

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA DO DERIVADO 2-ACETÓXI-1,4-NAFTOQUINONA

CÍCERO CARLOS DE FREITAS¹, MARY LOURDES DA SILVA RIBEIRO², VITOR FRANCISCO FERREIRA³,
CLÁUDIA GONÇALVES TORRES DE OLIVEIRA³, CYRO SAMEL¹, JUPIRA MIRON CARBALLIDO²,
CRISTIANE CAMPOS DE SILVA¹, PAULO HENRIQUES LEDA³ E LUIZ CEZAR DIAS CORRÊA¹.

O *Staphylococcus aureus* ainda é uma das principais causas de infecções comunitárias e hospitalares, apesar do grande empenho da indústria farmacêutica na luta pela síntese ou pelo isolamento de novos e mais eficazes antibióticos para combatê-lo^{1, 2, 3}. De acordo com inúmeros levantamentos epidemiológicos, o *S. aureus* ocupa o segundo lugar como agente infeccioso, perdendo, apenas, para a *Escherichia coli*². Dois exemplos, clinicamente marcantes, dessa prevalência do *S. aureus* são os assustadores e crescentes casos de endocardites, diagnosticados em viciados em drogas endovenosamente injetáveis, e as também frequentes infecções invasivas, em pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana-HIV³.

Duas enormes dificuldades são enfrentadas pela antibioticoterapia no combate às estafilocóccias por *S. aureus* (e às infecções bacterianas em geral): a imunossupressão dos pacientes e a competência genético-bioquímica das bactérias em desenvolverem resistência praticamente a qualquer novo antibiótico descoberto ou sintetizado pelo homem^{2, 3, 5, 6, 7}. Paralelamente ao desenvolvimento dos estudos que buscam o controle dos mecanismos de imunossupressão, o homem vem tentando descobrir o antibiótico ideal – ou a “utopina” de Mitscher⁸ –, capaz de resistir a qualquer dos meios de inativação desenvolvidos pelas bactérias resistentes^{5, 6, 7, 8}.

Apesar do indiscutível progresso da engenharia genética de microrganismos na produção de novos agentes antimicrobianos^{5, 7, 8, 9, 10}, não há dúvidas quanto à importância das sínteses orgânicas, *in vitro*, na produção de antibióticos mais eficazes, a partir da-

queles já disponíveis em clínica ou de compostos desprovidos de atividade antibacteriana^{5, 7, 8, 11, 12, 13}. Nas sínteses parciais em laboratórios, entretanto, um procedimento bem racional é empregar como precursores substâncias de “trânsito” metabólico já conhecido. Foi o que fizemos com a lausona (2-hidróxi-1,4-naftoquinona), por se tratar de um dos compostos naftoquinônicos encontrados na natureza e dotados de propriedades biológicas distintas, alguns, inclusive, com atividade antibiótica^{14, 15, 16}. Além disto, derivados naftoquinônicos, sintetizados em laboratório e com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, já são conhecidos da literatura¹⁷.

Neste trabalho, apresentamos resultados das medidas dos efeitos do derivado 2-acetóxi-1,4-naftoquinona (DNQ) – sintetizado a partir da lausona – contra cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP). De dez derivados que sintetizamos, apenas o DNQ exibiu atividade antibacteriana e somente sobre os Gram-positivos – *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, embora os seguintes Gram-negativos também tenham sido testados – *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADO NAFTOQUINÔNICO

O derivado naftoquinônico (DNQ) foi obtido através da reação apresentada no Esquema 1, cujo procedimento é descrito a seguir. Em um balão de 100ml (contendo 50ml de anidrido acético) foram adicionados 11,4mol de lausona. Após completa dissolução, a mistura recebeu 0,114mol de acetato de sódio anidro. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina, durante 28 horas,

Departamentos de Biologia Celular e Molecular¹, Patologia² e Química Orgânica³ da Universidade Federal Fluminense (UFF).

