que no grupo I a molécula de penicilina foi excretada intacta; no grupo II, um subgrupo (IIA) excretou a penicilina com o anel betalactâmico rompido, e outro (IIB) excretou o anel intacto. Testes apropriados mostraram que a infecção do subgrupo IIA era causada por bactérias e que a infecção do subgrupo IIB era provocada por vírus.

 - a) Citar os alvos atingidos pela penicilina nas bactérias que infectavam os animais do grupo I. Por que ocorreu morte celular após esses alvos serem atingidos?
 - b) Por que os animais do grupo IIA eliminaram penicilina com o anel betalactâmico rompido?
 - c) A ineficácia da penicilina nos subgrupos IIA e IIB tem a mesma causa? Por que?
 - d) Que exame laboratorial poderia ter sido realizado antes da antibioticoterapia para orientar o tratamento?

