

João Ricardo da Silva Cruz

## **Novos antibióticos antiparietais**

Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017



João Ricardo da Silva Cruz

## **Novos antibióticos antiparietais**

Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017

João Ricardo da Silva Cruz

## **Novos antibióticos antiparietais**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **Resumo**

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pertencentes ao grupo dos antibióticos antiparietais são, simultaneamente, a família mais numerosa de antibacterianos e a mais utilizada na prática clínica, actuando por inibição da última etapa da síntese da parede celular bacteriana, nomeadamente na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano. Após a descoberta da penicilina, em 1928, verificou-se um desenvolvimento exponencial de novos compostos capazes de combater as doenças infecciosas que se revelavam, não raras vezes, fatais. Contudo, este desenvolvimento foi acompanhado pelo surgimento, a um ritmo ainda mais acelerado, de novos mecanismos de resistência por parte das bactérias que representam, actualmente, um elevado foco de apreensão temendo-se, a curto prazo, um cenário de inexistência de moléculas eficazes no combate a infecções, mesmo aquelas consideradas relativamente corriqueiras e triviais.

Ao longo desta monografia pretende-se apurar o actual panorama do armamento terapêutico no que diz respeito à sua eficácia, ao flagelo das resistências e às potenciais soluções alternativas com novos compostos que se revelam promissores.

Palavras-chave: antibióticos, antiparietais,  $\beta$ -lactâmicos, resistência,  $\beta$ -lactamases, peptidoglicano.

## **Abstract**

$\beta$ -lactam antibiotics, which belong to the group of antiparietal antibiotics are, simultaneously, the largest family of antibacterial agents and the most widely used in clinical practice, acting by inhibition of the last step of bacterial cell wall synthesis, particularly in the parietal phase of peptidoglycan biosynthesis. After the discovery of penicillin, in 1928, there was an exponential development of new compounds capable of fighting infectious diseases that were usually fatal. However, this development was followed by the emergence, at an even faster pace, of new resistance mechanisms by bacteria, representing a high level of apprehension and, in the short term, fears of a lack of effective molecules in the fight against infections, even those considered relatively commonplace and trivial.

Throughout this monograph it is intended to investigate the current panorama of therapeutic armaments with regard to their effectiveness, the scourge of resistances and the potential alternative solutions with new compounds that are proving promising.

**Keywords:** antibiotics, antiparietal,  $\beta$ -lactams, resistance,  $\beta$ -lactamases, peptidoglycan.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de endereçar os meus sinceros agradecimentos ao Prof. Doutor João Carlos Sousa pela sugestão do tema para a elaboração da monografia, pela disponibilidade para esclarecer quaisquer dúvidas que fossem surgindo e por toda a compreensão, atenção e simpatia que sempre me emprestou nos últimos meses.

Um enorme obrigado aos meus pais pelo companheirismo, amizade e por todos os ensinamentos transmitidos, para além do imenso suporte *sine qua non* cedido durante o meu percurso académico.

Expresso também um profundo agradecimento à Cláudia pelo estímulo, motivação, carinho e apoio incondicional com que sempre me presenteou, e aos meus amigos e família, pela sua presença e proximidade irrefutáveis.

## Índice

<b>I.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>A célula bacteriana .....</b>	<b>5</b>
1.	Composição e estrutura da parede celular .....	5
2.	Diferentes tipos de parede celular .....	7
i.	Gram positivo .....	7
ii.	Gram negativo.....	10
iii.	Bacilos álcool-ácido-resistentes.....	15
<b>III.</b>	<b>Mecanismo de acção dos antibióticos <math>\beta</math>-lactâmicos .....</b>	<b>17</b>
1.	Proteínas de ligação à penicilina .....	19
<b>IV.</b>	<b>Evolução dos antibióticos <math>\beta</math>-lactâmicos .....</b>	<b>21</b>
1.	Penicilinas.....	22
i.	Penicilinas naturais .....	22
ii.	Penicilinas semi-sintéticas .....	23
2.	Cefalosporinas .....	28
i.	Cefalosporinas de 1ª geração .....	30
ii.	Cefalosporinas de 2ª geração .....	31
iii.	Cefalosporinas de 3ª geração .....	32
iv.	Cefalosporinas de 4ª geração .....	33
v.	Cefalosporinas de 5ª geração .....	34
vi.	Cefalosporinas em estudo .....	35
3.	Monobactâmicos.....	37
4.	Carbapenemos .....	38
5.	Inibidores de $\beta$ -lactamases com estrutura $\beta$ -lactâmica.....	41
6.	Inibidores de $\beta$ -lactamases sem estrutura $\beta$ -lactâmica .....	44
i.	Avibactam.....	44
ii.	Relebactam.....	46
iii.	Vaborbactam.....	47
7.	Outros inibidores de $\beta$ -lactamases.....	48
<b>V.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>49</b>
<b>VI.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>52</b>

## Índice de figuras

- Figura 1:** Cultura original que culminou na descoberta da penicilina. Na parte superior da figura é possível observar o crescimento do fungo *Penicillium notatum*, junto do qual o crescimento de *Staphylococcus aureus* foi suprimido, enquanto na parte inferior são observadas colónias estafilocócicas normais.....1
- Figura 2:** Proliferação da resistência a antibióticos.....3
- Figura 3:** Célula eucariota (esquerda) e célula procariota (direita).....5
- Figura 4:** Macromolécula de peptidoglicano. NAG: N-acetilglicosamina; NAM: ácido N-acetilmurâmico; L-Ala: L-alanina; D-Glu: D-glutâmico; L-Lys: L-lisina; D-Ala: D-alanina.....6
- Figura 5:** Procedimento da técnica de coloração de Gram.....7
- Figura 6:** Parede celular de bactéria de Gram positivo. É visível a espessa camada da parede celular (PC), maioritariamente constituída por peptidoglicano, e a membrana celular (MC) (microscopia electrónica).....8
- Figura 7:** Ilustração da parede celular de bactéria de Gram positivo. PBP: Proteína de ligação à penicilina.....9
- Figura 8:** Divisão celular de bactéria de Gram positivo, à esquerda (microscopia electrónica). Esquemática da divisão celular com a parede celular em crescimento, constituída por fragmentos da parede original (a verde) alternados com fragmentos entretanto sintetizados (a preto), do lado direito.....10
- Figura 9:** Parede celular de bactéria de Gram negativo. Além da membrana externa (OM) justaposta a uma fina camada de peptidoglicano (PG) é ainda possível observar, no espaço

entre este e a membrana celular (MC), o periplasma, com dimensões consideráveis (microscopia electrónica).....11

**Figura 10:** Formação e libertação de OMVs a partir da membrana externa de bactérias de Gram negativo (microscopia electrónica).....12

**Figura 11:** Ilustração da parede celular de bactéria de Gram negativo. LPS: Lipopolissacarídeo; OMP: Canal de porina; PBP: Proteína de ligação à penicilina; OM: Membrana externa; MC: Membrana celular.....14

**Figura 12:** Divisão celular de bactéria de Gram negativo (microscopia electrónica).....14

**Figura 13:** Parede celular de b.a.a.r.. MC: Membrana celular; PG: Peptidoglicano; AG: Arabinogalactano; AM: Ácidos micólicos (microscopia electrónica).....15

**Figura 14:** Ilustração da parede celular de bacilos álcool-ácido-resistentes. OMP: Canal de porina.....16

**Figura 15:** Interação entre o antibiótico  $\beta$ -lactâmico e a transpeptidase, originado um complexo estável e inactivo.....17

**Figura 16:** A analogia entre os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilina) e a D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala).....18

**Figura 17:** Lise de bactéria de Gram positivo induzida pela penicilina G (microscopia electrónica).....20

**Figura 18:** Estrutura química do anel  $\beta$ -lactâmico, centro farmacológico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.....21

**Figura 19:** Estrutura química da penicilina G.....22

<b>Figura 20:</b> Modo de acção de uma serina- $\beta$ -lactamase. É possível observar a hidrólise da ligação amida do anel $\beta$ -lactâmico, induzindo a inactivação do antibiótico (originando o peniciloato inactivo).....	23
<b>Figura 21:</b> Estrutura química do 6-APA. Obtido por ruptura da molécula da penicilina G na posição 6-amino, através de amidases.....	23
<b>Figura 22:</b> Estrutura química das isoxazolilpenicilinas.....	24
<b>Figura 23:</b> Estrutura química da molécula aniónica da penicilina G (A) e das aminopenicilinas, ampicilina (B) e amoxicilina (C). A carga eléctrica neutra apresentada por B e C facilita a difusão através das OMPs.....	26
<b>Figura 24:</b> Estrutura química do 7-ACA. Obtido através da cefalosporina C, por acção de amidases.....	29
<b>Figura 25:</b> Estrutura química básica das cefalosporinas (em destaque os dois radicais R e o núcleo cephem).....	29
<b>Figura 26:</b> Exemplos de cefalosporinas de 1 <sup>a</sup> geração.....	31
<b>Figura 27:</b> Protecção do anel $\beta$ -lactâmico da acção das $\beta$ -lactamases por impedimento estérico numa cefalosporina de 2 <sup>a</sup> geração (cefuroxima).....	32
<b>Figura 28:</b> Exemplos de cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> geração.....	33
<b>Figura 29:</b> Exemplos de cefalosporinas de 4 <sup>a</sup> geração.....	34
<b>Figura 30:</b> Estrutura química da ceftarolina e do pró-fármaco ceftobiprole medocaril (porção do pró-fármaco em destaque).....	35

<b>Figura 31:</b> Relação estrutura-actividade do ceflozane, uma nova cefalosporina em estudo.....	36
<b>Figura 32:</b> Estrutura química do aztreonamo, o único monobactamo utilizado na terapêutica, e do BAL30072.....	37
<b>Figura 33:</b> Exemplos de carbapenemos actualmente utilizados na terapêutica.....	38
<b>Figura 34:</b> Estrutura química de alguns dos carbapenemos em estudo, nomeadamente o biapenemo e, com estrutura tricíclica, o LK-157.....	41
<b>Figura 35:</b> Inibidores de $\beta$ -lactamases com estrutura $\beta$ -lactâmica actualmente comercializados: A) Ácido clavulânico; B) Tazobactam; C) Sulbactam.....	42
<b>Figura 36:</b> Estrutura química da sultamicilina.....	43
<b>Figura 37:</b> Estrutura química do avibactam.....	45
<b>Figura 38:</b> A) Acetilação de $\beta$ -lactamase de classe A pelo mecanismo geral de inibição de um inibidor de $\beta$ -lactamases (neste caso, o ácido clavulânico); B) Mecanismo hipotético de acetilação e regeneração do avibactam numa $\beta$ -lactamase de classe A.....	46
<b>Figura 39:</b> Estrutura química do relebactam.....	47
<b>Figura 40:</b> Estrutura química do vaborbactam.....	47
<b>Figura 41:</b> Exemplos de outras moléculas inibidoras de $\beta$ -lactamases, neste caso sem estrutura $\beta$ -lactâmica .....	48
<b>Figura 42:</b> Previsão de mortalidade anual atribuível à resistência a antibióticos em 2050, caso a actual política de uso não seja alterada. Cerca de 10 milhões de doentes morrerão, anualmente, com infecções MDR.....	49

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1:</b> $\beta$ -lactamases segundo a classificação de Ambler.....	27
---	----

## **Acrónimos e siglas**

**MRSA:** “*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”

**MDR:** “*Multidrug resistance*”

**ESBLs:** “*Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*”

**NAG:** N-acetilglicosamina

**NAM:** N-acetilmurâmico

**TG:** Transglicolase

**CP:** Carboxipeptidase

**TP:** Transpeptidase

**LPS:** Lipopolissacarídeos

**OM:** “*Outer membrane*”

**OMVs:** “*Outer membrane vesicles*”

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**OMPs:** “*Outer membrane proteins*”

**CMI:** Concentração mínima inibitória

**b.a.a.r.:** Bacilos álcool-ácido-resistentes

**PBPs:** “*Penicillin-binding proteins*”

**6-APA:** Ácido 6-aminopenicilânico

**VRE:** “*Vancomycin-resistant Enterococcus*”

**VRSA:** “*Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*”

**7-ACA:** Ácido 7-aminocefalosporânico

**MSSA:** “*Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*”

**MBLs:** Metalo- $\beta$ -lactamases

**OXAs:** Oxacilinas

**CTX-M:** “Cefotaximase”

**KPC:** “*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*”

**IRT:** “*Inhibitor-resistant TEM*”

**PB:** “*Penicillin Binding*”

**n-PB:** não PB

## I. Introdução

Em 1928, Alexander Fleming começou uma série de experiências com culturas de *Staphylococcus aureus*. Numa placa de Petri descoberta, junto a uma janela, Fleming reparou na presença de um fungo contaminante junto do qual as colónias de *S. aureus* não estavam a crescer (Figura 1). Ao isolar o fungo, constatou que este pertencia à espécie *Penicillium notatum* e que, através da excreção de uma substância designada, pelo próprio, de penicilina, possuía actividade bactericida. Estava descoberto o primeiro antibiótico, definido como uma substância natural produzida por um microorganismo, munida de propriedades antibacterianas, inibindo o crescimento celular ou originando a sua morte (Tan e Tatsumura, 2015).



**Figura 1:** Cultura original que culminou na descoberta da penicilina. Na parte superior da figura é possível observar o crescimento do fungo *Penicillium notatum*, junto do qual o crescimento de *Staphylococcus aureus* foi suprimido, enquanto na parte inferior são observadas colónias estafilocócicas normais (retirado de Fleming, 1944).

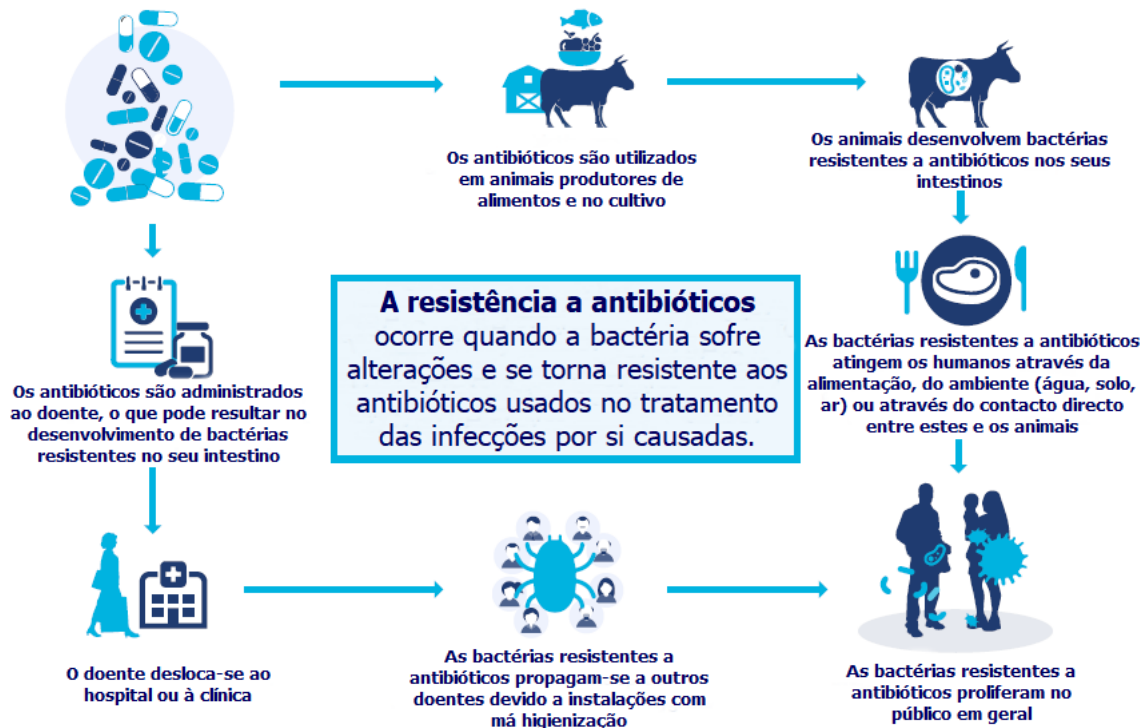
A utilização terapêutica da penicilina em grande escala apenas foi possível na década de 40, com a crescente procura no contexto da II Guerra Mundial. Os resultados foram extremamente satisfatórios e surgiu a sensação ilusória de que as doenças infecciosas se extinguiriam. Sem demora, constatou-se que essa sensação era manifestamente

precipitada, visto que as bactérias não tardaram a desenvolver mecanismos de resistência a este e a outros antibióticos que se lhe seguiram (Sousa *et al.*, 2016; Tan e Tatsumura, 2015).

Com o uso massivo em infecções comuns e triviais, e com apenas alguns anos decorridos, cerca de 50% das estirpes de *S. aureus* eram já desprovidas de susceptibilidade à penicilina (Alanis, 2005). Estes números aumentam para mais de 80% volvida uma década (Sousa *et al.*, 2016). Mesmo com o surgimento de novos antibióticos, nomeadamente com a introdução da meticilina, em 1959, não tardam a surgir relatos de estirpes com resistências adquiridas, denominadas *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês “*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”) (Alanis, 2005; Moellering, 2012). Durante as décadas seguintes foi possível vislumbrar diversos acontecimentos alarmantes para a comunidade, como o surgimento de bactérias multi-resistentes (MDR, do inglês “*Multidrug resistance*”), a transferência plasmídica de resistências entre diferentes espécies de bactérias, o aparecimento de *Escherichia coli* resistente a ampicilina ( $\beta$ -lactamase TEM-1), estirpes de Gram negativo produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs, do inglês “*Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases*”), AmpC e carbapenemases ou, já neste milénio, a identificação de *S. aureus* resistentes à vancomicina (Sousa *et al.*, 2016). As estirpes de Gram negativo MDR tornam-se especialmente preocupantes para a saúde pública pois não só adquirem resistências mais rapidamente do que as estirpes de Gram positivo, como existe um menor desenvolvimento de novos antibióticos a si destinados, temendo-se a ausência de cobertura terapêutica em cerca de 10 a 20 anos (Kumarasamy *et al.*, 2010).

Como se verifica na Figura 2, o uso abusivo de antibióticos, não só na prática clínica mas também na agro-pecuária, onde estes são usados no tratamento de doenças e como promotores de crescimento, origina uma pressão selectiva que favorece o crescimento de estirpes resistentes (Alanis, 2005; Sousa *et al.*, 2016). Ao administrar antibióticos, as bactérias mais susceptíveis, a maioria das quais saprófitas normalmente presentes no organismo, são eliminadas, seleccionando apenas as que são capazes de sobreviver independentemente da presença de antibióticos e colonizando o indivíduo com estirpes resistentes aos mesmos (Alanis, 2005). Ao serem eliminados inalterados pelo Homem e também em detritos industriais, os antibióticos vão causar um stress ambiental que

favorece a propagação de resistências entre bactérias dos solos e dos meios aquáticos que, por sua vez, terão impacto nas infecções humanas (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 2:** Proliferação da resistência a antibióticos (adaptado de World Health Organization, 2015).

No entanto, o aumento globalmente observado da resistência a antibióticos não pode ser explicado apenas com o uso moderno dos mesmos em humanos, envolvendo também uma interacção complexa num ecossistema que compreende comunidades microbianas, antibióticos e genes de resistência a antibióticos. Surge, assim, o novo paradigma de que a maioria dos genes de resistência a antibióticos devem, agora, ser considerados genes que existem naturalmente na natureza (Rolain *et al.*, 2012).

Os antibacterianos são considerados agentes etiotrópicos, não se destinando a influenciar quaisquer actividades biológicas do organismo humano, mas sim do organismo infectante (Sousa *et al.*, 2016). Assim, a terapia antibacteriana distingue dois mecanismos de acção dos antibióticos: os bacteriostáticos, que inibem o desenvolvimento da bactéria

mantendo-a na sua fase estacionária de crescimento, e os bactericidas, que resultam efectivamente em morte celular (Bernatova *et al.*, 2013; Ocampo *et al.*, 2014).