*As amostras de bactérias
foram isoladas de
pacientes do Hospital
Universitário Antônio
Pedro (HUAP).*

depois do que a mistura recebeu 50ml de água fria. O material precipitado foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada (gelada) e seco (a vácuo). O produto resultante (de cor laranja), com rendimento de 88,6%, foi caracterizado como 2-acetóxi-1,4-naftoquinona (DNQ) através das seguintes propriedades: a) espectro infravermelho, b) espectroscopia de massa, c) peso molecular (204 dalttons), d) ponto de fusão (120°C-127°C) e e) ressonância magnética de prótons. Para os testes antibacterianos, o derivado era dissolvido no meio de cultura com 60% de dimetil-sulfóxido (DMSO). Em todos os testes, a mistura meio + DMSO (60%) foi inócua contra as bactérias.

BACTÉRIAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As amostras de bactérias foram isoladas de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) e identificadas pelos métodos microbiológicos e bioquímicos convencionais. Os testes preliminares com o derivado naftoquinônico foram realizados com as seguintes espécies: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Depois desses testes, somente os *S. aureus* foram selecionados para a continuação das experiências.

Em nosso laboratório, as bactérias eram cultivadas no meio com a seguinte composição: a) bacto-peptona (Difco) – 10g; b) extrato de levedo (Difco) – 10g; c) cloreto de sódio (Merck) – 5g; e d) água destilada, para 1.000ml. Para o meio sólido, ágar-ágar (Difco) era adicionado, para 20g/l. O meio era autoclavado: 120°C, sob uma atmosfera, durante 30 minutos. Nestas condições, o meio apresentava pH 6,4. As culturas estoques eram mantidas em tubos de 100mm x 13mm, contendo 1,5ml do meio sólido (em plano inclinado), a -18°C, no freezer. Para as experiências, essas culturas eram repicadas para placas, incubadas a 37°C por 24 horas. Dessas placas, algumas colônias eram transferidas (com alça de platina) para o meio líquido. Assim preparada, a cultura era incubada a 37°C, durante cinco horas, para alcançar a fase exponencial de crescimento.

TESTES ANTIBACTERIANOS PRELIMINARES

Para estes testes, discos de Papel Whatman (5mm de diâmetro) eram embebidos em solução do derivado: 5mg/ml, no meio de cultura contendo 60% de dimetil-sulfóxido (DMSO). Os discos ficavam secando, por 24 horas, a 37°C e, em seguida, eram postos sobre a superfície de uma camada de bactérias, preparada como descrito a seguir. Cultura com cinco horas de crescimento a 37°C (~ 1,0x10⁹ UFC/ml) era diluída a 1:100 em NaCl a 0,85ml/100ml. Uma alíquota de 0,3ml era então espalhada sobre ágar em

placas. As placas eram incubadas a 37°C durante 30 minutos. Feito isto, os discos eram colocados sobre as camadas das bactérias. As placas eram incubadas a 37°C por 24 horas

e a sensibilidade determinada através da medida do diâmetro do halo (zona) de inibição. Esta sensibilidade era considerada significativa quando a zona de inibição fosse maior ou igual a 12mm. Discos embebidos no meio com 60% de DMSO, a cepa ATCC25923 de *S. aureus* e a oxacilina (discos) foram usados como controles. De dez derivados testados, apenas o 2-acetóxi-1,4-naftoquinona (DNQ) apresentou resposta significativa e somente contra os Gram-positivos: *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*.

DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS INIBITÓRIAS (CMI) E MÍNIMAS BACTERICIDAS (CMBs)

As CMI e CMBs do DNQ, para as cepas de *S. aureus*, foram determinadas através da técnica de macrodiluição à metade, que passamos a descrever. Três séries de 12 tubos de 100mm x 13mm (contendo 0,5ml do meio com a droga diluída) eram preparadas, com concentrações variando de 1.024µg/ml a 0,5µg/ml. Para os testes com a oxacilina e a vancomicina, as concentrações variaram de 64µg/ml a 0,03µg/ml. A cada tubo era adicionado 0,5ml de uma cultura com cerca de 1,0x10⁵ UFC/ml. Este inóculo era obtido a partir de uma cultura de cinco horas a 37°C (fase exponencial de crescimento) diluída a 1:10⁴ no meio. Após 24 horas de incubação a 37°C, a CMI era definida como a menor concentração da droga que inibia completamente o crescimento visível de cultura. Na determinação das CMBs, 10µl de cada tubo eram colocados em placas, incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, as colônias eram contadas e a CMB era estabelecida como a menor concentração da droga, que matava, pelo menos, 99,9% das bactérias inoculadas (queda de três unidades de log no inóculo). Três controles eram corridos em cada experiência: o meio sem a droga, o meio com 60% de DMSO e a cultura pura. A cepa ATCC25923 de *S. aureus* foi usada como padrão.

CINÉTICAS DOS EFEITOS INIBITÓRIO E LÍTICO MEDIDAS ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO EM 560nm

A partir destas experiências, passamos a trabalhar com apenas três cepas de *S. aureus*: 471 e 482, sensível e resistente à oxacilina, respectivamente, e ATCC25923. Em cada experiência, era adicionada uma alíquota de 0,1ml de uma solução da droga (em concentração apropriada) a 3,9ml de uma cultura em

As cinéticas dos efeitos do derivado foram estudadas com técnica da diluição ao décimo e de plaqueamento.

fase exponencial de crescimento a 37°C, para as concentrações finais de 1/4, 1/2, 1 e 2x CMI. Para isto, uma cultura de 17 horas a 37°C era diluída a 1:25 no meio (preaquecido a 37°C por 15 minutos), em frasco Erlenmeyer de 125ml. Volumes de 3,9ml eram pipetados para tubos de 150mm x 13mm (encaixam-se, perfeitamente, no Spectronic 20, da Bausch & Lomb). Os tubos eram mantidos em banho a 37°C, até uma absorbância (560nm) = 0,10, quando as drogas eram adicionadas. As leituras eram feitas a cada hora (durante seis horas), com o meio puro sendo usado para aferir o aparelho, enquanto o meio + DMSO (60%) era empregado como branco. Dois controles: a cultura (sem a droga) e o meio + a droga eram corridos em cada experiência. Os resultados são apresentados em gráficos relacionando absorbância em 560nm (A560nm) x tempo (horas).

CINÉTICAS DOS EFEITOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

As cinéticas dos efeitos do derivado sobre as culturas de *S. aureus* em fase exponencial de crescimento a 37°C foram estudadas através da técnica da diluição ao décimo e de plaqueamento, como resumida a seguir. As culturas, preparadas como na experiência anterior, e com absorbância = 0,10 ($5,0 \times 10^7$ UFC/ml) recebiam a droga, para as concentrações de 1/4, 1/2, 1 e 2 x CMI. Nos tempos de 0, 2, 4 e 6 horas, amostras (0,1ml) eram pipetadas, diluídas (ao décimo) em solução de NaCl a 0,85g/100ml e plaqueadas (0,1ml). As placas eram incubadas a 37°C por 24 horas e as colônias eram contadas. Os resultados são apresentados em gráficos relacionando unidades formadoras de colônias (UFC)/ml x tempo em horas: Log UFC/ml x horas.

REAGENTES

Todos os reagentes químicos usados neste trabalho eram de pureza analítica, de acordo com as procedências mencionadas: ágar-ágar (Difco); anidrido acético (Química Fina); bactopectona (Difco); cloreto de sódio (Merck); dimetil-sulfóxido-DMSO (Riedel de Hæn AG, Seelze-Hannover); extrato de lêvedo (Difco); lausona (Aldrich Chemical Company, Inc.); oxacilina (Royton) e vancomicina (Lilly).

RESULTADOS

TESTES ANTIBACTERIANOS PRELIMINARES

Os testes antibacterianos preliminares, em discos, apresentados na Tabela 1, mostram atividade do derivado naftoquinônico (DNQ) apenas contra as bactérias Gram-positivas: *E. faecalis*, *S. aureus* e *S.*

epidermidis. Os diâmetros das zonas de inibição foram, respectivamente: 12mm, 12mm e 13mm. Nenhuma cepa exibiu sensibilidade ao DMSO (60% no meio de cultura) usado na dissolução de droga. A cepa ATCC25923 de *S. aureus*, utilizada como padrão, produziu uma zona de inibição = 35mm para a oxacilina (dado não apresentado).

CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS INIBITÓRIAS (CMIs) E CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS BACTERICIDAS (CMBs)

Na Tabela 2, são mostradas as variações das CMIs e das CMBs para o DNQ, a oxacilina e a vancomicina, em cepas de *S. aureus*: 11 sensíveis à oxacilina, 19 resistentes a este antibiótico e 1 padrão (ATCC25923). Nos três tipos de cepas, as CMIs para o DNQ variaram de 16µg/ml a 256µg/ml, com moda de 64µg/ml, e as CMBs de 64µg/ml a 512µg/ml, com moda de 256µg/ml.