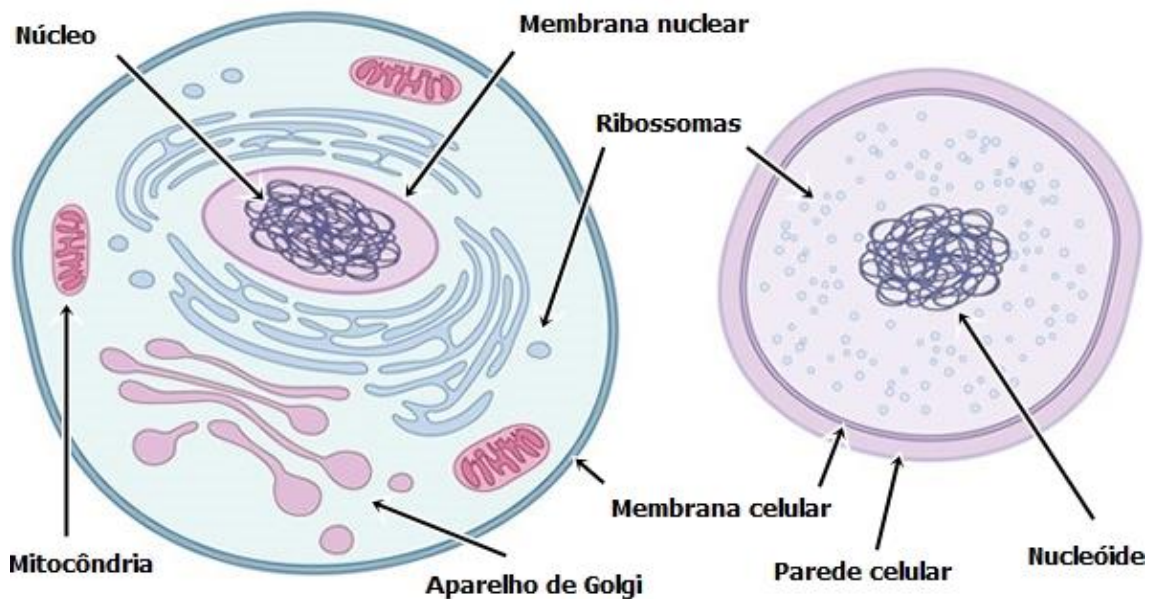
Os diferentes grupos de antibióticos podem ainda ser divididos de acordo com o alvo específico ou preferencial onde desempenham a sua acção na bactéria, nomeadamente: I) inibição da síntese ou do transporte de precursores da parede celular; II) interferência na síntese da membrana citoplasmática; III) bloqueio da síntese proteica; IV) alteração da síntese de ácidos nucleicos; e V) inibição das vias metabólicas (Calvo e Martínez-Martínez, 2009).

Esta monografia cinge-se a dados bibliográficos do período compreendido entre 1987 e 2016, com a excepção de um artigo original de Alexander Fleming, datado de 1944, e vai incidir, essencialmente, nos antibióticos que actuam na parede celular bacteriana, nomeadamente na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano, designados antibióticos antiparietais e extremamente utilizados na prática clínica.

## II. A célula bacteriana

### 1. Composição e estrutura da parede celular

A célula bacteriana (Figura 3) deve manter uma pressão osmótica positiva de modo a possibilitar o seu crescimento e divisão. Esta pressão pode ser de grande magnitude, originando um stress mecânico que é controlado em virtualmente todas as bactérias através da parede celular, um exosqueleto rígido que rodeia a membrana citoplasmática (Desmarais *et al.*, 2013). Esta é responsável pela forma e integridade anatomofisiológica da célula e também pelo diferente comportamento das bactérias face aos antibióticos e à coloração de Gram. A sobrevivência das bactérias nos ambientes hipotónicos a que normalmente estão sujeitas, sobretudo as de Gram positivo, detentoras de uma elevada pressão osmótica interna, só é possível devido à presença da parede celular, que impede a lise da célula (Sousa *et al.*, 2016).

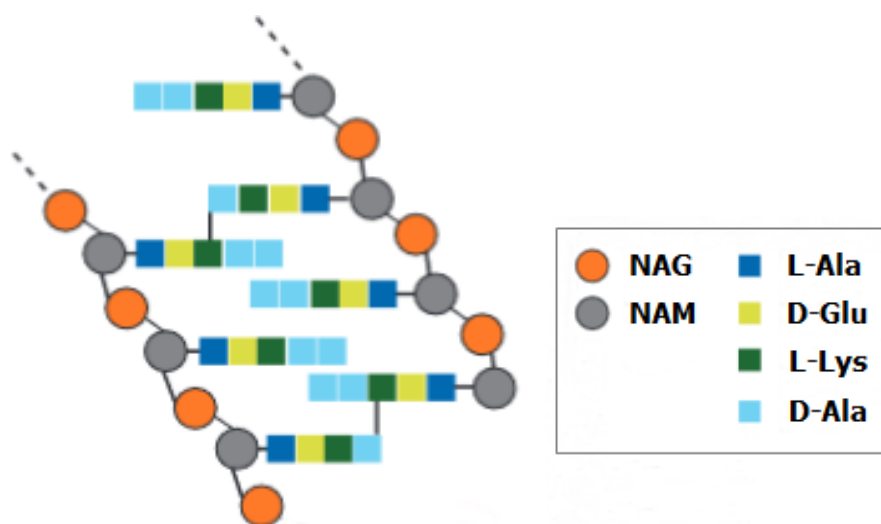


**Figura 3:** Célula eucariota (esquerda) e célula procariota (direita) (adaptado de Fuerst, 2010).

Independentemente da grande diversidade de formas e tamanhos ao longo do domínio bacteriano a parede celular é, universalmente, composta por peptidoglicano, uma rede macromolecular de cadeias de açúcar com ligações cruzadas a pequenos péptidos

(Desmarais *et al.*, 2013). Alguns autores sugerem que o peptidoglicano, em bactérias de Gram positivo, tem consistência equivalente a betão armado. Os antibióticos antiparietais, inibidores da biossíntese desta macromolécula, fragilizam a parede provocando lise celular em ambientes hipotónicos. Por outro lado, bactérias sem parede celular mas com baixa osmolaridade interna são naturalmente viáveis, exibindo resistência intrínseca aos antibióticos antiparietais (Sousa *et al.*, 2016).

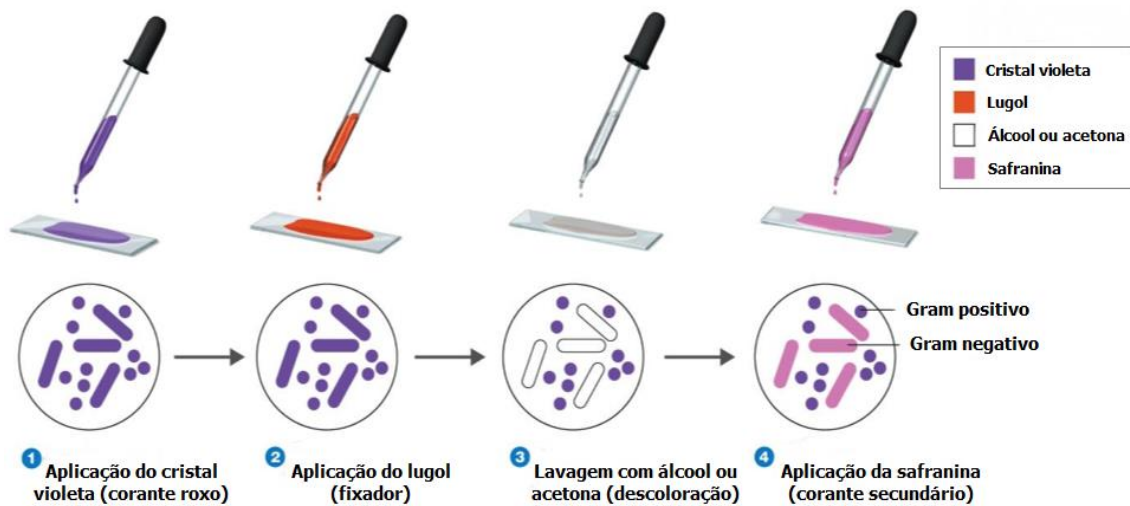
O peptidoglicano (também designado mucopeptídeo), retratado na Figura 4, consiste numa sucessão de aminoaçúcares N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), unidos por ligações  $\beta$ -1,4 (NAG- $[\beta$ -1,4]-NAM), mediadas pela transglicolase (TG). A cada NAM está ligado um pentapeptídeo e são estabelecidas ligações peptídicas (*cross-linking*) entre o 3º aminoácido (L-lisina) de uma cadeia com o 4º aminoácido (D-alanina) da cadeia vizinha, mediadas por duas carboxitranspeptidases, a carboxipeptidase (CP) e a transpeptidase (TP) (Meroueh *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2016). A ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 entre NAG e NAM do peptidoglicano bacteriano pode ser degradada pela lisozima. Esta enzima está presente em todos os fluidos do organismo humano, como o soro sanguíneo, lágrimas, saliva, leite humano e muco, catalisando a hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4 e desempenhando, assim, um papel importante no sistema de defesa inato do hospedeiro (Pushkaran *et al.*, 2015).



**Figura 4:** Macromolécula de peptidoglicano. NAG: N-acetilglicosamina; NAM: ácido N-acetilmurâmico; L-Ala: L-alanina; D-Glu: D-glutâmico; L-Lys: L-lisina; D-Ala: D-alanina (adaptado de Lovering *et al.*, 2012).

## 2. Diferentes tipos de parede celular

A diferente composição da parede celular entre bactérias de Gram positivo e Gram negativo está na base do seu diferente comportamento face à coloração de Gram (Figura 5) e reflecte-se na respectiva ultra-estrutura e no modo de acção dos antibióticos. As bactérias de Gram positivo não possuem lipídeos na sua parede, adquirindo a cor roxa do corante primário (cristal violeta) e não sofrendo descoloração com álcool ou acetona. Por outro lado, a parede das bactérias de Gram negativo é rica em lipídeos, não resistindo à descoloração e adquirindo, posteriormente, a cor vermelha do corante secundário (fucsina ou safranina) (Beveridge, 1999; Sousa *et al.*, 2016).

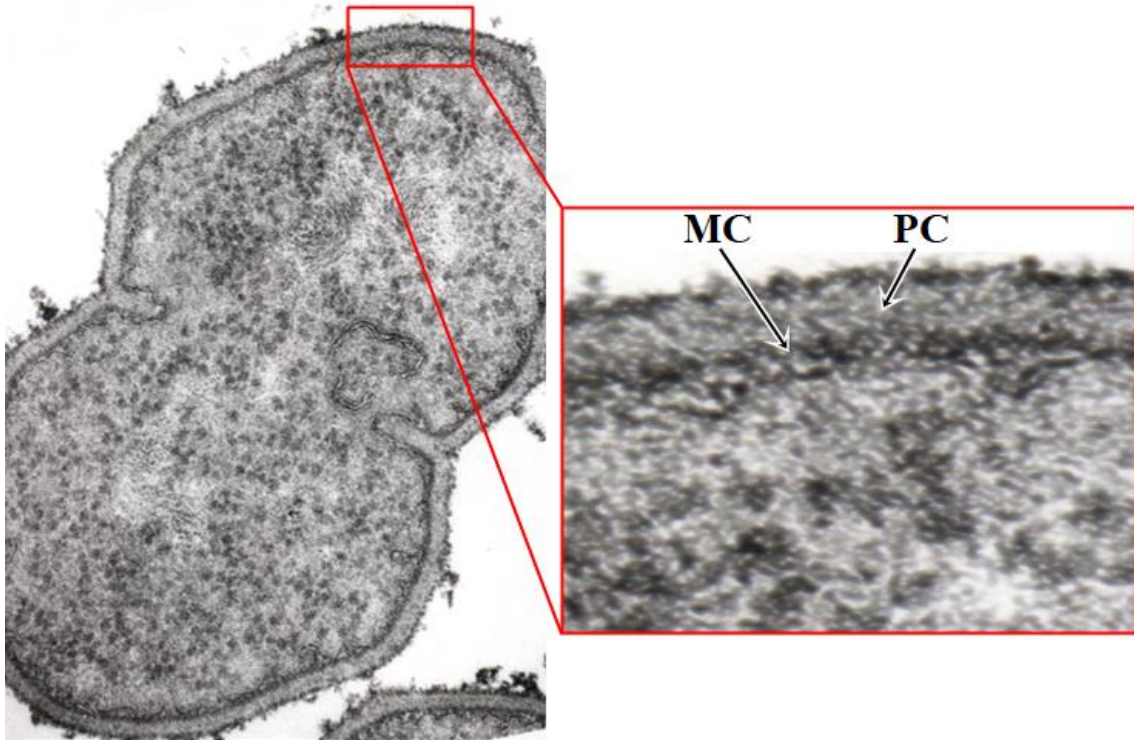


**Figura 5:** Procedimento da técnica de coloração de Gram (adaptado de LaboratoryInfo.com, 2016).

### i. Gram positivo

Reconhecidas, em tempos, como estruturas relativamente simples, as bactérias de Gram positivo (Figura 6) podem apresentar diversas diferenças entre si, especialmente no que diz respeito à renovação da sua parede celular (Beveridge, 1999). A sua pressão osmótica interna é muito elevada (20 atmosferas) e qualquer perturbação na sua parede pode originar a lise. Apesar de habitarem ambientes hipotónicos a lise celular não ocorre, graças ao peptidoglicano que, nestas bactérias, constitui cerca de 50 a 70% do peso seco

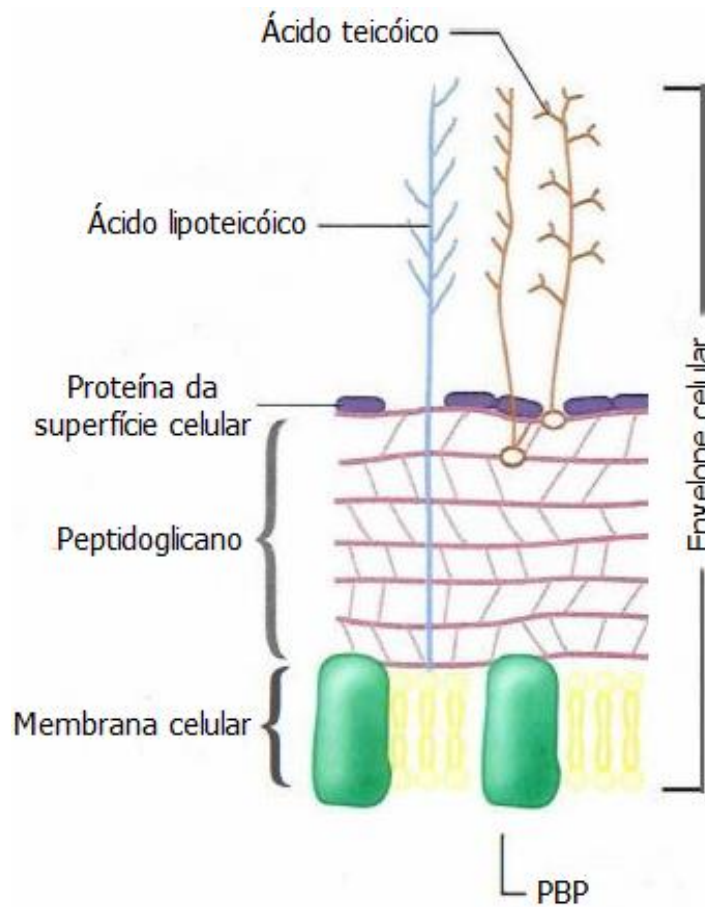
da parede da célula, que possui um periplasma de reduzidas dimensões entre si e a membrana celular (Sousa *et al.*, 2016). De um modo geral, a parede não confere resistência à difusão de macromoléculas em ambos os sentidos, ou seja, da mesma forma que os antibióticos conseguem penetrar a célula também outras substâncias, como as  $\beta$ -lactamases (enzimas hidrolíticas dos  $\beta$ -lactâmicos), são excretadas para o meio extracelular (Navarre e Schneewind, 1999; Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 6:** Parede celular de bactéria de Gram positivo. É visível a espessa camada da parede celular (PC), maioritariamente constituída por peptidoglicano, e a membrana celular (MC) (microscopia electrónica) (fotografia cedida pelo Prof. Doutor João Carlos Sousa).

A parede celular é ainda composta por ácidos teicóicos, ácidos teicurónicos, ácidos lipoteicóicos, polissacarídeos e modificações polissacarídicas (Navarre e Schneewind, 1999). Sabe-se que os ácidos teicóicos atingem a superfície bacteriana, atravessando toda a espessura da parede celular e funcionando como antigénios somáticos e como receptores fágicos (Figura 7). A libertação de componentes bacterianos imunomoduladores, como ácidos teicóicos, ácidos lipoteicóicos e lipopolissacarídeos (LPS), é induzida pelos

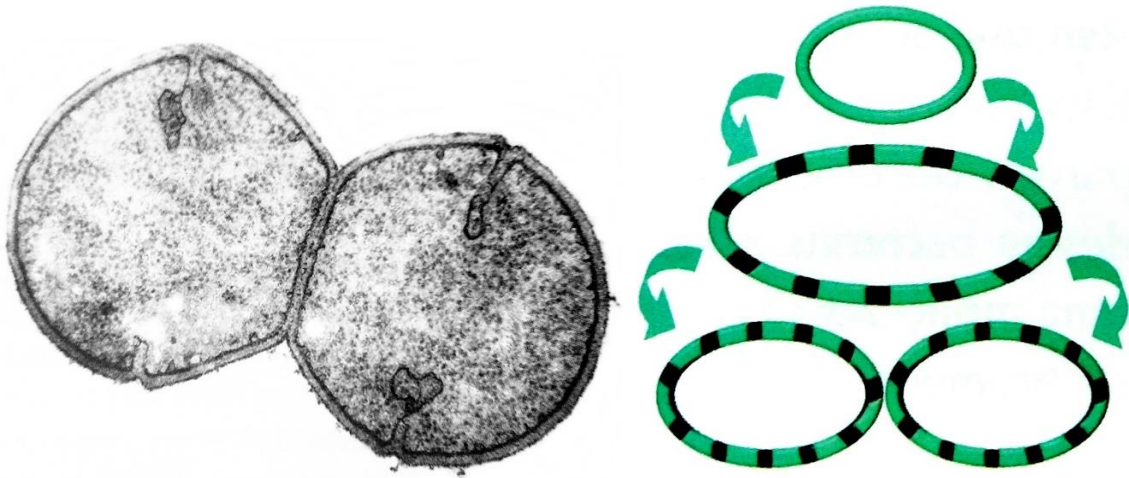
antibióticos bactericidas, sobretudo os antiparietais, após a lise bacteriana, podendo desencadear uma cascata de reações pró-inflamatórias no hospedeiro, associada à mortalidade. Outro factor de virulência com relevância clínica pode ser observado em algumas estirpes de *S. aureus* que possuem, na superfície da sua parede celular, uma camada externa polissacarídica que facilita a sua aderência a próteses ou ao tecido cardíaco, formando biofilmes e diminuindo, assim, a eficácia terapêutica dos antibióticos e a acção do sistema imunitário do hospedeiro (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 7:** Ilustração da parede celular de bactéria de Gram positivo. PBP: Proteína de ligação à penicilina (adaptado de Microbeonline.com, 2015).

O processo de multiplicação destas bactérias é realizado de forma assexuada, por cisão binária (Figura 8), ocorrendo um crescimento longitudinal da célula até que esta se divide a meio, em duas células filhas, com o conteúdo genómico idêntico, sendo a parede celular

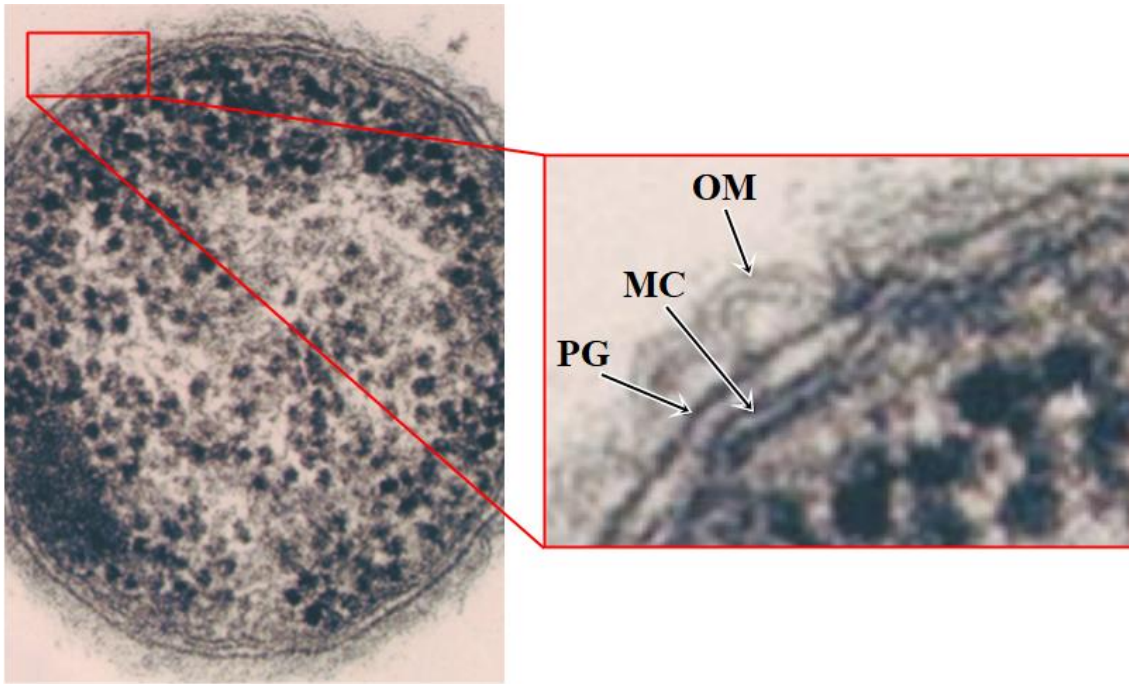
constituída por fragmentos da parede original e por novos fragmentos entretanto sintetizados (Angert, 2005; Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 8:** Divisão celular de bactéria de Gram positivo, à esquerda (microscopia electrónica). Esquematisação da divisão celular com a parede celular em crescimento, constituída por fragmentos da parede original (a verde) alternados com fragmentos entretanto sintetizados (a preto), do lado direito (fotografia e imagem cedidas pelo Prof. Doutor João Carlos Sousa).