CINÉTICAS DOS EFEITOS DO DERIVADO SOBRE AS ABSORBÂNCIAS DAS CULTURAS EM 560nm

A Figura 1 evidencia os efeitos do DNQ – nas concentrações de 1/4, 1/2, 1 e 2 x CMI – sobre as culturas das cepas de *S. aureus*: 471 (sensível à oxacilina) – A, 482 (resistente à oxacilina) – B e ATCC25923 – C, em fase exponencial de crescimento a 37°C, durante seis horas de tratamento. Nota-se um nítido efeito inibitório (no ponto de seis horas), mesmo para 1/4 x CMI, com inibições de 29,2%, 25%, e 30,1%, respectivamente. Com 2 x CMI, as inibições correspondentes foram 92,2%, 96,8% e 91,8%, para

Tabela 1

Testes de sensibilidade – em discos – para o DNQ e o DMSO, em seis diferentes espécies de bactérias isoladas de pacientes do HUAP.

Bactéria (1 cepa)	Diâmetro do DNQ	Disco (mm) DMSO
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923*	13	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	-

Cultura de cinco horas a 37°C ($-1,0 \times 10^8$ UFC/ml) era diluída a 1:100 em salina e espalhada (0,3ml) em placa com meio sólido. Discos (5mm) embebidos com a droga (5mg/ml) eram colocados sobre a cultura. Após 24 horas a 37°C, as zonas de inibição eram medidas e consideradas significativas, quando ≥ 12 mm. DMSO (dimetil-sulfóxido) era usado (60%) no meio de cultura, para diluir o derivado naftoquinônico (DNQ).

* Cepa usada como controle: 35mm para a oxacilina, nestes testes. Mais detalhes, em MATERIAL E MÉTODOS.

*Lima et al.,
demonstraram ação
contra bactérias clínicas
nos derivados
naftoquinônicos.*

as três cepas, respectivamente, no ponto de seis horas. Um dado marcante, nestas experiências, foi a resposta lítica (observada apenas na 1ª hora de tratamento), provocada por 2x CMI, nas cepas 471 e ATCC: A e C.

CINÉTICAS DOS EFEITOS DO DNQ SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

A Figura 2 apresenta os efeitos do DNQ – nas concentrações de 1/4, 1/2, 1 e 2 × CMI – sobre as culturas das cepas de *S. aureus*: 471 (sensível à oxacilina) – A, 482 (resistente à oxacilina) – B e ATCC25923 – C, em fase exponencial de crescimento a 37°C, durante seis horas de tratamento. Na menor concentração (1/4 × CMI) e no ponto final (seis horas) de cada experiência, o DNQ reduziu a viabilidade (Log UFC/ml) das culturas em 31,8%, 32,2% e 22,2%, em relação ao controle, para as cepas 471, 482 e ATCC, respectivamente. Na mais alta concentração (2x CMI), entretanto, os valores correspondentes foram 191%, 100% e 122,2%, identificando uma resposta bacteriostática para a cepa 482 (resistente à oxacilina) e respostas bactericidas para as cepas sensíveis ao β-lactâmico: 471 e ATCC.

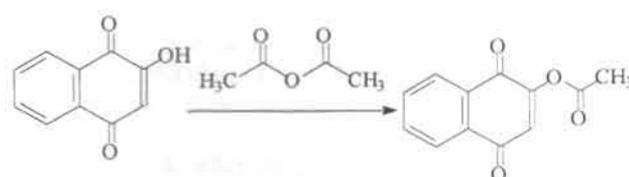
DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

O combate às infecções bacterianas, entre as quais aquelas provocadas por *S. aureus*, continua sendo um grande desafio para a medicina, face ao constante surgimento de cepas de bactérias resis-

tentes (às vezes, multirresistentes) e tolerantes aos novos antibióticos colocados à disposição da clínica^{5,6,7,8,18,19}. Embora, segundo Mitscher⁸, a busca do antibiótico

ideal seja uma utopia, o homem persiste na tentativa de consegui-lo^{5,7,8,9}. Esta busca tem se caracterizado, principalmente, pelo isolamento de agentes antibióticos de fontes naturais (plantas e microrganismos) e pela síntese (parcial ou total) desses produtos. Em muitos casos, este objetivo é