## ii. Gram negativo

A parede celular das bactérias de Gram negativo (Figura 9) é mais complexa do que a parede das bactérias de Gram positivo, nomeadamente quanto à sua composição química e ultra-estrutura, estando sujeita a uma pressão osmótica interna bastante inferior, situada entre 1 a 10 atmosferas (Sousa *et al.*, 2016). Apesar disso, são mais uniformes no que diz respeito ao seu formato estrutural. Possuem uma membrana externa (OM, do inglês “*Outer membrane*”) sobreposta a uma fina camada de peptidoglicano (cerca de 10% do peso seco da parede celular). Confinado entre a OM e a membrana citoplasmática encontra-se o espaço periplasmático, que contém o periplasma, uma matriz concentrada com consistência de gel (Beveridge, 1999).

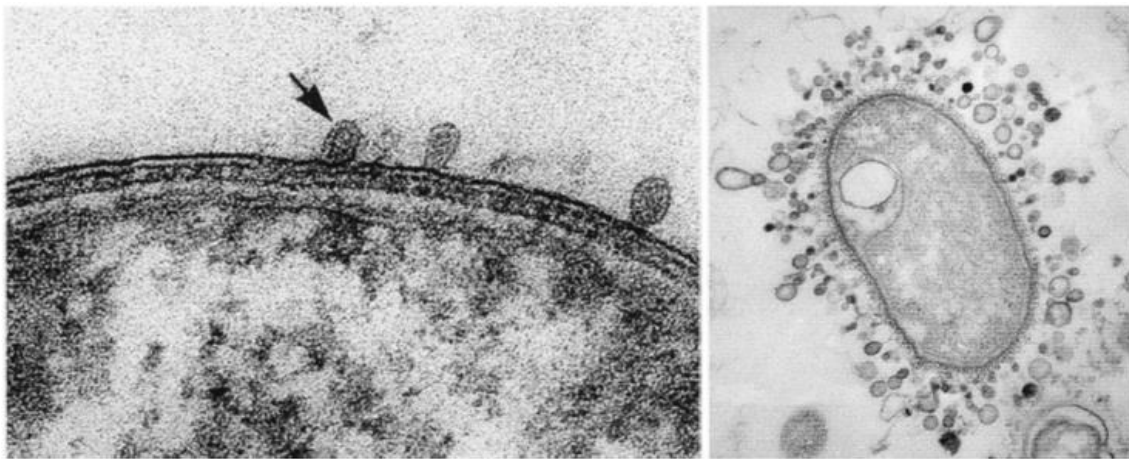


**Figura 9:** Parede celular de bactéria de Gram negativo. Além da membrana externa (OM) justaposta a uma fina camada de peptidoglicano (PG) é ainda possível observar, no espaço entre este e a membrana celular (MC), o periplasma, com dimensões consideráveis (microscopia electrónica) (fotografia cedida pelo Prof. Doutor João Carlos Sousa).

A OM é considerada a camada mais externa da parede das bactérias Gram negativo (apesar de possuírem LPS no folheto externo) separando, assim, o periplasma do meio extracelular. Tendo em conta que a bactéria necessita de difusão para obter nutrientes e para eliminar desperdícios do seu metabolismo conclui-se, facilmente, que a OM deve ser porosa para determinadas substâncias e deve possuir a capacidade de transportar outras. Contudo, não deve ser demasiado porosa, de modo a que substâncias existentes no periplasma e vitais para a sua sobrevivência sejam retidas (Beveridge, 1999). Além disso, actua como um factor limitante à entrada de antibióticos e protege a bactéria da acção de substâncias de defesa inatas ao hospedeiro infectado, tais como a lisozima,  $\beta$ -lisinas, proteínas dos leucócitos, sais biliares e enzimas digestivas, o que não sucede nas bactérias de Gram positivo sendo, por isso, considerada um factor de virulência (Sousa *et al.*, 2016).

Parte do potencial patogénico de uma grande variedade de bactérias de Gram negativo depende da sua capacidade de libertar os já referidos factores de virulência junto dos seus tecidos alvo. As vesículas da membrana externa (OMVs, do inglês “*Outer membrane*

*vesicles*”), presentes na Figura 10, são um desses factores, consistindo numa espécie de pequenas réplicas dinâmicas da composição da membrana externa que se libertam para o meio ambiente, contendo LPS, proteínas porinas (OMPs, do inglês “*Outer membrane proteins*”), fosfolipídeos e constituintes essenciais do espaço periplasmático, como o ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), toxinas e enzimas degradativas de antibióticos, tais como as  $\beta$ -lactamases. Estas vesículas possuem a capacidade de disseminar os genes de resistência aos antibióticos para outras bactérias anteriormente susceptíveis, tendo em conta a sua aptidão para se fundir com uma grande variedade de paredes celulares de Gram negativo e, assim, libertar o seu conteúdo no espaço periplasmático das mesmas (Beveridge, 1999).



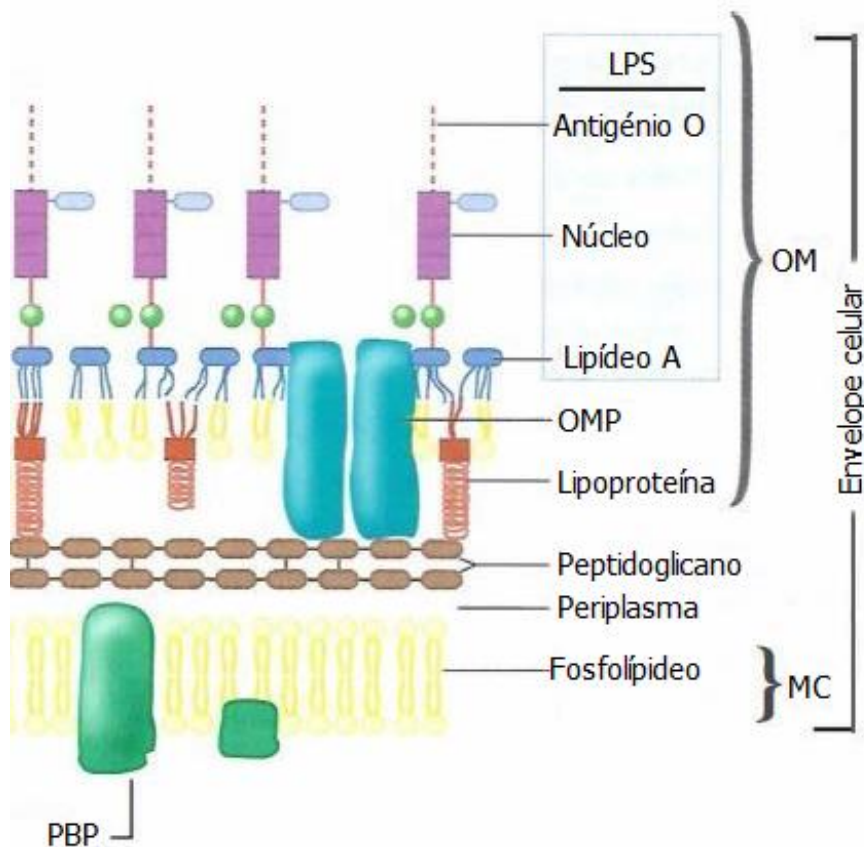
**Figura 10:** Formação e libertação de OMVs a partir da membrana externa de bactérias de Gram negativo (microscopia electrónica) (adaptado de Beveridge, 1999).

Os LPS constituem as moléculas mais características das bactérias de Gram negativo e a principal endotoxina bacteriana. Consistem em moléculas anfifílicas, com uma extremidade polissacarídica (hidrófila) e com lipídeo A (extremidade hidrófoba). Possuem uma distribuição assimétrica e localizam-se unicamente no folheto externo da membrana externa, encontrando-se ancorados na mesma através do lipídeo A, estando a região hidrófila projectada para o exterior da célula, contribuindo para a sua carga electronegativa (Sousa *et al.*, 2016). São uma barreira eficaz contra a penetração de compostos hidrofóbicos como antibióticos, detergentes e sais biliares. Sabe-se que é constituído por 3 regiões: polissacarídeo O, núcleo polissacarídeo e lipídeo A (Sousa *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2013).

Têm sido isoladas mutantes com LPS incompleto, com ausência da cadeia O ou, por vezes, com ausência da cadeia O e de grande parte no núcleo polissacarídeo em simultâneo, designadas mutantes rugosas. Esta perda parcial arrasta consigo a perda de proteínas da membrana externa, visto que o LPS estabelece ligações hidrofóbicas com as mesmas. É geralmente aceite que esta perda é compensada com fosfolipídeos do folheto interno ou da membrana celular formando-se, assim, zonas com bicamadas fosfolipídicas (Sousa *et al.*, 2016).

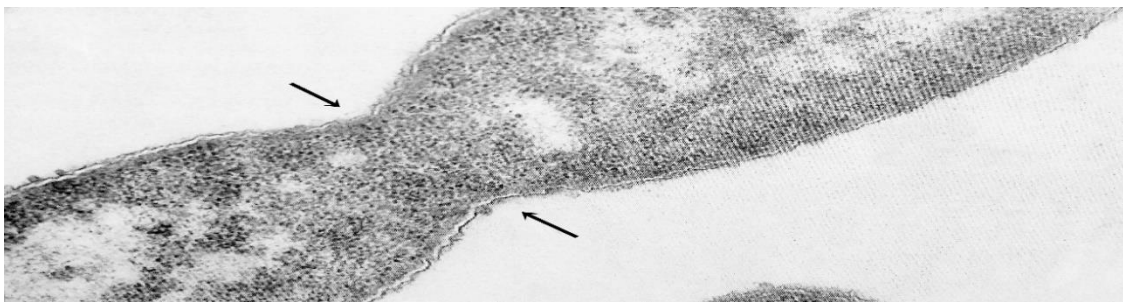
Os LPS (Figura 11) têm sido responsabilizados pelas manifestações clínicas que ocorrem nas infecções por bacilos de Gram negativo, como febre, inflamação e choque séptico. Participam ainda na activação de macrófagos e linfócitos, activação do sistema do complemento, do sistema gerador de cininas e sobre o sistema intrínseco da coagulação sanguínea, provocando coagulações intravasculares disseminadas por activação aumentada do factor XII. Comportam-se, portanto, como superantígenos, causando uma resposta imune exacerbada, que funciona contra o hospedeiro. Alguns autores sugerem que infecções conhecidas por evidenciarem este fenómeno devem ser tratadas previamente com anti-inflamatórios de modo a atenuar a resposta imune originada por antibióticos bacteriolíticos. (Sousa *et al.*, 2016).

Responsáveis por conferir permeabilidade selectiva ao influxo de nutrientes e ao efluxo de detritos da célula bacteriana estão as OMPs (Choong e Yung-Hung, 2016). Consistem em canais de difusão não específicos que desempenham um papel importante na integridade da membrana externa e no transporte de moléculas (como antibióticos), para além de participarem na patogénese das infecções. A perda destas porinas em algumas estirpes bacterianas está, geralmente, associada ao aumento da concentração mínima inibitória (CMI) (Sousa *et al.*, 2016). A difusão de antibióticos através da membrana externa ocorre, essencialmente, por dois processos: via hidrófila (através de OMPs) e via hidrófoba (através de bicamadas fosfolipídicas). Existe ainda uma 3ª via onde os antibióticos policatiónicos autopromovem a sua penetração, denominada “*self-promoted*”, sendo esta mais rara (Hancock e Bell, 1989).



**Figura 11:** Ilustração da parede celular de bactéria de Gram negativo. LPS: Lipopolissacarídeo; OMP: Canal de porina; PBP: Proteína de ligação à penicilina; OM: Membrana externa; MC: Membrana celular (adaptado de Microbeonline.com, 2015).

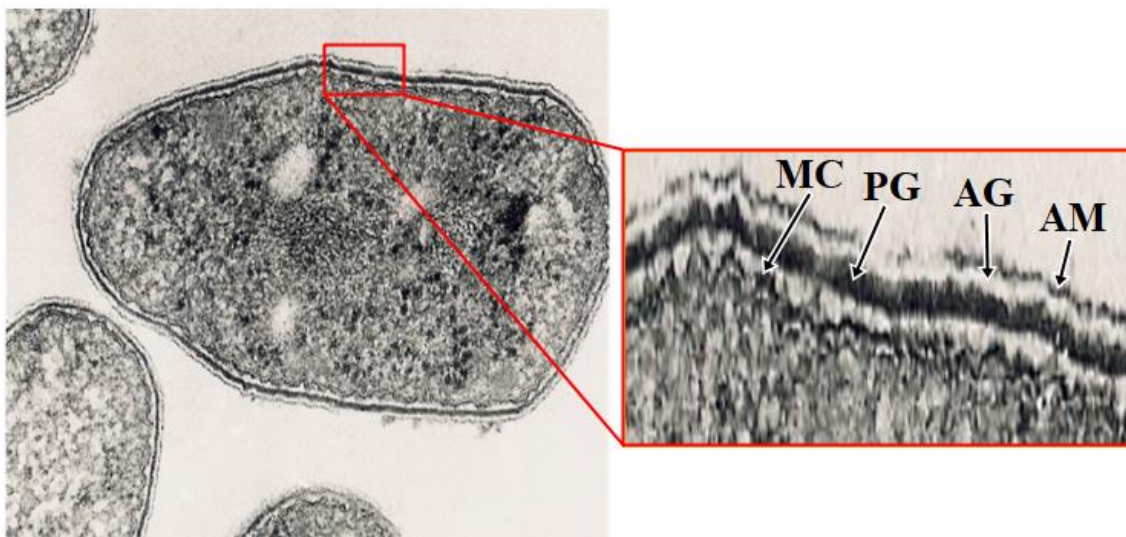
Nestas bactérias o processo de divisão também ocorre por cisão binária, envolvendo a formação de um estrangulamento na região mediana da célula (Figura 12), originando igualmente duas células filhas geneticamente iguais à célula mãe (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 12:** Divisão celular de bactéria de Gram negativo (microscopia eletrônica) (fotografia cedida pelo Prof. Doutor João Carlos Sousa).

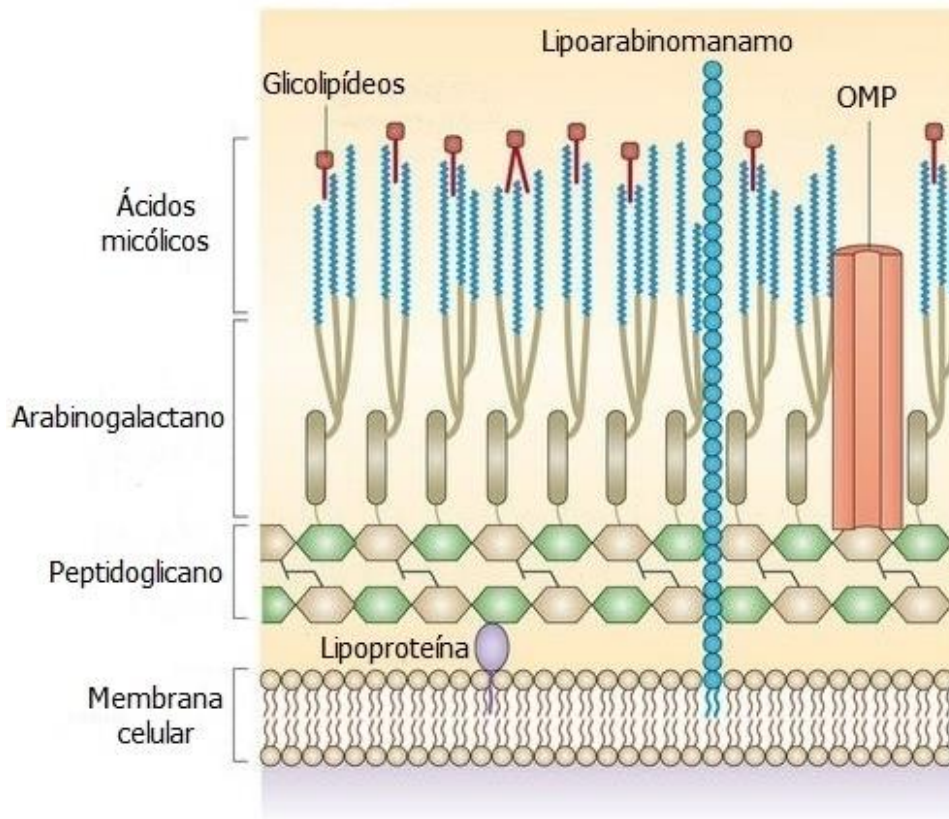
### iii. Bacilos álcool-ácido-resistentes

Os bacilos álcool-ácido-resistentes (b.a.a.r.) como, por exemplo, as do género *Mycobacterium* spp. (Figura 13), apresentam algumas particularidades na sua parede celular. Esta é bastante compacta, sobretudo devido a presença de lipídeos de alto peso molecular (ácidos micólicos), o que a torna impermeável a diversos compostos e que justifica várias das peculiaridades observadas nestas espécies bacterianas (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 13:** Parede celular de b.a.a.r.. MC: Membrana celular; PG: Peptidoglicano; AG: Arabinogalactano; AM: Ácidos micólicos (microscopia electrónica) (fotografia cedida pelo Prof. Doutor João Carlos Sousa).

Os lipídeos presentes neste tipo de parede celular (Figura 14) impossibilitam a coloração de Gram, fazendo com que estas bactérias apenas possam ser observadas à microscopia óptica com recurso a uma coloração mais energética, a coloração de Ziehl-Neelsen (Sousa *et al.*, 2016).

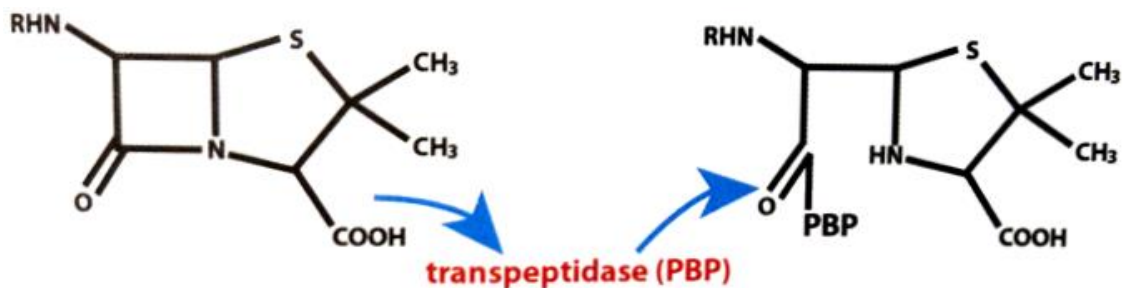


**Figura 14:** Ilustração da parede celular de bacilos álcool-ácido-resistentes. OMP: Canal de porina (adaptado de Brown *et al.*, 2015).

### III. Mecanismo de acção dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são conhecidos como antibióticos antiparietais, pois levam a cabo a sua acção na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano que, como referido anteriormente, é o principal constituinte da parede celular bacteriana. A integridade desta é essencial para manter a forma celular nos ambientes hostis a que é sujeita, sendo a estabilidade osmótica da célula bacteriana assegurada por pequenas cadeias lineares de aminoaçúcares NAG e NAM produzidas no citoplasma da bactéria e transportadas, através da membrana celular, até ao periplasma bacteriano, onde são incorporadas no peptidoglicano em zonas específicas criadas pelas autolisinas bacterianas. Este processo de substituição de fragmentos antigos por fragmentos mais recentes ocorre de forma coordenada na ausência de antibióticos antiparietais devido à acção, em conjunto, das autolisinas, TPs, TGs e CPs situadas no folheto externo da membrana celular bacteriana, essenciais para conferir rigidez à parede celular (Drawz e Bonomo, 2010; Sousa *et al.*, 2016).

Os antibióticos antiparietais reconhecem as enzimas TPs, TGs e CPs como alvos sendo estas, por esse motivo, denominadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs, do inglês “*Penicillin-binding proteins*”). Quando ligados às PBPs (Figura 15), os  $\beta$ -lactâmicos impedem a formação e maturação do peptidoglicano por acetilação do grupo serina existente no centro activo do domínio TP das PBPs. Como a desacetilação ocorre de forma lenta, a inactivação dos PBPs é virtualmente irreversível, sendo suficiente para impedir a proliferação bacteriana (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 15:** Interação entre o antibiótico  $\beta$ -lactâmico e a transpeptidase, originando um complexo estável e inativo (retirado de Sousa *et al.*, 2016).



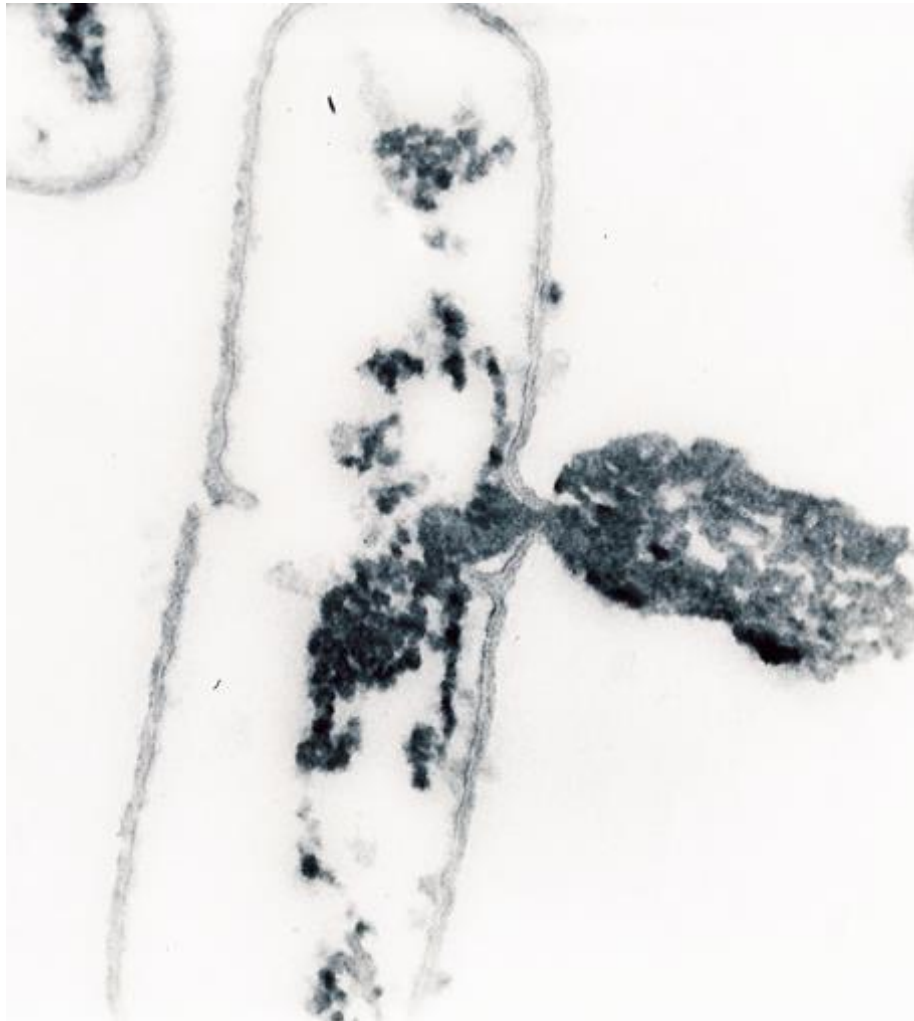
essa travessia significativamente mais complexa nas últimas, dada a presença da membrana externa que pode representar uma barreira de permeabilidade.

### 1. Proteínas de ligação à penicilina

As enzimas envolvidas na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano são as TPs, TGs e CPs, designadas PBP e situadas no folheto da membrana celular bacteriana. As PBPs variam entre as diferentes bactérias e, para além de participarem na biossíntese da parede celular durante o crescimento bacteriano, também desempenham outras funções, como a contribuição na formação de septos parietais durante a divisão celular, por cisão binária, e também na septação específica do processo esporulativo nas bactérias dos géneros *Bacillus* e *Clostridium*. Admite-se que as  $\beta$ -lactamases bacterianas, maioritariamente com serina no seu centro activo, consistam em emanações das PBPs, destacando-se o facto de que a PBP tp47 de *Treponema pallidum* apresenta a dupla função de intervir na biossíntese da parede celular e de actuar como  $\beta$ -lactamase contra a penicilina (Sousa *et al.*, 2016). Aliás, esta capacidade da PBP tp47 de *Treponema pallidum* para exibir actividade como  $\beta$ -lactamase pode até ser considerada uma espécie de quinto mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Cha *et al.*, 2004).

Por convenção, as PBPs são denominadas com algarismos, organizados por ordem decrescente dos respectivos pesos moleculares (por exemplo, PBP1a: 92 KDa; PBP 2: 66 KDa; PBP3: 60 KDa), sendo que cada espécie possui as suas PBPs específicas, passíveis de visualização por separação electroforética, em SDS-PAGE. Enquanto a maioria das PBPs possuem um único domínio de ligação à penicilina (PB, do inglês “*Penicillin Binding*”) com actividade de TP (catalisando a formação de pontes peptídicas que fazem a união entre diferentes cadeias de glicanos do peptidoglicano), existem outras PBPs que não só possuem um domínio PB, como também um domínio não PB (n-PB) com actividade de glicosiltransferase (catalisando o crescimento de cadeias de glicanos no peptidoglicano), denominadas PBPs bi-funcionais (por exemplo, a PBP2 nativa de *S. aureus*). Assim, é seguro dizer-se que a síntese da cadeia NAG-NAM do peptidoglicano ocorre no domínio TG das PBPs, enquanto as ligações peptídicas que ligam o peptidoglicano ocorrem no domínio TP das mesmas, mono ou bi-funcionais. Existem ainda PBPs com actividade de CP que removem o último radical D-alanina da cadeia

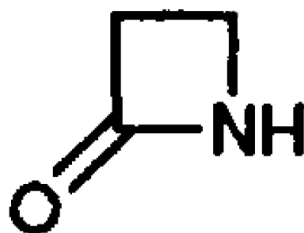
pentaglicínica do precursor do peptidoglicano durante a biossíntese da sua fase parietal. Estas diferentes PBPs podem cooperar entre si, como se observa nas estirpes de MRSA onde o PBP2a, sem domínio de glicosiltransferase, necessita da acção de TG do PBP2 residente para obter resistência à meticilina. Alguns antibióticos demonstram uma elevada afinidade para diversas PBPs, o que pode originar uma multiplicidade de efeitos sobre a célula bacteriana (por exemplo, a cefotaxima possui grande afinidade para PBP1a e PBP3 aumentando, assim, a sua eficácia). Assim, a associação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos a algumas (ou mesmo todas) PBPs, da 1 à 3, é essencial para obter a inibição do crescimento bacteriano e a respectiva autólise (Figura 17), visto que as PBPs de elevado peso molecular parecem ser vitais para as funções microbianas (Sauvage *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 17:** Lise de bactéria de Gram positivo induzida pela penicilina G (microscopia electrónica) (fotografia cedida pelo Prof. Doutor João Carlos Sousa).

#### IV. Evolução dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

O sucesso clínico do primeiro  $\beta$ -lactâmico, a penicilina G (benzilpenicilina), iniciou a demanda pelo desenvolvimento de derivados adicionais. Esta procura deu origem aos  $\beta$ -lactâmicos utilizados, actualmente, na prática clínica (penicilinas, cefalosporinas de estreito e largo espectro, monobactams e carbapenems) que, apesar de não constituírem um grupo homogêneo possuem, sem excepção, um anel  $\beta$ -lactâmico (Figura 18) altamente reactivo na sua estrutura, constituído por quatro átomos. Infelizmente, as resistências aos  $\beta$ -lactâmicos mediadas por  $\beta$ -lactamases emergiram como uma ameaça clínica significativa a estes antibióticos. Em resposta a este desafio, foram delineadas duas estratégias que visam preservar a utilidade dos  $\beta$ -lactâmicos: I) descobrir ou desenhar antibióticos  $\beta$ -lactâmicos capazes de escapar à inactivação enzimática realizada pelas  $\beta$ -lactamases; ou II) inibir as  $\beta$ -lactamases de modo a que os  $\beta$ -lactâmicos consigam alcançar o seu alvo, nomeadamente, as PBPs (Drawz e Bonomo, 2010).

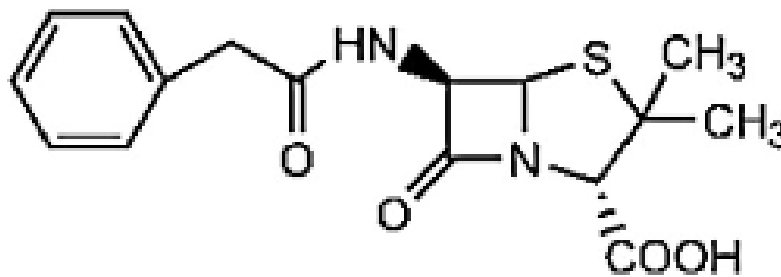


**Figura 18:** Estrutura química do anel  $\beta$ -lactâmico, centro farmacológico dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (adaptado de Southgate, 1994).

Existem quatro mecanismos principais que conferem, às bactérias, resistência contra os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: I) a já referida produção de  $\beta$ -lactamases, que constitui o mecanismo de resistência mais importante em bactérias de Gram negativo; II) modificação das PBPs, o que pode diminuir a afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos e, conseqüentemente, aumentar a resistência a estes agentes; III) diminuição da expressão de OMPs, impermeabilizando a membrana externa; e IV) expressão de bombas de efluxo, capazes de expulsar uma vasta gama de substratos do periplasma para o exterior da célula bacteriana, diminuindo a susceptibilidade das bactérias, principalmente as MDR de Gram negativo (Drawz e Bonomo, 2010).

## 1. Penicilinas

A descoberta da penicilina G (ou benzilpenicilina) modificou, por completo, o panorama das doenças infecciosas, fazendo diminuir abruptamente a incidência de mortalidade associada a diversas infecções como pneumonias, sífilis e gonorreia. É constituída por um anel  $\beta$ -lactâmico com três átomos de carbono e um de nitrogénio (azeto), fundido com um anel tiazolidina, contendo uma cadeia lateral (R) com repercussões na sua farmacocinética e farmacodinâmica (Figura 19). Exemplo disso são algumas das limitações apresentadas, como o reduzido espectro de actividade, a hidrólise pela acidez do estômago (limitante da sua utilização oral), a rápida eliminação da corrente sanguínea (por excreção urinária), a susceptibilidade às  $\beta$ -lactamases e a possibilidade de, em alguns doentes, desencadear fenómenos de hipersensibilidade (Sousa *et al.*, 2016).



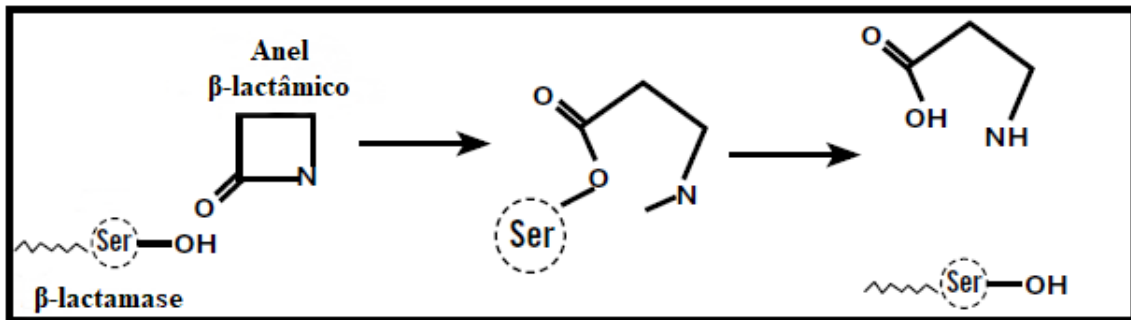
**Figura 19:** Estrutura química da penicilina G (adaptado de Perez-Inestrosa *et al.*, 2005).

### i. Penicilinas naturais

Os sais hidrossolúveis de penicilinas naturais (penicilina G ou benzilpenicilina) podem ser administrados por via intramuscular ou, em alternativa, por via intravenosa, permitindo a obtenção de concentrações sanguíneas mais elevadas. Contudo, dada a rápida excreção da penicilina G, houve necessidade de recorrer a processos que retardassem a sua eliminação por via renal. A adição de certas aminas à benzilpenicilina dá lugar a complexos insolúveis que se utilizam na terapêutica para retardar a absorção, após administração intramuscular, tais como os formados com a procaína, com clemizol ou com benzatina. Após a administração das penicilinas insolúveis, as concentrações de penicilina G no sangue são baixas mas mantidas por mais tempo, sendo utilizadas no tratamento de infecções por microorganismos muito sensíveis, como *S. pyogenes* e

*Treponema pallidum*, sendo que a concentração sérica deve permanecer acima de 0,03 µg/ml, de modo a revelar eficácia (Sousa *et al.*, 2016).

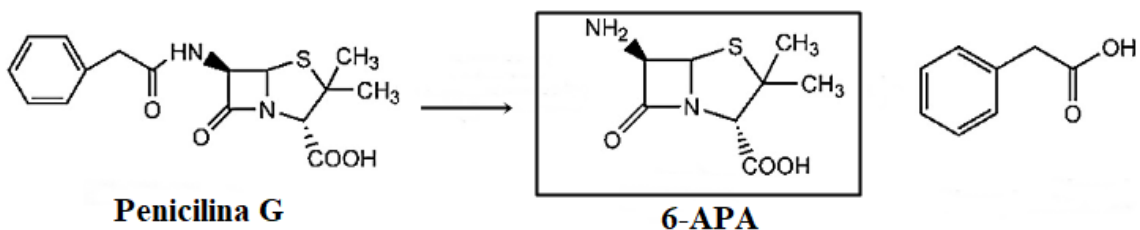
No entanto, desde a década de 50, a maioria das estirpes de *S. aureus* são resistentes à penicilina G, por hidrólise da ligação amida do anel β-lactâmico mediada por β-lactamases (penicilinases) plasmídicas, como se verifica na Figura 20 (Silva e Lincopan, 2012). Foi, assim, imperativo a criação de alternativas terapêuticas.



**Figura 20:** Modo de acção de uma serina-β-lactamase. É possível observar a hidrólise da ligação amida do anel β-lactâmico, induzindo a inactivação do antibiótico (originando o peniciloato inactivo) (adaptado de Silva e Lincopan, 2012).

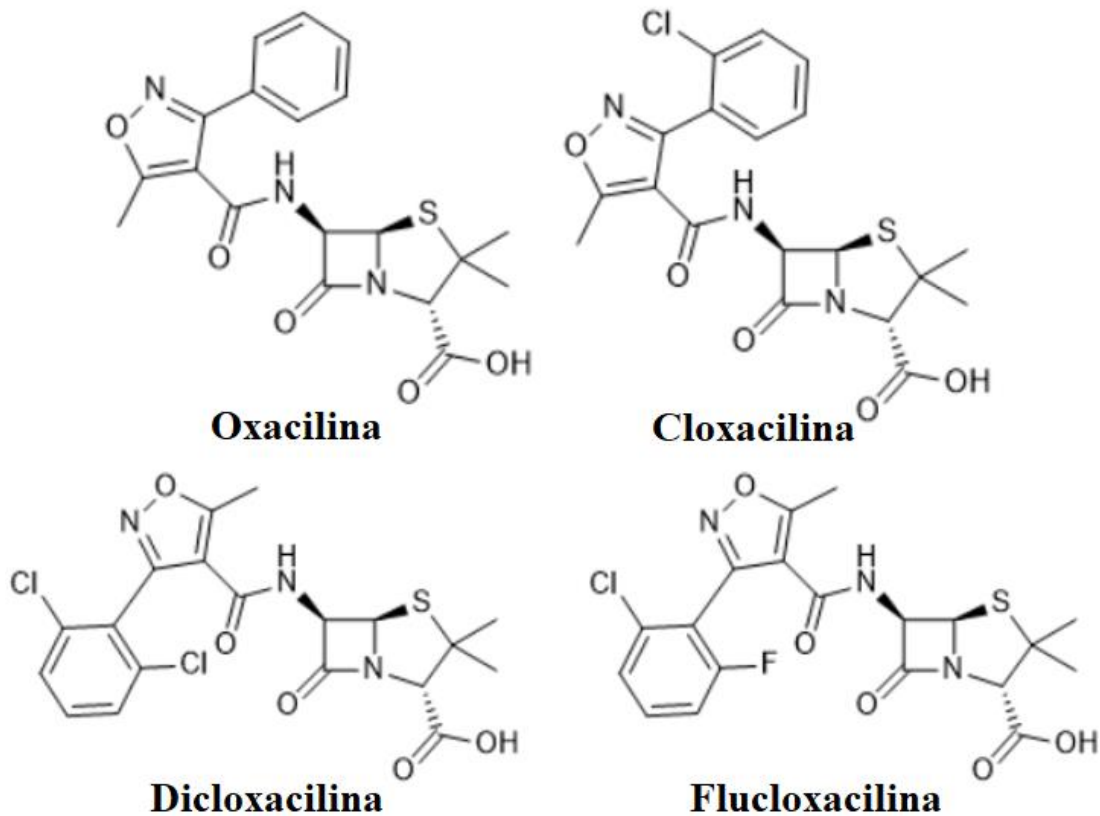
## ii. Penicilinas semi-sintéticas

O acontecimento precursor do desenvolvimento das penicilinas semi-sintéticas, um dos grupos de antibióticos mais utilizados na prática clínica, foi a descoberta do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), em destaque na Figura 21 (Rolinson e Geddes, 2007).



**Figura 21:** Estrutura química do 6-APA. Obtido por ruptura da molécula da penicilina G na posição 6-amino, através de amidases (adaptado de Perez-Inestrosa *et al.*, 2005).

Após a obtenção do 6-APA foi possível introduzir, no seu grupo amina, novos radicais que causam o impedimento estérico à volta da ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, impedindo a sua hidrólise por  $\beta$ -lactamases estafilocócicas, ao contrário do que ocorre com a penicilina G. Este é o caso das isoxazolilpenicilinas (Figura 22), da meticilina e da nafcilina, que exibem actividade contra estirpes de *S. aureus* produtoras de penicilinases (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 22:** Estrutura química das isoxazolilpenicilinas (adaptado de Innovative Solution, 2010).

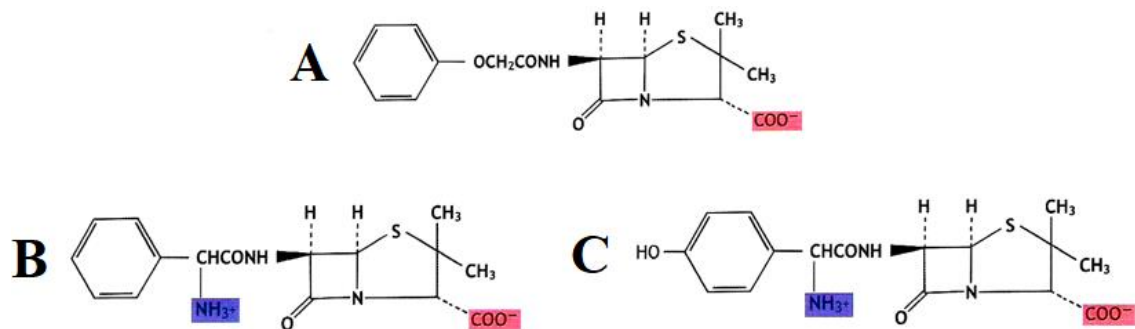
No entanto, e volvidos apenas dois anos após a introdução da meticilina na prática clínica surgem, no Reino Unido, os primeiros relatos de estirpes de MRSA resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmico conhecidos até então, estirpes essas que não tardaram a propagar-se pelo mundo (Enright *et al.*, 2002; Moellering, 2012). Ao contrário do que sucede na resistência à penicilina, maioritariamente devida a produção de  $\beta$ -lactamases, a resistência à meticilina tem origem na aquisição de genes que codificam uma PBP única, designada

PBP2a ou PBP2', responsável pela diminuição da afinidade da bactéria para os  $\beta$ -lactâmicos e pela catálise da síntese de parede celular, mesmo na presença de penicilinas antiestafilocócicas. Os genes que codificam a PBP2a são denominados *mecA* e, ao contrário do que sucede nas PBPs de outras bactérias, que consistem em ADN nativo e ADN proveniente de outras espécies naturalmente resistentes, são adquiridos de forma inata (Moellering, 2012). Estudos mais recentes demonstram ainda que a resistência à meticilina por parte das bactérias da família *Staphylococcaceae* é conferida não só por *mecA* mas também pelos seus genes homólogos, *mecB* e *mecC* (Becker *et al.*, 2014).