Figura 1



Síntese e caracterização do derivado naftoquinônico – O derivado naftoquinônico (DNQ) foi sintetizado através da reação apresentada acima, com a seguinte composição dos reagentes: 50ml de anidrido acético, 11,4mol de lausona, 0,114mol de acetato de sódio anidro e 50ml de água destilada. A descrição técnica do procedimento está em MATERIAL E MÉTODOS. DNQ foi caracterizado pelas seguintes propriedades: espectro infravermelho, espectroscopia de massa, peso molecular, ponto de fusão e ressonância magnética nuclear de prótons. Para os testes antibacterianos, o derivado era dissolvido no meio de cultura com 60% de dimetil-sulfóxido (DMSO). Em todas as experiências, a mistura meio + DMSO (60%) foi inócua contra as bactérias.

Tabela 2

Concentrações mínimas inibitórias (CMIs) e bactericidas (CMBs) para DNQ, oxacilina e vancomicina, em 30 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes do HUAP

<i>Staphylococcus aureus</i>	CMI (µg/ml)		CMB (µg/ml)	
	Variação	Moda	Variação	Moda
Sensíveis à oxacilina 11				
DNQ	32 - 64	64	64 - 51	256
oxacilina	0,0625 - 0,5	0,125	0,125 - 4	0,25
vancomicina	0,5 - 2	1	0,5 - 4	2
Resistentes à oxacilina 19				
DNQ	16 - 256	64	64 - 512	256
oxacilina	1 - 256	128	4 - 512	256
vancomicina	0,25 - 4	2	0,5 - 8	2
Padrão (ATCC 25923)				
DNQ		64		128
oxacilina		0,0625		0,25
vancomicina		2		4

Culturas em fase exponencial de crescimento (cinco horas a 37°C) com $1,0 \times 10^8$ UFC/ml eram diluídas no meio, para $1,0 \times 10^6$ UFC/ml. Estas diluições eram incubadas (0,5ml) em igual volume do meio (com 60% de DMSO) contendo a droga em uma série de diluições à metade. Após 24 horas a 37°C, a CMI era definida como a menor concentração que inibia (100%) o crescimento visível da cultura. Então, 10µl de cada tubo eram colocados em placas incubadas a 37°C por 24 horas e a CMB, estabelecida como a menor concentração que matava, pelo menos, 99,9% das bactérias inoculadas. O meio puro, a cultura (sem droga) e o DMSO (60% no meio) eram usados como controles. Mais detalhes, em MATERIAL E MÉTODOS.

Os resultados discutidos não permitem caracterizar o DNQ como um antibiótico para uso clínico.

alcançado através de modificações de drogas já conhecidas, dotadas (ou não) de atividade antimicrobiana^{5,7,8,9,10}. Foi com essa visão que projetamos modificações químicas da lausona (1 quinona: 2-hidróxi-1,4-naftoquinona), na procura de derivados com atividade antibacteriana relevante. Este objetivo foi calcado nas experiências de Lima *et al.*²⁰, que demonstraram ação contra bactérias clínicas nos derivados naftoquinônicos: juglona, lapachol e plumbagina. Estes autores, entretanto, limitaram as suas pesquisas às determinações das CMIs. As discussões e as conclusões de nossos resultados com o derivado 2-acetóxi-1,4-naftoquinona (DNQ) são resumidas a seguir.

De dez derivados naftoquinônicos sintetizados por nosso Grupo – tendo a lausona como precursora –, apenas o 2-acetóxi-1,4-naftoquinona (DNQ) exibiu atividade contra cepas de bactérias clínicas e somente de espécies Gram-positivas: *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* (Tabela 1). Priorizamos os estudos com *S. aureus*, em virtude de suas infecções prevalecerem sobre aquelas provocadas pelos dois outros microrganismos.