A solução encontrada foi o recurso à vancomicina. Também descoberto na década de 1950, este antibiótico glicopéptideo foi, inicialmente, preterido face às penicilinas consideradas, na altura, mais seguras e, possivelmente, mais eficazes. A vancomicina tem sido um aliado importante no combate às infeções por MRSA nos últimos 50 anos (Moellering, 2012). Ainda assim, e após décadas de uso sistemático em ambiente hospitalar, surgem as primeiras estirpes de *S. aureus* e de *Enterococcus* spp. resistentes a este etiotropo. O aparecimento de estirpes de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (VRE, do inglês “*Vancomycin-resistant Enterococcus*”) na década de 1980 e, mais recentemente, de estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA, do inglês “*Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*”) despoletaram a necessidade de introduzir novos antibióticos no armamento terapêutico (Sousa *et al.*, 2016). De entre os antibióticos mais recentemente introduzidos na prática clínica destacam-se as cefalosporinas de 5ª geração, ceftarolina e ceftobiprole, e antibióticos não  $\beta$ -lactamâmicos como a linezolida, daptomicina, tigeciclina e estreptograminas (Moellering, 2012; Sousa *et al.*, 2016).

Contudo, a utilidade da semi-síntese de penicilinas a partir do 6-APA não se resume à obtenção de penicilinas mais resistentes às  $\beta$ -lactamases bacterianas, mas também à melhoria de outros pontos fracos da penicilina G. Por exemplo, a natureza aniónica da benzilpenicilina confere-lhe fraca actividade contra bactérias de Gram negativo, devido à dificuldade em permear os canais porina existentes na membrana externa das mesmas. Com a introdução de um grupo amina na posição 6 da molécula aniónica da penicilina G (gerando as aminopenicilinas) este problema foi ultrapassado, visto que a sua carga foi neutralizada pelo grupo amina introduzido (Figura 23), originando uma molécula

zwitteriônica que facilmente permeia os canais porina das bactérias de Gram negativo. Assim, em 1963, estava encontrado o primeiro  $\beta$ -lactâmico com actividade significativa contra bacilos de Gram negativo, ao qual se deu o nome de ampicilina. A partir desta molécula surgiram também, por síntese química, pro-fármacos (tais como hetacilina, bacampicilina, pivampicilina e talampicilina) inactivos *in vitro* mas passíveis, *in vivo*, de hidrólise com libertação da ampicilina activa, apresentando melhor absorção oral e fraca destruição da flora autóctone intestinal, o que conduz a menos efeitos secundários a nível gastrointestinal (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 23:** Estrutura química da molécula aniónica da penicilina G (A) e das aminopenicilinas, ampicilina (B) e amoxicilina (C). A carga eléctrica neutra apresentada por B e C facilita a difusão através das OMPs (adaptado de Sousa *et al.*, 2016).

Lamentavelmente, e apenas dois anos após a introdução da ampicilina na prática clínica, foi identificada uma estirpe de *E. coli* que lhe apresentava resistência devido à produção de uma  $\beta$ -lactamase, designada TEM-1 (com origem no nome Temoniera, paciente grega onde foi encontrada) (Samaha-Kfoury e Araj, 2003; Song *et al.*, 2005). Apesar de originalmente encontradas em *E. coli*, este tipo de  $\beta$ -lactamase não tardou a propagar-se para outras bactérias (Samaha-Kfoury e Araj, 2003). De modo a contornar este problema de resistência bacteriana a indústria criou associações de aminopenicilinas a compostos que as protegem da hidrólise por parte das  $\beta$ -lactamases (Tabela 1), como o ácido clavulânico (1970), o sulbactam (1978) e o tazobactam (1980). Estes compostos, que partilham uma estrutura similar à da penicilina, são inibidores das  $\beta$ -lactamases aumentando, assim, a eficácia das aminopenicilinas (Drawz e Bonomo, 2010).

**Tabela 1:**  $\beta$ -lactamases segundo a classificação de Ambler (adaptado de Toussaint e Gallagher, 2015).

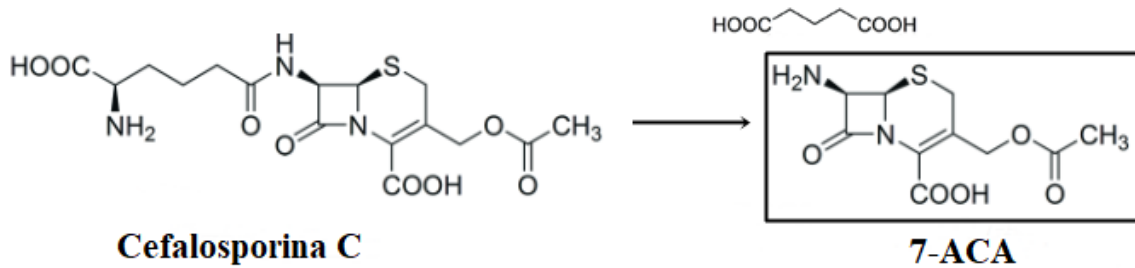
Tipo	Classe	Características	Exemplos
$\beta$ -lactamases de espectro reduzido	A	Hidrolisam a penicilina; produzidas principalmente por <i>Enterobacteriaceae</i>	Penicilase estafilocócica, TEM-1, TEM-2, SHV-1
$\beta$ -lactamases de espectro alargado	A	Hidrolisam $\beta$ -lactâmicos de espectro reduzido e alargado	SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
Serina-carbapenemases	A	Hidrolisam carbapenemos	KPC-1, IMI-1, SME-1
Metalo- $\beta$ -lactamases	B	Hidrolisam carbapenemos	VIM-1, IMP-1, NDM-1
Cefalosporinas	C	Hidrolisam cefamicinas e alguns oximino- $\beta$ -lactâmicos; induzíveis; mediadas cromossomicamente	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
Enzimas do tipo OXA	D	Hidrolisam oxacilinas, oximino- $\beta$ -lactâmicos e carbapenemos; produzidas por <i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i>	Enzimas OXA

É de salientar que as aminopenicilinas não demonstram actividade em *Pseudomonas aeruginosa*, pois esta apresenta um baixo número e tipos particulares de canais porina. Os avanços na área da química permitiram a introdução, na posição 6 da benzilpenicilina, de um grupo carboxilo, ureído ou piperazina originando, respectivamente, as carboxipenicilinas (carbenicilinas e ticarcilinas), as ureidopenicilinas (azlocilina e mezlocilina) e a piperacilina, todas com razoável actividade contra *Pseudomonas spp.*, sendo comum, no entanto, a sua associação com inibidores de  $\beta$ -lactamases, tal como sucede nas penicilinas naturais e nas aminopenicilinas. Já a introdução, na posição 6, de um grupo metoxi deu origem à temocilina, que demonstra actividade contra bactérias de Gram negativo produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro, mas sem actividade contra *P. aeruginosa* (Sousa *et al.*, 2016).

## 2. Cefalosporinas

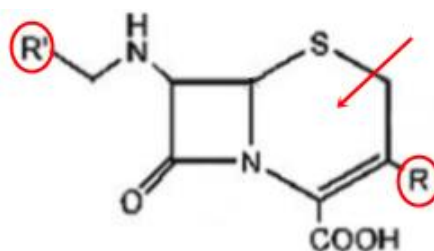
Questionando-se sobre o motivo pelo qual a febre tifóide era menos virulenta na sua cidade, e após diversas hipóteses descartadas, o italiano Giuseppe Brotzu decide, em 1945, analisar uma amostra de água dos esgotos que drenavam para uma baía onde, apesar de muitos jovens nadarem regularmente, não existiam relatos de febre tifóide associada aos banhos. Como resultado, isola um fungo produtor de uma substância eficaz contra bactérias de Gram negativo (a *Salmonella* spp., como todas as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria de Gram negativo), denominado *Cephalosporium acremonium* (actualmente conhecido por *Acremonium chrysogenum*). Contudo, não dispunha de meios para continuar os seus estudos e decide enviar a cultura do fungo e uma cópia dos seus resultados para Oxford (Muñiz *et al.*, 2007).

O primeiro antibiótico a ser detectado, purificado por Burton e Abraham, foi designado cefalosporina P. Esta só exibia actividade em bactérias de Gram positivo, ficando excluída a hipótese de se tratar do mesmo composto originalmente descrito por Brotzu. Contudo, na fase aquosa remanescente da extracção anterior encontrou-se uma nova substância. Esta foi denominada cefalosporina N (ou penicilina N, devido às semelhanças estruturais), pois demonstrava-se activa contra bactérias de Gram negativo (além de alguma actividade contra bactérias de Gram positivo) consistindo, indubitavelmente, na mesma substância isolada por Brotzu (Abraham, 1987). Mais tarde, em 1953, durante a realização de estudos sobre a natureza química da cefalosporina, Guy Newton e Edward Abraham descobrem, nos caldos de cultura de *Cephalosporium acremonium*, um segundo antibiótico hidrofílico com alargado espectro de actividade, o qual designaram de cefalosporina C. É através desta que se obtém o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), representado na Figura 24 e precursor de diversas cefalosporinas semi-sintéticas (Muñiz *et al.*, 2007).



**Figura 24:** Estrutura química do 7-ACA. Obtido através da cefalosporina C, por acção de amidases (adaptado de Conti *et al.*, 2015).

As cefalosporinas, ao contrário do que se verifica nas penicilinas, apresentam dois radicais principais,  $R_1$  e  $R_2$  (Figura 25), permitindo a síntese de uma grande variedade de moléculas com diferentes propriedades farmacocinéticas e espectros de actividade, sucessivamente classificadas por gerações e respectivas particularidades. Alterações no radical  $R_1$  influenciam, geralmente, o espectro de actividade antibacteriana, enquanto alterações em  $R_2$  intervêm, maioritariamente, nas propriedades farmacocinéticas. Por exemplo, a presença de radicais inorgânicos em  $R_2$  restringe certas cefalosporinas de 1ª geração a um uso por via oral, enquanto a presença de radicais orgânicos nessa mesma posição permite que sejam usadas por via parentérica (Marshall e Blair, 1999; Sousa *et al.*, 2016). Além disso, o facto de a cefalosporina C apresentar uma toxicidade comparável à da penicilina mantendo, ainda assim, a capacidade de exercer a sua actividade na presença de  $\beta$ -lactamases estafilocócicas tornava a sua exploração bastante desejável (Abraham, 1987).



**Figura 25:** Estrutura química básica das cefalosporinas (em destaque os dois radicais R e o núcleo cephem) (adaptado de Harrison e Bratcher, 2008).

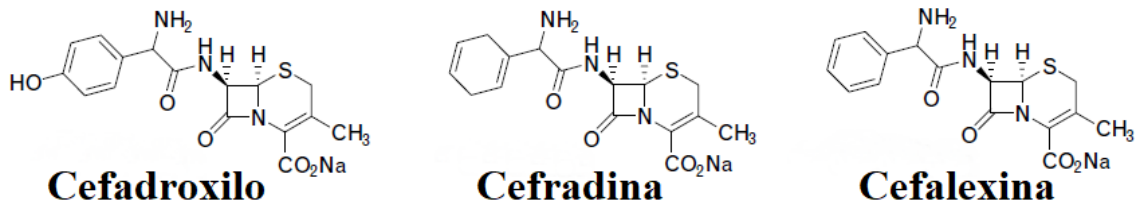
### **i. Cefalosporinas de 1ª geração**

A analogia com as penicilinas naturais era, por vezes, bastante frutífera na busca por cefalosporinas com importância clínica. Tendo em conta que a actividade da benzilpenicilina era muito superior à verificada na penicilina N (pelo menos contra bactérias de Gram positivo), era expectável que a ligação ao 7-ACA por uma cadeia lateral semelhante à encontrada na benzilpenicilina originasse cefalosporinas mais activas. Adicionalmente, visto que a cefalosporina C era resistente à hidrólise por  $\beta$ -lactamases estafilocócicas apesar de, na sua estrutura, possuir a mesma cadeia lateral N-acil encontrada na penicilina N (susceptível à hidrólise), era de esperar que a sua estabilidade estivesse associada ao núcleo. Seria, então, provável que as cefalosporinas, independentemente das diferenças nas cadeias laterais, partilhassem esta característica (Abraham, 1987).

Essas expectativas confirmaram-se, na década de 1960, pela cefalotina, a primeira cefalosporina com uso clínico extensivo. Seguiu-se a cefaloridina, onde o grupo acetoxi da cefalotina, presente em C-3, foi substituído por um grupo piridina, mais estável contra esterases, com o objectivo de impedir a conversão desta na menos activa desacetilcefalotina. A cefaloridina também se revelou menos dolorosa que a cefalotina quando administrada por via intramuscular. Contudo, estas vantagens acarretaram custos, nomeadamente, uma menor resistência contra  $\beta$ -lactamases estafilocócicas e uma tendência para a nefrotoxicidade em doses elevadas. Ainda assim, a presença de um grupo estável contra esterases em C-3 foi uma prática comum nas cefalosporinas semi-sintéticas subsequentes, como é o caso da cefazolina (Abraham, 1987; Marshall e Blair, 1999).

No entanto, a lógica da analogia estrutural e respectivas propriedades não se verificou quando se tentou assemelhar as anteriores cefalosporinas C à penicilina V (bem absorvida intestinalmente). Foi a cefalexina, com um grupo D- $\alpha$ -aminobenzil na sua cadeia lateral (como também se verifica na ampicilina) e um grupo metil em substituição do grupo acetoximetil em C-3, a primeira a obter resultados clínicos, apresentando uma elevada concentração sanguínea quando administrada oralmente. Seguiram-se a cefradina e o cefradoxilo (Figura 26). Estas cefalosporinas demonstravam grande actividade contra

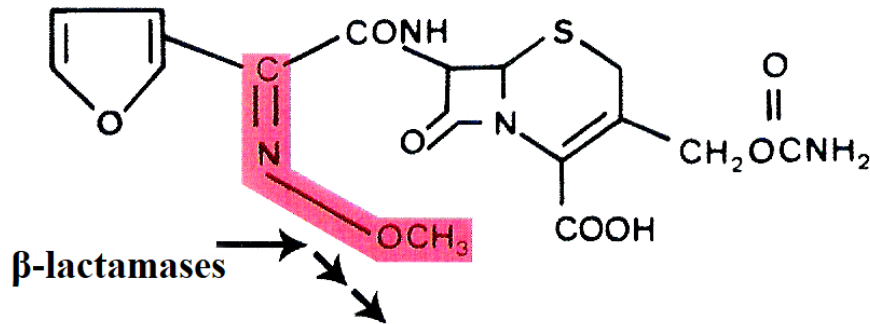
inúmeras bactérias de Gram positivo, como estafilococos, para além de uma actividade moderada contra algumas bactérias de Gram negativo (Abraham, 1987).



**Figura 26:** Exemplos de cefalosporinas de 1<sup>a</sup> geração (adaptado de Perez-Inestrosa *et al.*, 2005).

## ii. Cefalosporinas de 2<sup>a</sup> geração

Na década de 1970, face à crescente necessidade de encontrar alternativas mais eficazes perante infecções por bactérias de Gram negativo, foram sintetizadas novas cefalosporinas com actividade contra bactérias que demonstravam resistência às suas antecessoras (Abraham, 1987). Apesar de apresentarem uma menor actividade face a bactérias de Gram positivo (tendência que, em geral, se vai verificando ao longo das sucessivas gerações), devido à menor afinidade para as suas PBPs, as cefalosporinas de 2<sup>a</sup> geração exibem grande diversidade de espectro de acção antibacteriana sobre bactérias de Gram negativo, o que se deve à estrutura química dos radicais R<sub>2</sub> presentes nas diversas moléculas. A presença de grupos amina nesta posição (cefaclor, cefeprozil) permite uma melhor difusão através dos canais porina na membrana externa bacteriana. Na posição 7- $\alpha$ , a presença de um grupo metoximino (C=NOCH<sub>3</sub>), como se verifica na cefuroxima (Figura 27), protege estericamente o anel  $\beta$ -lactâmico da degradação por  $\beta$ -lactamases plasmídicas de estreito espectro (por exemplo, penicilases TEM-1). As cefamicinas (cefóxitina e cefotetan) com um grupo  $\alpha$ -metoxi na posição 7- $\alpha$  apresentam, por isso, boa actividade contra anaeróbios estritos e contra *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Abraham, 1987; Sousa *et al.*, 2016).

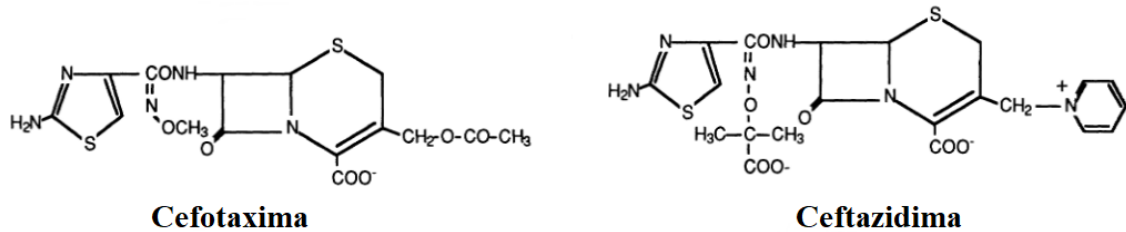


**Figura 27:** Protecção do anel  $\beta$ -lactâmico da acção das  $\beta$ -lactamases por impedimento estérico numa cefalosporina de 2ª geração (cefuroxima) (adaptado de Sousa *et al.*, 2016).

### iii. Cefalosporinas de 3ª geração

Diversos compostos, providos de um espectro de actividade mais alargado contra bactérias de Gram negativo, foram sintetizados no final da década de 1970. Esta característica surgiu, provavelmente, devido à combinação de determinados factores, tais como a elevada resistência a  $\beta$ -lactamases, a capacidade de penetrar o envelope celular e a grande afinidade para enzimas alvo na membrana da célula. O aumento de actividade contra bactérias de Gram negativo em algumas destas cefalosporinas (cefotaxima, cefmenoxina, ceftizoxima e ceftazidima) pode ser atribuído à sua cadeia lateral N-acil, produzida por engano durante a tentativa de síntese de 7- $\beta$ -cetoacilaminocefalosporina (Abraham, 1987). A introdução da referida cadeia (grupo metoximino no carbono 7- $\beta$ ) aumentou a resistência destas moléculas a algumas  $\beta$ -lactamases, excepto frente a ESBLs, AmpC (cefalosporinase codificada cromossomicamente) e carbapenemases. As cefalosporinas de 3ª geração (Figura 28) são activas contra a maioria das estirpes de Gram negativo resistentes às cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, sendo que a ceftazidima e a cefoperazona são as únicas com actividade contra *P. aeruginosa*. O radical metiltiotetrazol da cefoperazona (também presente na cefalosporina de 2ª geração cefamandol) causa o efeito dissulfiram quando esta é administrada a pacientes que ingerem álcool. O antibiótico moxalactama (1-oxa- $\beta$ -lactama) apresenta um átomo de oxigénio em vez de enxofre no seu anel dihidrotiazina, à semelhança das cefalosporinas, o que lhe confere actividade contra *Pseudomonas spp.* e *Bacteroides fragilis*. De salientar que, apesar da baixa actividade contra bactérias de Gram positivo, as cefalosporinas de 3ª

geração (excepto ceftazidima) possuem actividade contra *S. aureus* susceptíveis à meticilina (MSSA, do inglês “*Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*”) e que, a maioria delas, são destinadas à administração parentérica, salvo algumas excepções, administradas por via oral (Sousa *et al.*, 2016).



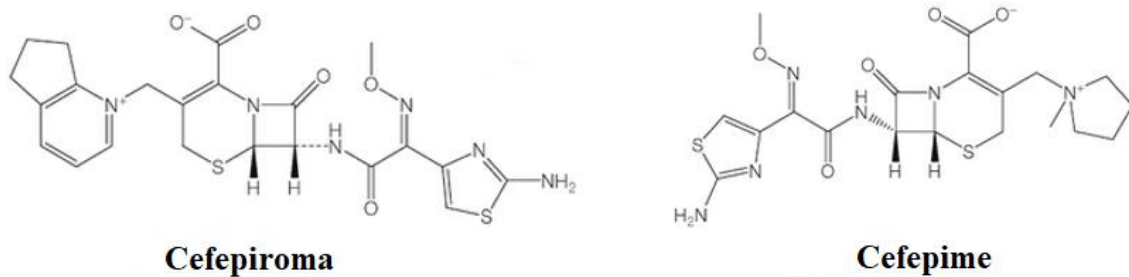
**Figura 28:** Exemplos de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração (adaptado de Sanders, 1993).