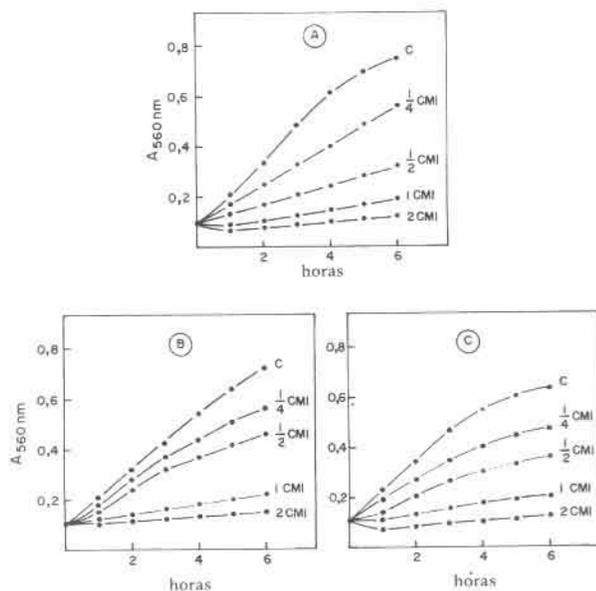
Os valores das CMIs e das CMBs para o DNQ contra cepas de *S. aureus* (Tabela 2) são mais altos do que aqueles que encontramos – nas mesmas

experiências – para os antibióticos oxacilina e vancomicina – estes, coincidentes com os dados da literatura internacional^{21, 22, 23}. Os resultados da Tabela 2, portanto, não sugeriam a continuação dos estudos com o DNQ; contudo, as suas atividades – inibitória, lítica e bactericida (sem lise) – exibidas nas – Figuras 1 e 2, mudaram essa perspectiva.

Os efeitos do DNQ, apresentados na Figura 1, em nível de espectrofotometria de absorção em 560nm de culturas de *S. aureus*, mostram uma ação lítica do derivado (na 1ª hora de tratamento), para a concentração de 2 × CMI, além de uma atividade inibitória diretamente proporcional ao aumento de sua concentração. Estes dados estimulam novos estudos com o DNQ, na busca de efeitos com concentrações submínimas inibitórias, principalmente, na tentativa de descobrir combinações sinérgicas com antibióticos já em uso clínico, seguindo modelos de alguns pesquisadores^{24,25,26,27}. Estas combinações são importantes, também, nos estudos do mecanismo de ação do DNQ.

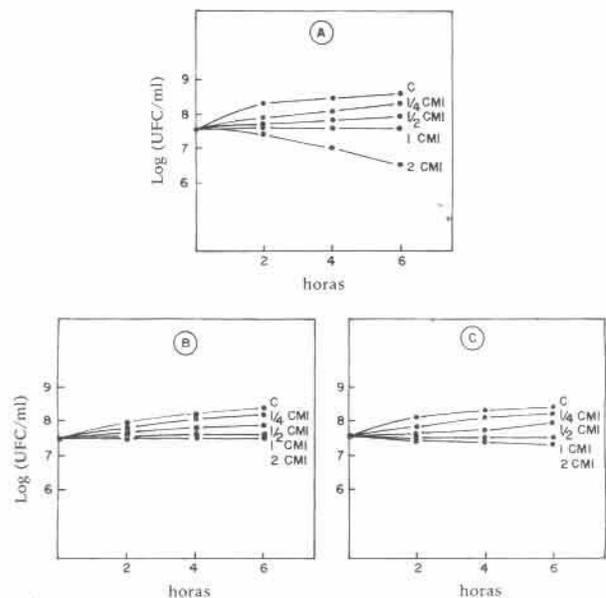
Quando os efeitos do DNQ sobre as culturas de *S. aureus* foram avaliados em nível da viabilidade

Figura 2



Cinéticas dos efeitos do derivado naftoquinônico (DNQ) – nas concentrações de 1/4, 1/2, 1 e 2 × CMI (concentração mínima inibitória) – sobre as absorbâncias (A560nm) das culturas em fase exponencial de crescimento a 37°C, das cepas de *Staphylococcus aureus*: 471 (sensível à oxacilina) – (A), 482 (resistente à oxacilina) – (B) e ATCC25923 – (C). A droga era adicionada às culturas, quando A560nm = 0,10. Mais detalhes, em MATERIAL E MÉTODOS.