#### iv. Cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração

As cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração possuem uma actividade antibacteriana comparável às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração, actuando contra bactérias de Gram negativo mas sendo, no entanto, mais estáveis a  $\beta$ -lactamases AmpC (Sousa *et al.*, 2016). Para além de serem compostos iónicos bipolares, a cefepime e a cefepirona apresentam, na posição C-3, um radical amónio quaternário carregado positivamente, tornando-as moléculas zwitteriónica (anfotéricas) e facilitando, assim, a sua difusão através das OMPs na membrana externa das bactérias de Gram negativo, conferindo-lhes boa actividade contra as mesmas, incluindo *P. aeruginosa*. As cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração são usadas no tratamento de infecções moderadas a severas, sendo antibióticos de uso exclusivamente hospitalar (Fung-Tomc, 1997; Sousa *et al.*, 2016).

Estudos *in vitro* indicam que o desenvolvimento de resistência a cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração é mais lento do que o verificado em cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração. Esta resistência é, geralmente, uma combinação de hiperprodução de  $\beta$ -lactamases cromossomais, aquisição de ESBLs mediada por plasmídeos e deficiências nas OMPs (Fung-Tomc, 1997). Tendo em conta que as cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração (Figura 29) partilham das características das oximinocefalosporinas de 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração, depreende-se que não escapam à hidrólise por ESBLs e carbapenemases. À semelhança das outras

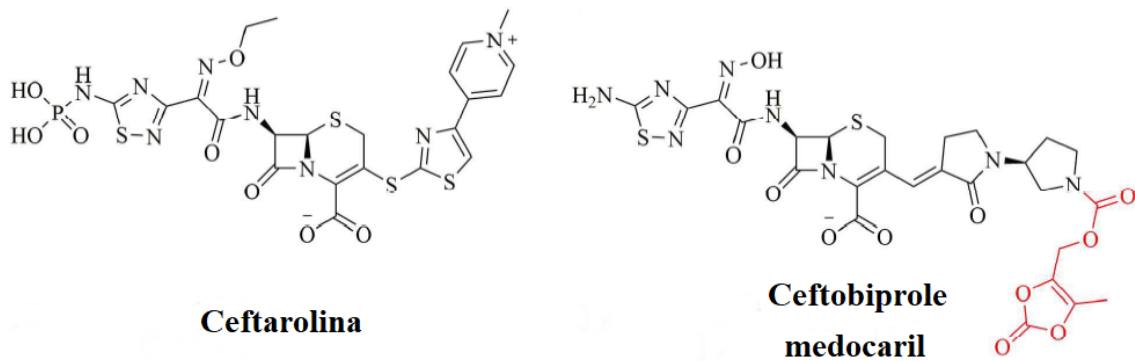
cefalosporinas, também não possuem actividade contra MRSA, *Enterococcus* spp. e grande parte das bactérias de Gram positivo. O facto de não serem indutoras da produção de cefalosporinas ( $\beta$ -lactamases do tipo AmpC) permite que as cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração possuam melhor actividade contra as espécies que produzam naturalmente as mesmas (apenas não actuam no caso de estirpes detentoras do gene *bla*AmpC desreprimido ou em plasmídeos)(Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 29:** Exemplos de cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração (adaptado de Grayson *et al.*, 2010).

#### v. Cefalosporinas de 5<sup>a</sup> geração

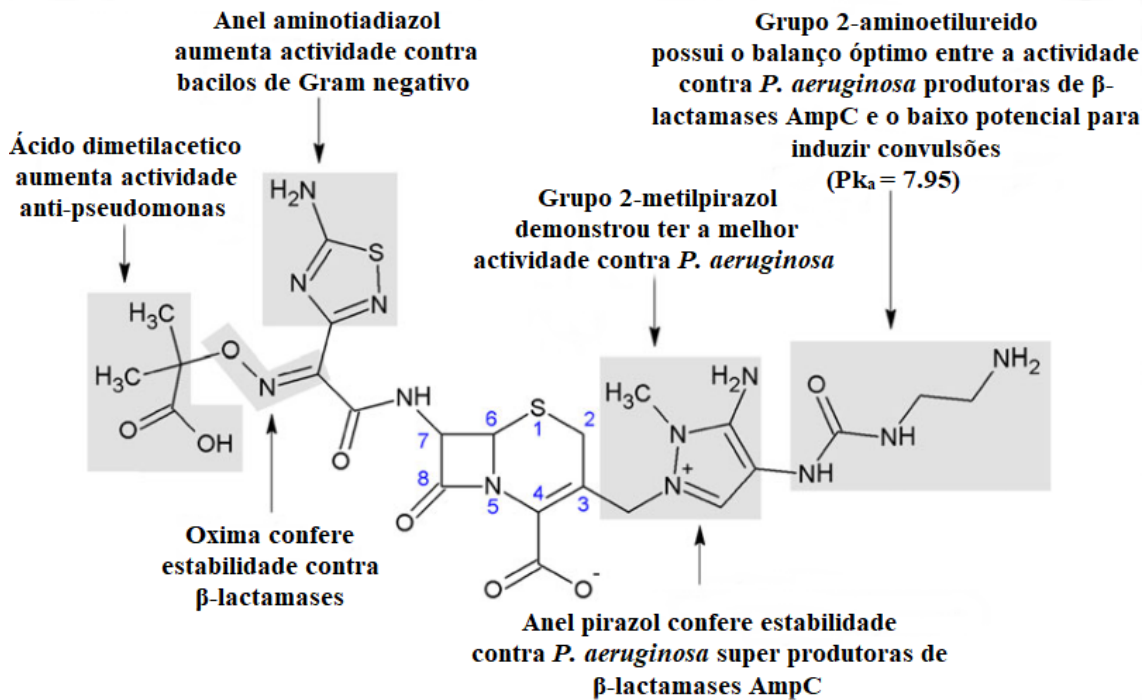
Duas novas cefalosporinas foram, recentemente, introduzidas no armamento terapêutico: ceftarolina e ceftobiprole (Figura 30). Estas apresentam uma grande afinidade para a PBP2a de MRSA, sendo também mais activas que penicilina, cefotaxima e ceftriaxona contra estirpes de *Streptococcus pneumoniae* MDR. (Moisan *et al.*, 2010). A responsabilidade pela actividade anti-MRSA deve-se ao anel 1,3-tiazol ligado ao núcleo na posição 3 e ao grupo oximino em C7, sendo de destacar o alargado espectro de actividade contra bactérias de Gram positivo quando comparadas com as restantes cefalosporinas conhecidas (Laudano, 2011). Por outro lado, a actividade contra bactérias de Gram negativo é semelhante à das oximinocefalosporinas de outras gerações, sendo inactivadas por  $\beta$ -lactamases plasmídicas de largo espectro e carbapenemases, para além de não apresentarem actividade contra estirpes desreprimidas na produção de  $\beta$ -lactamases AmpC ou produtoras de AmpC plasmídicas. De modo a expandir a actividade da ceftarolina contra estirpes de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs encontra-se actualmente em estudo a sua associação ao avibactam, um inibidor de serina- $\beta$ -lactamases sem estrutura  $\beta$ -lactâmica (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 30:** Estrutura química da ceftarolina e do pró-fármaco ceftobiprole medocaril (porção do pró-fármaco em destaque) (adaptado de Jones *et al.*, 2016).

#### vi. Cefalosporinas em estudo

A emergência de resistências bacterianas em patogênicos comuns tem-se tornado um assunto de extrema importância na prática clínica, especialmente em bactérias de Gram negativo, como *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e *P. aeruginosa*, devido à elevada morbidade e mortalidade associadas a estas infecções. No entanto, a quantidade de novos produtos antimicrobianos em desenvolvimento parece ser limitado. A nova oximinocefalosporina em estudo, denominada ceftolozane, demonstra uma elevada actividade contra *P. aeruginosa* MDR e *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs ou AmpC, principalmente quando associada ao tazobactam, um inibidor de  $\beta$ -lactamases que potencia a sua acção, sugerindo que se trata de uma potencial associação no combate a infecções por bactérias de Gram negativo de difícil tratamento (Craig e Andes, 2013; Miller *et al.*, 2012). O ceftolozane demonstra ainda um baixo potencial para induzir convulsões, ao contrário do que se verifica com o FK518, o seu antecessor sintético que, apesar de apresentar uma grande actividade anti-pseudomonas, também confere um elevado potencial de induzir convulsões em ratinhos. Assim, o ceftolozane (Figura 31) possui um equilíbrio ideal entre a actividade contra bactérias *P. aeruginosa* produtoras de  $\beta$ -lactamases AmpC e, simultaneamente, o mais baixo potencial de indução de convulsões, mesmo quando comparado com ceftazidima e cefepime (Zhanel *et al.*, 2014).

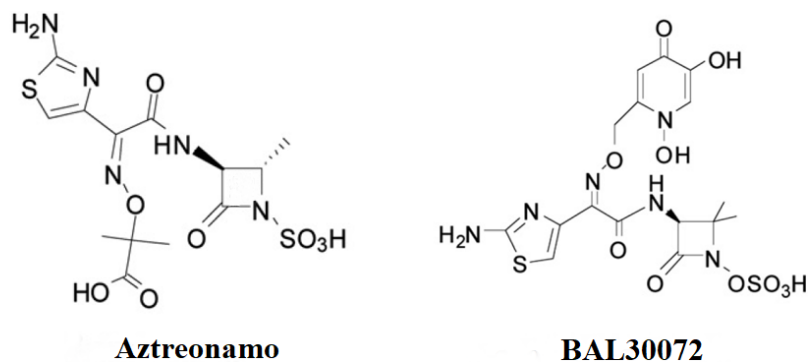


**Figura 31:** Relação estrutura-actividade do cefzolozane, uma nova cefalosporina em estudo (adaptado de Zhanel *et al.*, 2014).

A aquisição de genes de ESBLs que induzem a inactivação das oximinocefalosporinas da 2<sup>a</sup> à 5<sup>a</sup> geração originou uma grande utilização terapêutica dos β-lactâmicos carbapenemos. Estes, por sua vez, conduziram à selecção de isolados clínicos bacterianos produtores de β-lactamases carbapenemases (inactivadoras de praticamente todos os β-lactâmicos). A solução tem passado pela criação de novos inibidores de β-lactamases com uma estrutura química não β-lactâmica (por exemplo, o já referido avibactam) que serão utilizados na terapêutica em associação com as oximinocefalosporinas de 3<sup>a</sup> à 5<sup>a</sup> geração. A associação de ceftazidima com avibactam revelou-se auspiciosa, revelando forte actividade contra estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs e AmpC, sendo que estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de AmpC, resistentes à ceftazidima em monoterapia, também manifestaram susceptibilidade à associação de ceftazidima com avibactam (Sousa *et al.*, 2016).

### 3. Monobactâmicos

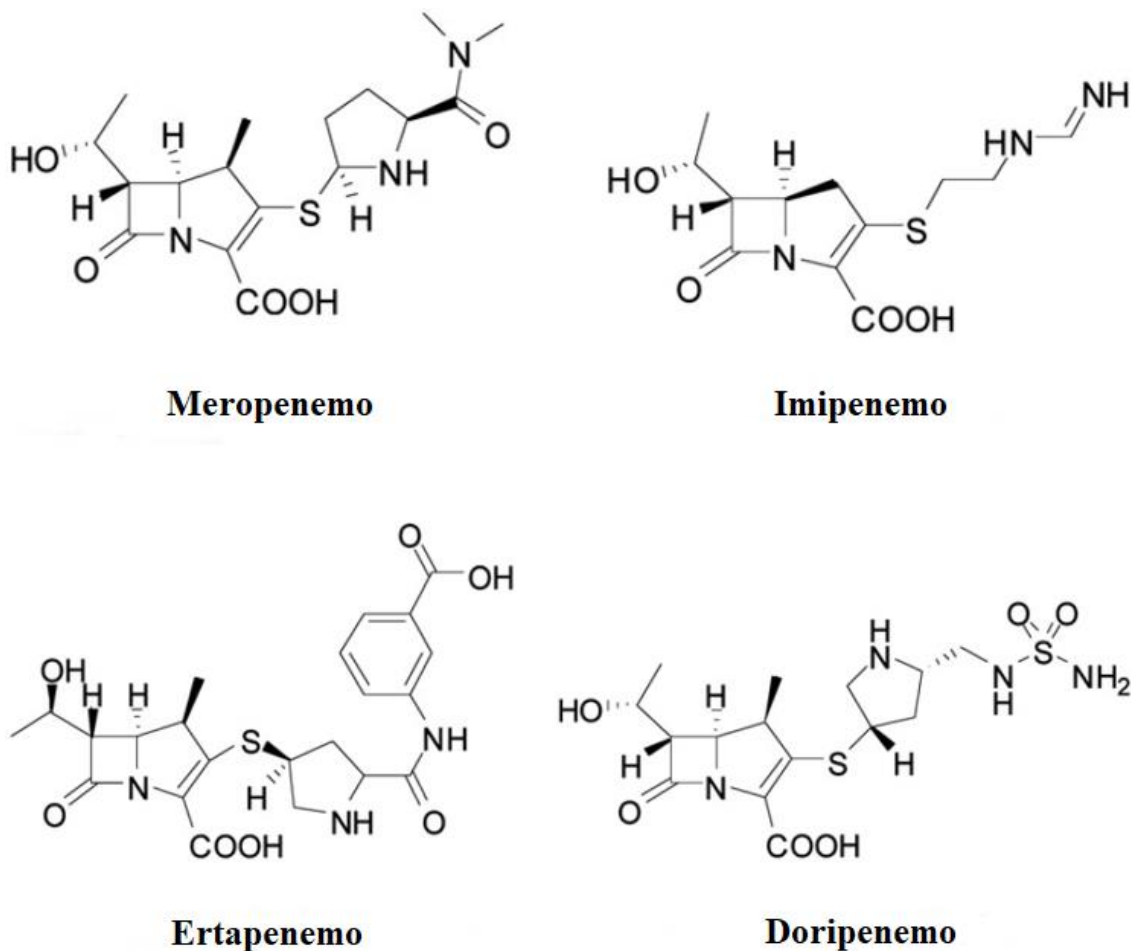
Os monobactamos (Figura 32) são uma nova classe de  $\beta$ -lactâmicos caracterizados por apresentarem, na sua estrutura, um anel  $\beta$ -lactâmico monocíclico (em oposição às penicilinas e cefalosporinas, que apresentam uma estrutura bicíclica). O único monobactamo usado na terapêutica é o aztreonamo, que possui um ácido sulfônico no nitrogênio da posição N-1 responsável por activar o anel  $\beta$ -lactâmico e, assim, auxiliar na acetilação das TP's responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana. Apesar de não demonstrar actividade contra bactérias de Gram positivo e anaeróbias estritas, o aztreonamo é bastante activo contra a maioria das bactéria de Gram negativo aeróbias, incluindo *P. aeruginosa*, apresentando um espectro de actividade comparável às cefalosporinas de 3ª geração e à gentamicina, sendo também resistentes a algumas  $\beta$ -lactamases, excepto a ESBLs (Hellinger e Brewer, 1999). Detem ainda a particularidade de ser activo contra bactérias produtoras de metalocarbapenemases, também denominadas metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs). Além dos monobactamos, também as nocardicinas pertencem à classe dos  $\beta$ -lactâmicos monocíclicos dotados de actividade antibacteriana. Porém, não são utilizadas na terapêutica. Em estudo encontra-se a associação do avibactam ao aztreonamo, para além da síntese de novas moléculas estruturalmente semelhantes a este último, como é o caso do monosulfactam (presentemente designado BAL30072) que, quando associado ao meropenemo, apresenta boa actividade contra *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacteriaceae* produtoras de MBLs e *Acinetobacter* spp. não produtoras de determinadas oxacilinas (OXAs), nomeadamente a OXA-58 (Drawz *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 32:** Estrutura química do aztreonamo, o único monobactamo utilizado na terapêutica, e do BAL30072 (adaptado de Drawz e Bonomo, 2010).

#### 4. Carbapenemos

Os carbapenemos fazem parte da “última linha de defesa” contra patogénicos MDR. Um número crescente de evidências sugere que os carbapenemos são eficazes não só pelo seu espectro alargado de actividade antibacteriana mas também pelos seus múltiplos mecanismos de inibição das  $\beta$ -lactamases. Meropenemo, imipenemo, ertapenemo e doripenemo (Figura 33) são, não raras vezes, reservados às infecções por Gram negativo de mais difícil tratamento, sendo também bastante eficazes contra bactérias de Gram positivo (Drawz e Bonomo, 2010). Actuam como “substratos lentos”, possuindo uma grande afinidade para as TP e CPs bacterianas responsáveis pela síntese da parede celular baseada em peptidoglicano (Watkins *et al.*, 2013).



**Figura 33:** Exemplos de carbapenemos actualmente utilizados na terapêutica (adaptado de Drawz e Bonomo, 2010).

Estudos conduzidos nos primeiros carbapenemos demonstram que o átomo de carbono presente em C-1 (no lugar do átomo de S) desempenha um papel importante na potência e espectro dos mesmos, para além de influenciar a sua estabilidade contra as  $\beta$ -lactamases. Sabe-se também que a potência e a estabilidade destes são auxiliadas pelo grupo hidroxietil com configuração *R*, estrategicamente posicionado na cadeia lateral R<sub>2</sub> (C-8), e pela configuração *trans* em C-5 e C-6. Carbapenemos com um grupo pirrolidina em R<sub>1</sub>, juntamente com outras aminas cíclicas, possuem um espectro antimicrobiano mais alargado (Bonfiglio *et al.*, 2002; Papp-Wallace *et al.*, 2011).

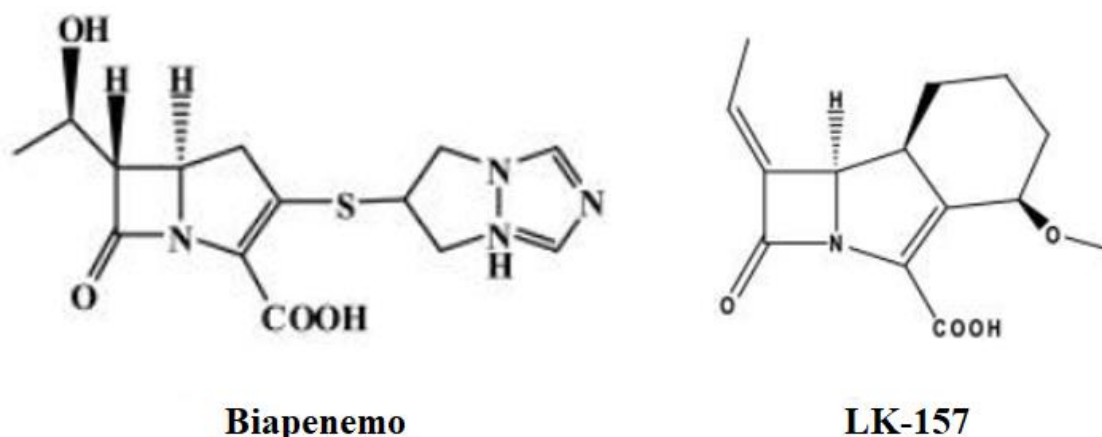
Estes antibióticos apresentam um largo espectro de actividade devido a um vasto conjunto de factores, tais como a sua excelente penetração através dos canais de porina específicos, a sua boa estabilidade frente a diversas  $\beta$ -lactamases, o facto de se tratarem de moléculas zwitteriónicas e a capacidade que possuem de efectuar uma forte ligação a PBPs essenciais. Resistem à hidrólise por parte da maioria das  $\beta$ -lactamases da classe A, C e D de Ambler sendo, no entanto, inactivadas por serino- e metalo- $\beta$ -lactamases, designadas carbapenemases (classe A e B de Ambler). Aliás, à excepção do aztreonamo, nenhum antibiótico  $\beta$ -lactâmico inibe as MBLs, nem mesmo os novos inibidores de  $\beta$ -lactamases, o que constitui um problema global de saúde pública. As MBLs estão munidas da capacidade de se disseminarem rapidamente para outras estirpes através de elementos genéticos móveis, como se verificou com as estirpes de *E. coli* produtoras de NDM-1 (do inglês *New Dheli Metallo carbapenemases*) (Sousa *et al.*, 2016).

O imipenemo inactiva as PBP1a, PBP1b e PBP2, demonstrando uma rápida acção bacteriolítica em *E. coli*, sem prévia filamentação celular, dada a sua reduzida afinidade para as PBP3 (tal como a ceftazidima). Assim, evita a libertação de endotoxinas (LPS) em tratamentos por infecções de Gram negativo, não agravando a endotoxemia durante o tratamento, como já referido anteriormente (Sousa *et al.*, 2016). Apesar do alargado espectro de actividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias de Gram positivo e negativo, os carbapenemos não apresentam actividade contra VRE, MRSA, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* e *Clostridium difficile*. Em *P. aeruginosa* a acção difere, pois o ertapenemo não apresenta actividade contra esta estirpe, contrariamente ao imipenemo, meropenemo e doripenemo. Este último demonstra propriedades

semelhantes às do meropenemo, apesar de a sua actividade *in vitro* contra *P. aeruginosa* aparentar ser mais potente (Zhanel *et al.*, 2007).

Novos carbapenemos estão em vias de ser introduzidos na prática clínica com o objectivo de serem utilizados isoladamente ou em associação com inibidores de  $\beta$ -lactamases, encontrando-se nas fases finais de ensaios clínicos (Figura 34). É o caso do faropenemo, do biapenemo (e do biapenemo associado ao vaborbactam), do razupenemo e do imipenemo associado a MK-7655. O biapenemo é dotado de características farmacodinâmicas capazes de o fazer atingir elevadas concentrações nos pulmões, tornando-o uma boa escolha para o tratamento de infecções pulmonares (apresenta, no entanto, as limitações dos carbapenemos contra as infecções por estirpes produtoras de carbapenemases, estando em estudo a sua associação ao inibidor de  $\beta$ -lactamases vaborbactam, de modo a aumentar o seu espectro de actividade). Também em fase de estudo, o razupenemo é um metil-carbapenemo com novas características não observadas nos outros carbapenemos, revelando boa actividade contra MRSA e *E. faecium*, dada a sua elevada afinidade para as PBP2a e PBP5 (perdeu, ainda assim, algumas características, como a actividade contra *P. aeruginosa*, parecendo também mais vulnerável que o imipenemo ou ertapenemo contra bactérias desreprimidas na produção de AmpC) sendo, à semelhança dos outros carbapenemos, susceptível às carbapenemases (Sousa *et al.*, 2016; Watkins *et al.*, 2013).

Em estudo encontra-se também o LK-157, um novo carbapenemo tricíclico capaz de restaurar a eficácia dos  $\beta$ -lactâmicos contra inúmeras estirpes bacterianas de Gram negativo produtoras de ESBLs da classe A de Ambler, excluindo cefotaximase (CTX-M) e KPC (do inglês “*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*”), bem como  $\beta$ -lactamases da classe C, apresentando ainda uma absorção oral apreciável (Watkins *et al.*, 2013).

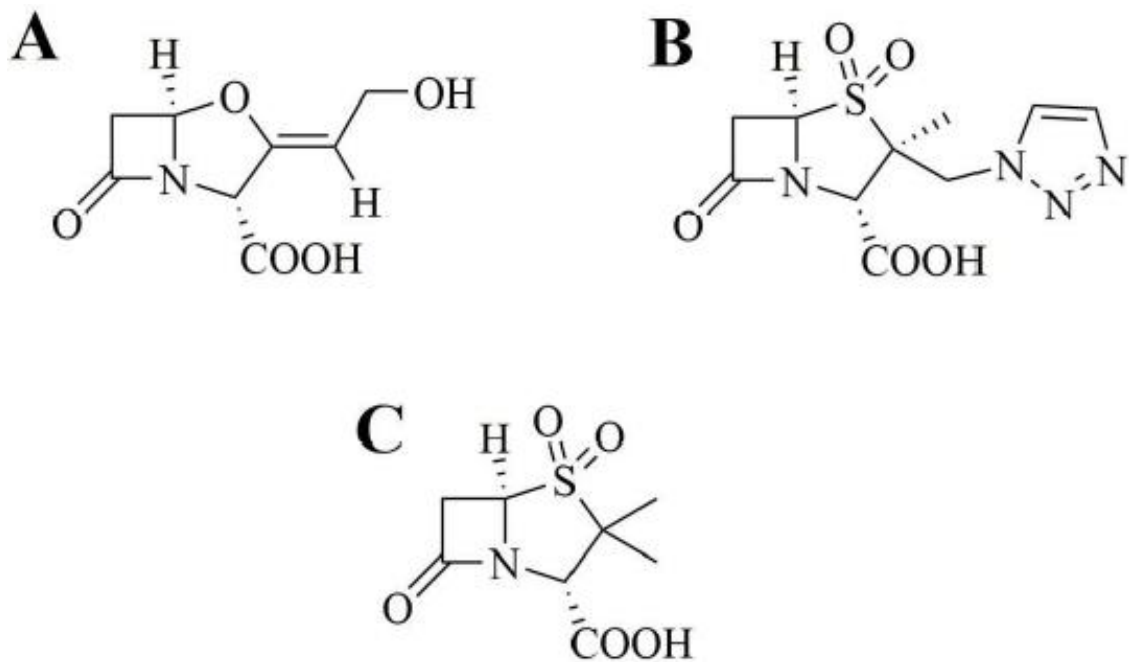


**Figura 34:** Estrutura química de alguns dos carbapenemos em estudo, nomeadamente o biapenemo e, com estrutura tricíclica, o LK-157 (adaptado de Papp-Wallace *et al.*, 2011).

Recentemente, constatou-se que os compostos do tipo captopril (utilizados como anti-hipertensores) inibem várias MBLs, incluindo a NDM-1. Estes compostos de tiol possuem uma forte acção quelante sobre os iões  $Zn^{++}$ , presentes no centro activo das MBLs inactivando, assim, as mesmas (Sousa *et al.*, 2016).

### 5. Inibidores de $\beta$ -lactamases com estrutura $\beta$ -lactâmica

De modo a contrariar a pouca eficácia terapêutica revelada pelas aminopenicilinas face à hidrólise provocada pelas  $\beta$ -lactamases produzidas por diversas espécies bacterianas, a indústria focou-se na pesquisa de compostos capazes de bloquear a acção das mesmas. Assim, foram criadas moléculas  $\beta$ -lactâmicas desprovidas de actividade antimicrobiana, mas com a peculiaridade de se ligarem quimicamente às  $\beta$ -lactamases, inibindo irreversivelmente a sua acção hidrolítica (Figura 35). O tratamento das infecções utilizando a associação destes inibidores com aminopenicilinas ou cefalosporinas permite que estas recuperem a sua actividade antibacteriana perante estirpes produtoras de determinadas  $\beta$ -lactamases plasmídicas. Estas são bloqueadas pelo inibidor permitindo, assim, que a penicilina ou cefalosporina usada em associação permaneça apta para exercer a sua actividade bactericida sobre a bactéria. O ácido clavulânico, tal como outros inibidores de  $\beta$ -lactamases posteriormente descobertos, como o sulbactam e o tazobactam, possui uma estrutura química bicíclica com um anel  $\beta$ -lactâmico e um anel oxazolidínico (Sousa *et al.*, 2016).



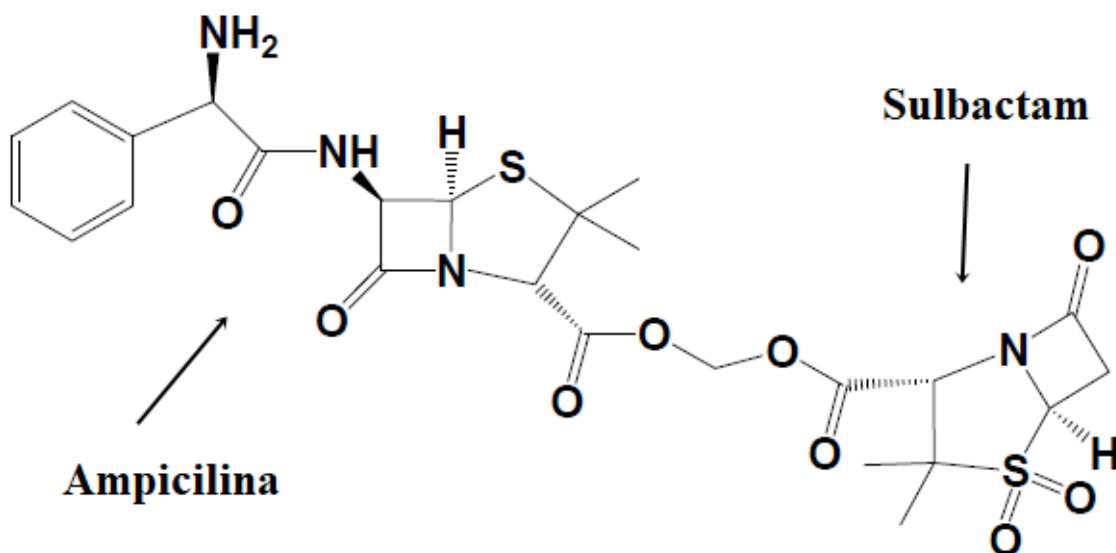
**Figura 35:** Inibidores de  $\beta$ -lactamases com estrutura  $\beta$ -lactâmica actualmente comercializados: A) Ácido clavulânico; B) Tazobactam; C) Sulbactam (retirado de Jones *et al.*, 2016).

O ácido clavulânico foi isolado a partir de *Streptomyces clavuligerus*, sendo um fraco inibidor das PBPs mas actuando, por outro lado, como inibidor irreversível de grande parte das  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler. Já o sulbactam e o tazobactam são sulfonas do ácido penicilânico. O primeiro inibe  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler, com excepção de KPC e IRT (do inglês “*Inhibitor-resistant TEM*”), tendo fraco efeito nas  $\beta$ -lactamases da classe C e não demonstrando qualquer acção nas da classe B nem na maioria das de classe D. O tazobactam inibe as  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler e ainda algumas da classe C e D. É importante destacar que nenhum dos inibidores com estrutura  $\beta$ -lactâmica inibe as carbapenemases. (Llarrull *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2016).

Os inibidores de  $\beta$ -lactamases com estrutura  $\beta$ -lactâmica são reconhecidos como substratos pelas  $\beta$ -lactamases da bactéria, ligando-se covalente e irreversivelmente ao grupo serina das mesmas (o que explica não inibirem  $\beta$ -lactamases da classe B, providas de um ião zinco e não de serina no local activo). Em seguida, a  $\beta$ -lactamase origina a abertura do anel  $\beta$ -lactâmico do inibidor, à qual não se segue a desacetilação. A regeneração cíclica do anel  $\beta$ -lactâmico do inibidor necessitaria de muita energia e, por

isso, não ocorre. São, portanto, considerados inibidores suicidas. (Page, 2000; Sousa *et al.*, 2016).

Na prática clínica, o ácido clavulânico tem sido associado à amoxicilina, ticarcilina e cefoperazona. O tazobactam é habitualmente utilizado em associação com a piperacilina. Já o sulbactam é um caso particular, uma vez que a sua associação envolve uma ligação covalente ao antibiótico  $\beta$ -lactâmico ampicilina, originando a sultamicilina (Figura 36), um pró-fármaco que é hidrolisado enzimaticamente no organismo humano libertando, posteriormente, as moléculas activas sulbactam e ampicilina (Llarrull *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2016). De salientar que o sulbactam, contrariamente ao que se verifica nos outros inibidores com estrutura  $\beta$ -lactâmica, possui actividade intrínseca contra *Acinetobacter baumannii* (Higgins *et al.*, 2004).



**Figura 36:** Estrutura química da sultamicilina (adaptado de Karaman, 2014).

À semelhança do que se tem vindo a verificar nos antibióticos, também os inibidores de  $\beta$ -lactamases estão a perder eficácia no tratamento de determinadas infecções. A título ilustrativo, têm sido identificadas estirpes bacterianas com resistência aos inibidores de  $\beta$ -lactamases por mutação em canais de porina que conduzem a uma redução da incorporação do inibidor na célula bacteriana impedindo, assim, a sua actividade inibitória. Também são conhecidos casos em que a ineficácia do inibidor foi originada por mutações nos genes *bla* das  $\beta$ -lactamases (por exemplo, mutações em *bla*TEM-1 que

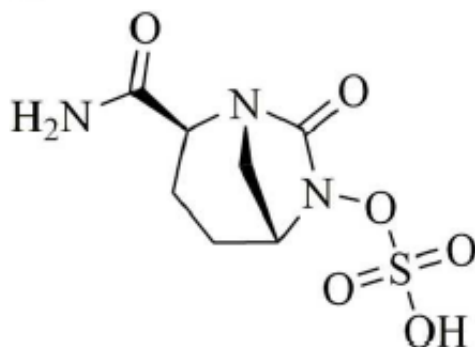
levam ao surgimento de  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler não inativadas pelo ácido clavulânico, como as IRT), tornando baixa a afinidade destas para a ligação ao inibidor. A associação entre o ácido clavulânico e a amoxicilina também não demonstra eficácia quando as estirpes são hiperprodutoras de  $\beta$ -lactamases TEM-1 (Sousa *et al.*, 2016).

## **6. Inibidores de $\beta$ -lactamases sem estrutura $\beta$ -lactâmica**

Apesar de não possuírem estrutura  $\beta$ -lactâmica, estes inibidores de  $\beta$ -lactamases também auxiliam a acção dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, detendo a capacidade de acetilar covalentemente o alvo serina das mesmas, nomeadamente as  $\beta$ -lactamases de classe A, C e algumas da classe D de Ambler. Os inibidores de  $\beta$ -lactamases sem estrutura  $\beta$ -lactâmica possuem um espectro de actividade superior ao dos inibidores com estrutura  $\beta$ -lactâmica, o que os torna promissores no controlo de infecções provocadas por bactérias de Gram negativo produtoras de ESBLs que, por sua vez, se revelam cada vez mais difíceis de combater. Entre estes novos compostos, ainda em estudo, destacam-se o já referido avibactam, o relebactam (MK-7655) e o vaborbactam (RPX7009) (Bush, 2015; Jones *et al.*, 2016).

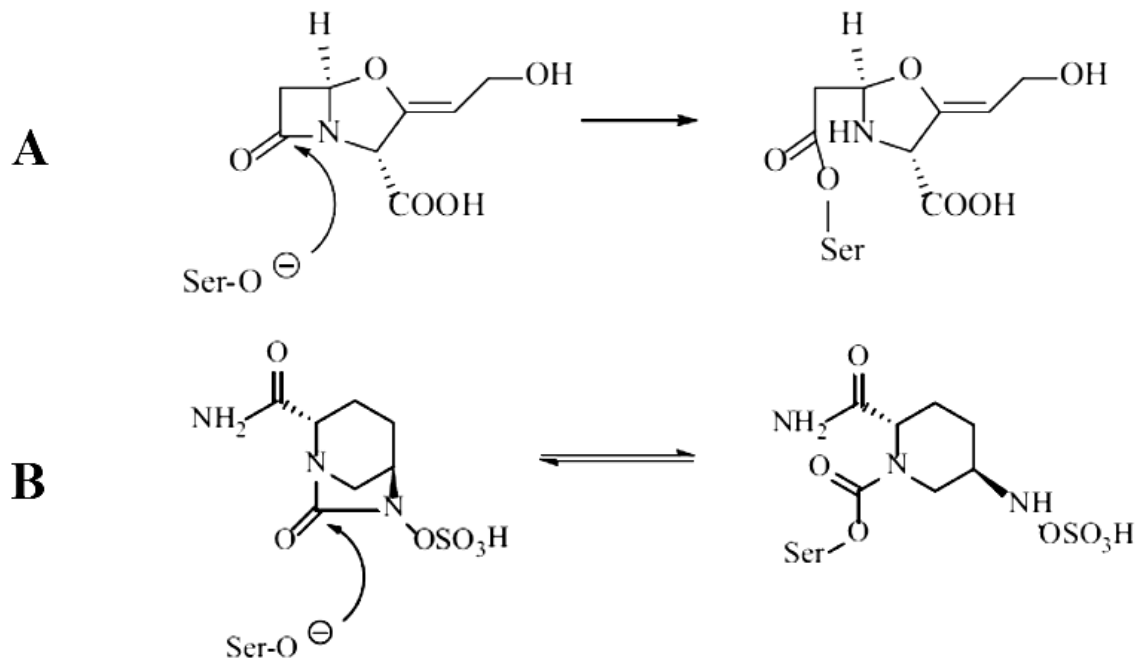
### **i. Avibactam**

O avibactam é um inibidor de  $\beta$ -lactamases pertencente à nova classe dos diazabicycloctanos, não possuindo o típico anel  $\beta$ -lactâmico (Figura 37). Tal como se verifica nos outros inibidores de  $\beta$ -lactamases, a actividade intrínseca do avibactam contra bactérias é bastante reduzida. No entanto, a sua associação com ceftazidima inibe as  $\beta$ -lactamases de classe A (TEM, SHV, KPC e CTX-M), classe C e também algumas de classe D (OXA) de Ambler. Combate ainda os mecanismos de resistência de *Pseudomonas* spp. a cefalosporinas anti-pseudomonas, tanto as hiperprodutoras de  $\beta$ -lactamases AmpC cromossomais como as que expressam ESBLs adquiridas. Apesar de serem inibidores reversíveis, possuem uma reduzida velocidade de desacetilação devido às suas múltiplas ligações de hidrogénio ao centro activo das  $\beta$ -lactamases, o que aumenta o seu tempo de residência e lhes confere a capacidade de inibir as mesmas por bastante tempo, tornando assim possível a actuação dos antibióticos a si associados (Bush, 2015; Jones *et al.*, 2016; Toussaint e Gallagher, 2015).



**Figura 37:** Estrutura química do avibactam (adaptado de Jones *et al.*, 2016).

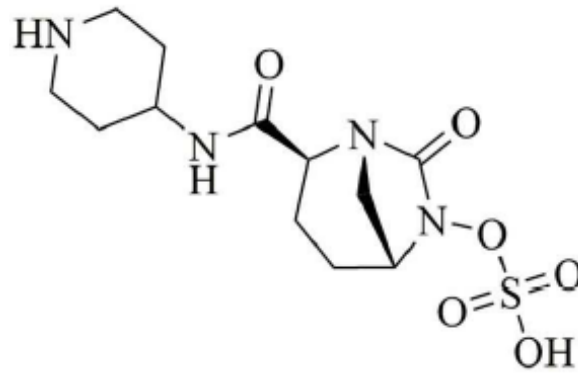
As relações estruturais entre  $\beta$ -lactamases e PBPs sugerem que o avibactam pode ligar-se directamente a estes. Ensaio *in vitro* revelaram que o avibactam possui afinidade para as PBP2 de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *S. aureus*, tal como para as PBP3 de *S. pneumoniae*. O avibactam é também um fraco indutor de AmpC cromossómicas, revelando um potencial de aplicação terapêutica bastante versátil no campo das infecções causadas por bactérias de Gram negativo. No entanto, é incapaz de inibir as MBLs, um tipo de  $\beta$ -lactamase com capacidade para inactivar praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos e cuja prevalência tem vindo a aumentar de forma alarmante. Para além da já referida associação com a ceftazidima, também se encontra em estudo a associação de avibactam com ceftarolina e aztreonamo (fase II dos ensaios clínicos na Europa), aumentando o espectro de actividade destes  $\beta$ -lactâmicos. A ceftazidima e a ceftarolina são ineficazes contra estirpes bacterianas de Gram negativo produtoras de ESBLs e outras  $\beta$ -lactamases recuperando, no entanto, a sua actividade antibacteriana quando associadas ao avibactam. Já os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* da associação de aztreonamo com avibactam parecem solucionar um dos problemas mais alarmantes das infecções por bactérias de Gram negativo MDR (por exemplo, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, excepto as produtoras de OXAs da classe D), nomeadamente as co-produtoras de MBLs e ESBLs. De salientar ainda que, como referido anteriormente, o avibactam é um inibidor reversível (Figura 38), ao contrário dos inibidores com estrutura  $\beta$ -lactâmica, que são considerados inibidores suicidas (Sousa *et al.*, 2016).



**Figura 38:** A) Acetilação de  $\beta$ -lactamase de classe A pelo mecanismo geral de inibição de um inibidor de  $\beta$ -lactamases (neste caso, o ácido clavulânico); B) Mecanismo hipotético de acetilação e regeneração do avibactam numa  $\beta$ -lactamase de classe A (adaptado de Drawz *et al.*, 2014).

## ii. Relebactam

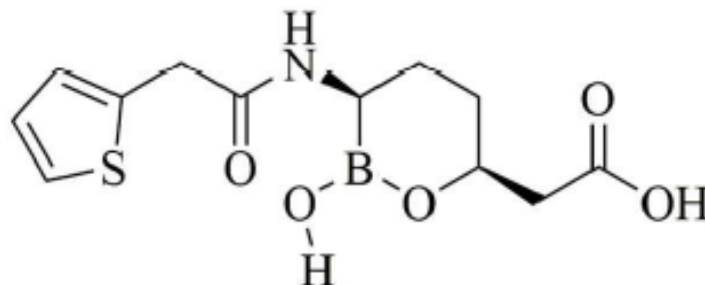
Estruturalmente semelhante ao avibactam, com a adição de um anel piperidina na posição 2 do grupo carbonilo, o relebactam (Figura 39) é um inibidor de  $\beta$ -lactamases em desenvolvimento clínico, actualmente na fase III dos ensaios clínicos na Europa e nos EUA. Tal como o avibactam, é activo contra  $\beta$ -lactamases das classes A e C de Ambler, incluindo ESBLs. A sua associação ao imipenemo demonstrou sinergismo na actividade contra várias bactérias MDR, nomeadamente KPC e estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de AmpC. No entanto, esta associação não é eficaz contra MBLs de classe B ou carbapenemases de classe D e não parece melhorar a actividade contra *A. baumannii* (Jones *et al.*, 2016; Toussaint e Gallagher, 2015).



**Figura 39:** Estrutura química do relebactam (adaptado de Jones *et al.*, 2016).

### iii. Vaborbactam

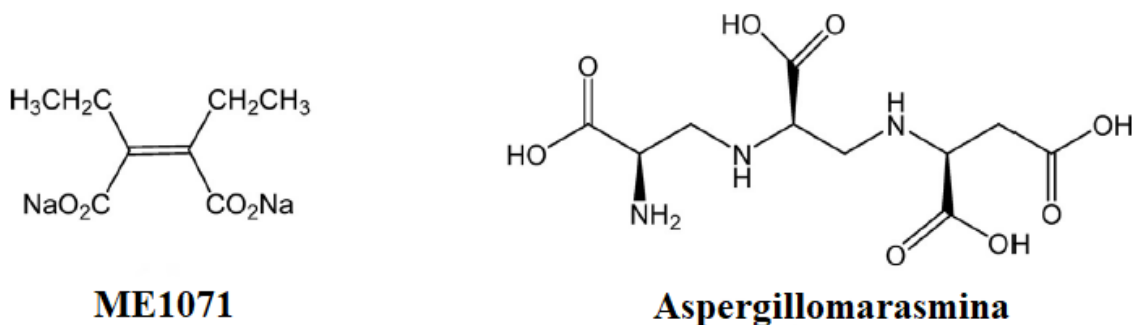
Em contraste com o avibactam e o relebactam, que possuem uma estrutura diazabicycloctana, o vaborbactam (Figura 40) é um novo inibidor de  $\beta$ -lactamases derivado do ácido bórico. A sua associação com o meropenem encontra-se na fase III dos ensaios clínicos na Europa para o tratamento de infecções causadas por bactérias *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos. Extensivamente em estudo encontra-se também a sua associação com o biapenemo, demonstrando excelente actividade contra estirpes de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemas de classe A, incluindo KPC, bem como  $\beta$ -lactamases de classe C. Porém, esta associação não apresenta actividade significativa contra MBLs e OXA-48 (Jones *et al.*, 2016; Toussaint e Gallagher, 2015).



**Figura 40:** Estrutura química do vaborbactam (adaptado de Jones *et al.*, 2016).

## 7. Outros inibidores de $\beta$ -lactamases

Este grupo apresenta uma vasta panóplia de moléculas com capacidade para inibir  $\beta$ -lactamases bacterianas. A ciclobutanona é uma molécula que mimetiza os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, demonstrando uma acção inibitória sobre as quatro classes de  $\beta$ -lactamases, principalmente sobre a classe C. Outras moléculas, como o ME1071 (derivado do ácido maleico), a aspergillomarasmina (Figura 41) e agentes quelantes tri e tetra-cíclicos do ácido acético encontram-se em estudo, apresentando boa capacidade inibitória contra as MBLs. Caso os resultados se revelem satisfatórios, estas moléculas poderão representar uma vantagem terapêutica essencial contra as bactérias resistentes a  $\beta$ -lactâmicos por produção de MBLs, numa altura em que estas se disseminam globalmente a um ritmo preocupante (as MBLs e as OXAs detêm a capacidade de hidrolisar praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos), estando cada vez mais associadas a infecções adquiridas no hospital ou na comunidade. Nas condições actuais, o tratamento de infecções causadas por estirpes produtoras de carbapenemases da classe B e C de Ambler requer o uso de antibióticos com diferentes mecanismos de acção, como polimixinas, tigeciclina e fosfomicina (Sousa *et al.*, 2016).

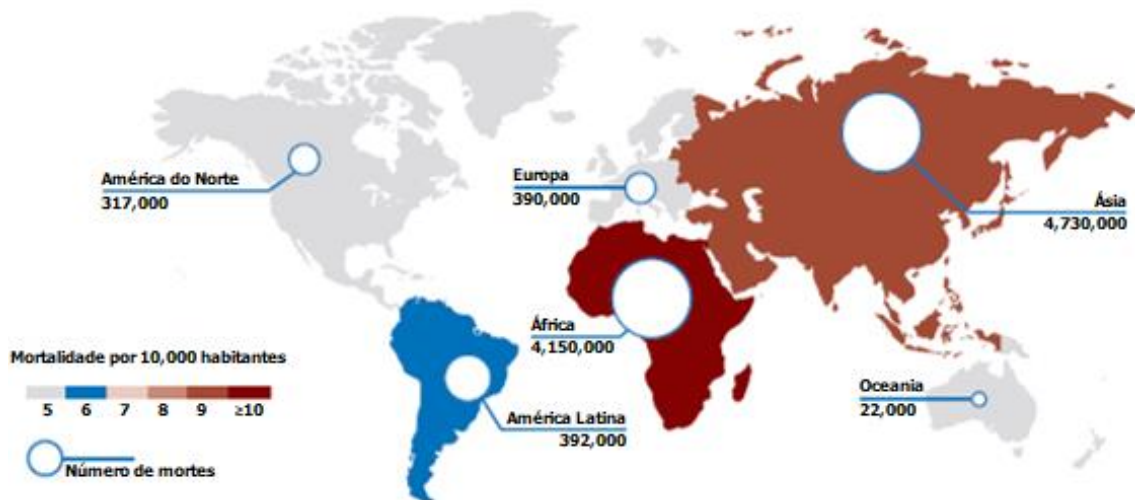


**Figura 41:** Exemplos de outras moléculas inibidoras de  $\beta$ -lactamases, neste caso sem estrutura  $\beta$ -lactâmica (adaptado de Bush, 2015).

## V. Conclusão

Volvidas mais de 8 décadas após a descoberta da penicilina G, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foram sofrendo, progressivamente, alterações estruturais ao longo das suas sucessivas gerações, em muito devido à manipulação empírica de diversos cientistas, de modo a fazer face à evolução dos mecanismos de resistência bacteriana.

No entanto, após várias décadas de uso intensivo e abusivo de antibióticos, deparamo-nos com surtos de resistência bacteriana, no mínimo, alarmantes. A Organização Mundial da Saúde classifica este flagelo como uma “ameaça global” à saúde pública, sugerindo que o mundo caminha para uma “era pós-antibiótico”, em que pessoas morrem de infecções comuns que são tratáveis há décadas. Este relatório salienta ainda que, “a não ser que medidas sejam tomadas para melhorar os esforços de prevenir infecções e mudar a forma como produzimos, prescrevemos e usamos antibióticos, o mundo perderá uma das armas da saúde pública”, o que poderá revelar-se extremamente funesto, facto corroborado pelos dados presentes na Figura 42.



**Figura 42:** Previsão de mortalidade anual atribuível à resistência a antibióticos em 2050, caso a actual política de uso não seja alterada. Cerca de 10 milhões de doentes morrerão, anualmente, com infecções MDR (adaptado de O’Neill, 2014).

Se entre as décadas de 40 e 60 mais de 20 novas classes de antibióticos foram introduzidas no mercado, desde então apenas 2 novas classes reforçaram o armamento terapêutico. O desenvolvimento de antibióticos análogos parecia suficiente até há 10 ou 20 anos, mas actualmente a situação não é sustentável, sobretudo entre as bactérias de Gram negativo (Coates *et al.*, 2011).

O surgimento vertiginoso de resistências bacterianas, particularmente no grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o mais utilizado na prática clínica, revela-se extremamente assustador, nomeadamente com o aparecimento de bactérias resistentes à penicilina, isoxazolilpenicilinas, meticilina e ampicilina, fruto da existência das mais diversas  $\beta$ -lactamases (como as TEM, CTX-M, KPC, NDM, AmpC e OXA), algumas delas de largo espectro, para além da transferência de resistências entre diferentes bactérias e do irrompimento de estirpes MDR.

A título ilustrativo, em bactérias de Gram positivo, a aquisição de genes que codificam PBPs alternativas, como a PBP2a, por parte das bactérias da família *Staphylococcaceae* confere-lhes resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos conhecidos (com excepção das cefalosporinas de 5ª geração) por diminuição da sua afinidade para com estes. Até mesmo a vancomicina, um antibiótico glicopéptido inicialmente utilizado com sucesso no combate a estirpes MRSA, deixou de ter efeito nestas bactérias restando, actualmente, apenas as cefalosporinas ceftarolina e ceftobiprole, para além de alguns antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos como a linezolida, a daptomicina, a tigecicilina e as estreptograminas.

Também as bactérias produtoras de MBLs representam um foco de preocupação, pois possuem a capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, à excepção do monobactâmico aztreonam. No entanto, este não apresenta actividade quando as referidas bactérias são simultaneamente produtoras de MBLs e ESBLs sendo que, para estes casos, a sua associação com o inibidor de  $\beta$ -lactamases avibactam se encontra em ensaios clínicos, demonstrando resultados promissores naquele que é um dos problemas mais dramáticos das infecções por bactérias de Gram negativo MDR. Outras moléculas inibidoras de MBLs, também sem estrutura  $\beta$ -lactâmica, como a ME1071 e a aspergillomarasmia, encontram-se presentemente em estudo. Actualmente, o tratamento de infecções causadas por estirpes produtoras destas  $\beta$ -lactamases é realizado com o

recurso a antibióticos dotados de diferentes mecanismos de acção, como polimixinas, tigeciclina e fosfomicina.

A maioria dos antibióticos utilizados na prática clínica foram descobertos a partir de microorganismos cultiváveis do solo mas, actualmente, estão a ser estudados microorganismos do solo não cultiváveis em condições laboratoriais, de modo a produzir novos antibióticos (Sousa *et al.*, 2016). A solução não pode, porém, passar por uma busca incessante de novos antibióticos, mas antes por um esforço conjunto de cooperação entre indústria, academia e forças governantes, de modo implementar estratégias que atenuem os problemas evidenciados, assim como uma redefinição da percepção da comunidade sobre os efeitos nefastos das resistências bacterianas e a criação de novas abordagens para as controlar. Estratégias como a identificação de sinergismos entre os  $\beta$ -lactâmicos já existentes e outras classes de antibióticos ou a obtenção novos alvos terapêuticos, para além da síntese química de novas moléculas inibidoras de  $\beta$ -lactamases, devem ser seriamente escrutinadas.

Urge, então, adoptar medidas como melhores práticas de higiene, não utilização de antibióticos como promotores de crescimento, contenção nas prescrições e proibição de venda directa sem receita médica nas farmácias que, associadas à introdução de alguns dos novos fármacos em fase final de avaliação clínica, referenciados ao longo desta monografia, se poderão revelar vitais na tentativa de, pelo menos, adiar a era pós-antibiótica.

## VI. Bibliografia

- Abraham, E. P. (1987). Cephalosporins 1945-1986. *Drugs*, 34 Suppl 2, pp. 1-14.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*, 36(6), pp. 697-705.
- Angert, E. R. (2005). Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 3(3), pp. 214-224.
- Becker, K., Ballhausen, B., Kock, R. e Kriegeskorte, A. (2014). Methicillin resistance in Staphylococcus isolates: the "mec alphabet" with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic S. aureus lineages. *Int J Med Microbiol*, 304(7), pp. 794-804.
- Bernatova, S., Samek, O., Pilat, Z., Sery, M., Jezek, J., Jakl, P., Siler, M., Krzyzanek, V., Zemanek, P., Hola, V., Dvorackova, M. e Ruzicka, F. (2013). Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy. *Molecules*, 18(11), pp. 13188-13199.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol*, 181, pp. 4725-4733.
- Bonfiglio, G., Russo, G. e Nicoletti, G. (2002). Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs*, 11(4), pp. 529-544.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. e Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 13(10), pp. 620-630.
- Bush, K. (2015). A resurgence of beta-lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Int J Antimicrob Agents*, 46(5), pp. 483-493.
- Calvo, J. e Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), pp. 44-52.
- Cha, J. Y., Ishiwata, A. e Mobashery, S. (2004). A novel beta-lactamase activity from a penicillin-binding protein of Treponema pallidum and why syphilis is still treatable with penicillin. *J Biol Chem*, 279(15), pp. 14917-14921.

Choong, Y. S. e Yung-Hung, R. L. (2016). A general overview on outer membrane protein (Omp) simulations. *Journal of Computational Science*, 17, pp. 285-291.

Coates, A. R., Halls, G. e Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol*, 163(1), pp. 184-194.

Conti, G., Pollegioni, L. e Rosini, E. (2015). One-pot conversion of cephalosporin C by using an optimized two-enzyme process. *Catal. Sci. Technol.*, 5(3), pp. 1854-1863.

Craig, W. A. e Andes, D. R. (2013). In vivo activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae, including strains with extended-spectrum beta-lactamases, in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(4), pp. 1577-1582.

Desmarais, S. M., De Pedro, M. A., Cava, F. e Huang, K. C. (2013). Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol Microbiol*, 89(1), pp. 1-13.

Drawz, S. M. e Bonomo, R. A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*, 23(1), pp. 160-201.

Drawz, S. M., Papp-Wallace, K. M. e Bonomo, R. A. (2014). New beta-lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(4), pp. 1835-1846.

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. e Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), pp. 7687-7692.

Fleming, A. (1944). THE DISCOVERY OF PENICILLIN. *British Medical Bulletin*, 2(1), pp. 4-5.

Fuerst, J. A. (2010). Beyond Prokaryotes and Eukaryotes : Planctomycetes and Cell Organization. *Nature Education*, 3(9), pp. 44.

Fung-Tomc, J. C. (1997). Fourth-generation cephalosporins. *Clinical Microbiology Newsletter*, 19(17), pp. 129-136.

Grayson, M. L., Crowe, S. M., McCarthy, J. S., Mills, J., Mouton, J. W., Norrby, S. R., Paterson, D. L. e Pfaller, M. A. (2010). Cephalosporins and Related Drugs. In: CRC Press (ed.) *Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs*. pp. 257-458.

Hancock, R. E. W. e Bell, A. (1989). Antibiotic Uptake into Gram-Negative Bacteria. *Perspectives in Antiinfective Therapy*. Vieweg, pp. 21-28.

Harrison, C. J. e Bratcher, D. (2008). Cephalosporins: a review. *Pediatr Rev*, 29(8), pp. 264-267; quiz 273.

Hellinger, W. C. e Brewer, N. S. (1999). Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc*, 74(4), pp. 420-434.

Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D. e Seifert, H. (2004). In vitro activities of the beta-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with beta-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(5), pp. 1586-1592.

Innovative Solution. [Em linha]. Disponível em <[http://www.innovativesolution.it/penicillinase-resistant\\_penicillins.htm](http://www.innovativesolution.it/penicillinase-resistant_penicillins.htm)>. [Consultado em 27/09/2017].

Jones, J. A., Virga, K. G., Gumina, G. e Hevener, K. E. (2016). Recent Advances in the Rational Design and Optimization of Antibacterial Agents. *Medchemcomm*, 7(9), pp. 1694-1715.

Karaman, R. (2014). Prodrugs Design Based on Inter- and Intramolecular Processes. *Prodrugs Design - A New Era*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 1-76.

Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J. B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M. A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D. M. e Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 10(9), pp. 597-602.

Laboratoryinfo.com. [Em linha]. Disponível em <<http://laboratoryinfo.com/gram-staining-principle-procedure-interpretation-and-animation/>>. [Consultado em 30/08/2017].

Laudano, J. B. (2011). Ceftaroline fosamil: a new broad-spectrum cephalosporin. *J Antimicrob Chemother*, 66 Suppl 3, pp. iii11-18.

Llarrull, L. I., Testero, S. A., Fisher, J. F. e Mobashery, S. (2010). The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol*, 13(5), pp. 551-557.

Lovering, A. L., Safadi, S. S. e Strynadka, N. C. (2012). Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem*, 81, pp. 451-478.

Marshall, W. F. e Blair, J. E. (1999). The cephalosporins. *Mayo Clin Proc*, 74(2), pp. 187-195.

Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L. e Mobashery, S. (2006). Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(12), pp. 4404-4409.

Microbeonline.com. [Em linha]. Disponível em <<http://microbeonline.com/gram-staining-principle-procedure-results/>>. [Consultado em 30/08/2017].

Miller, B., Hershberger, E., Benziger, D., Trinh, M. e Friedland, I. (2012). Pharmacokinetics and safety of intravenous ceftolozane-tazobactam in healthy adult subjects following single and multiple ascending doses. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6), pp. 3086-3091.

Moellering, R. C., Jr. (2012). MRSA: the first half century. *J Antimicrob Chemother*, 67(1), pp. 4-11.

Moisan, H., Pruneau, M. e Malouin, F. (2010). Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 65(4), pp. 713-716.

Muñiz, C. C., Zelaya, T. E. C., Esquivel, G. R. e Fernández, F. J. (2007). Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49(3-4), pp. 88-98.

Navarre, W. W. e Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(1), pp. 174-229.

O'Neill, J. (2014). Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. Review on Antimicrobial Resistance.

Ocampo, P. S., Lazar, V., Papp, B., Arnoldini, M., Abel zur Wiesch, P., Busa-Fekete, R., Fekete, G., Pal, C., Ackermann, M. e Bonhoeffer, S. (2014). Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(8), pp. 4573-4582.

Page, M. G. (2000).  $\beta$ -Lactamase inhibitors. *Drug Resist Updat*, 3(2), pp. 109-125.

Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. e Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(11), pp. 4943-4960.

Perez-Inestrosa, E., Suau, R., Montanez, M. I., Rodriguez, R., Mayorga, C., Torres, M. J. e Blanca, M. (2005). Cephalosporin chemical reactivity and its immunological implications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5(4), pp. 323-330.

Pushkaran, A. C., Nataraj, N., Nair, N., Gotz, F., Biswas, R. e Mohan, C. G. (2015). Understanding the Structure-Function Relationship of Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus* by Peptidoglycan O-Acetylation Using Molecular Docking, Dynamics, and Lysis Assay. *J Chem Inf Model*, 55(4), pp. 760-770.

Rolain, J. M., Canton, R. e Cornaglia, G. (2012). Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. *Clin Microbiol Infect*, 18(7), pp. 615-616.

Rolinson, G. N. e Geddes, A. M. (2007). The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Int J Antimicrob Agents*, 29(1), pp. 3-8.

Samaha-Kfoury, J. N. e Araj, G. F. (2003). Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. *BMJ*, 327(7425), pp. 1209-1213.

Sanders, C. C. (1993). Cefepime: the next generation? *Clin Infect Dis*, 17(3), pp. 369-379.

Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. e Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), pp. 234-258.

Silva, K. C. D. e Lincopan, N. (2012). Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J Bras Patol Med Lab*, 48, pp. 91-99.

Song, J. S., Jeon, J. H., Lee, J. H., Jeong, S. H., Jeong, B. C., Kim, S. J., Lee, J. H. e Lee, S. H. (2005). Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *J Microbiol*, 43(2), pp. 172-178.

Sousa, J. C., Machado, E., Novais, C., Peixe, L., Amorim, J. e Monteiro, N. (2016). *Antibióticos*. Edições Universidade Fernando Pessoa.

Southgate, R. (1994). The synthesis of natural  $\beta$ -lactam antibiotics. *Contemp. Org. Synth.*, 1(6), pp. 417-431.

Tan, S. Y. e Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*, 56(7), pp. 366-367.

Toussaint, K. A. e Gallagher, J. C. (2015). beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations: from then to now. *Ann Pharmacother*, 49(1), pp. 86-98.

van Langevelde, P., van Dissel, J. T., Ravensbergen, E., Appelmelk, B. J., Schrijver, I. A. e Groeneveld, P. H. (1998). Antibiotic-induced release of lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: quantitative measurements and biological reactivities. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(12), pp. 3073-3078.

Watkins, R. R., Papp-Wallace, K. M., Drawz, S. M. e Bonomo, R. A. (2013). Novel beta-lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Front Microbiol*, 4, pp. 392.

World Health Organization. [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/campaigns/world-antibiotic-awareness-week/infographics/en/>>. [Consultado em 29/08/2017].

Zeng, X. e Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol*, 4, pp. 128.

Zhanel, G. G., Chung, P., Adam, H., Zelenitsky, S., Denisuk, A., Schweizer, F., Lagace-Wiens, P. R., Rubinstein, E., Gin, A. S., Walkty, A., Hoban, D. J., Lynch, J. P., 3rd e Karlowsky, J. A. (2014). Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*, 74(1), pp. 31-51.

Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Noreddin, A. M. e Karlowsky, J. A. (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67(7), pp. 1027-1052.

Zhang, G., Meredith, T. C. e Kahne, D. (2013). On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 16(6), pp. 779-785.