Figura 3



Cinéticas dos efeitos do derivado naftoquinônico (DNQ) – nas concentrações de 1/4, 1/2, 1 e 2 × CMI (concentração mínima inibitória) – sobre a viabilidade celular (Log UFC/ml) das culturas em fase exponencial de crescimento a 37°C, das cepas de *Staphylococcus aureus*: 471 (sensível à oxacilina) – (A), 482 (resistente à oxacilina) – (B) e ATCC25923 – (C). A droga era adicionada às culturas com a viabilidade de 5,0x10⁷ UFC/ml. Nos tempos indicados, amostras (0,1ml) eram pipetadas, diluídas em salina e plaqueadas; as placas eram incubadas a 37°C por 24 horas e as colônias eram contadas. UFC = unidades formadoras de colônias. Mais detalhes, em MATERIAL E MÉTODOS.

A droga exibiu atividade apenas contra cepas Gram-positivas: E. faecalis, S. aureus e S. epidermidis.

celular (Log UFC/ml), como mostrado na Figura 2, ficou evidente a atividade bactericida do derivado (em $2 \times$ CMI) contra a cepa sensível à oxacilina: em A, confirmando o que havia sido verificado com a espectrofotometria de absorção (Figura 2A), lise na 1ª hora de agressão. Esta atividade bactericida, entretanto, foi bem mais baixa na cepa ATCC (Figura 2 C); enquanto na cepa oxacilina resistente, a resposta foi apenas bacteriostática (Figura 2 B). Estes dados são indicativos da existência de, pelo menos, três mecanismos de ação do DNQ ($2 \times$ CMI) em diferentes cepas de *S. aureus*: bacteriostático, bactericida (sem lise) e bacteriolítico.

Comparativamente, a lausona (precursora do DNQ) exibiu CMI e CMBs mais altas do que o derivado para as três cepas de *S. aureus* (dados não apresentados). Além disto, as cinéticas de absorbância em 560nm e de viabilidade celular mostraram, apenas, efeitos inibitórios para a lausona (sem bacteriostase nem lise), com recuperação já a partir da 4ª hora de tratamento (dados não apresentados).

Os resultados acima discutidos não nos permitem caracterizar o DNQ como um antibiótico para uso clínico, mas as suas atividades contra cepas de *S. aureus* motivam a continuação de seus estudos na perseguição daquele objetivo. Para isto, já estamos tentando modificar a sua estrutura, visando a aumentar o seu espectro de ação e a sua atividade antiestafilocócica.

Esta procura de novos antibióticos contra estafilocóccias por *S. aureus* cresce em importância, no instante em que a única opção terapêutica, no combate às cepas multirresistentes desta bactéria, é a vancomicina, que, entretanto, além de seus efeitos colaterais^{28, 29}, já tem perspectivas de resistência^{30, 31}, fato este que está amedrontando os infectologistas do mundo inteiro, preocupados, principalmente, com as infecções bacterianas em pessoas imunossuprimidas, como os aidéticos, por exemplo^{4, 32}.

RESUMO

O derivado 2-acetóxi-1,4-naftoquinona (DNQ), sintetizado por Ferreira, foi testado contra seis diferentes espécies de bactérias isoladas de pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP). A droga exibiu atividade apenas contra cepas Gram-positivas (zonas de inibição ≥ 12 mm, em testes preliminares): *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Para os isolados de *S. aureus*, as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e mínimas bactericidas (CMBs) variaram de $16\mu\text{g}$ a $256\mu\text{g/ml}$ e de $64\mu\text{g}$ a $512\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Através da espectrofotometria de absorção em 560nm, DNQ originou cinéticas de

inibição diretamente proporcionais às suas concentrações, com $2 \times$ CMI promovendo resposta lítica (apenas na 1ª hora de tratamento) nas cepas sensíveis à oxacilina. Em

nível de viabilidade celular (UFC/ml), os efeitos do derivado também cresceram na razão direta do aumento de sua concentração, com $2 \times$ CMI acarretando uma resposta bactericida bem nítida (já na 2ª hora de ação), contra as cepas sensíveis ao β -lactâmico. Apesar da menor atividade do DNQ em relação aos antibióticos de uso em clínica, estamos continuando os estudos com o derivado, agora, na tentativa de, através da modificação de sua estrutura, ampliar o seu espectro de ação e a sua atividade antibacteriana.

Unitermos: antibióticos, bactérias, derivados naftoquinônicos, infecções bacterianas, resistência a antibióticos, *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

The compound 2-acetoxy-1,4-naphthoquinone derivative (NQD), synthesized by one of us (Ferreira), was tested against six different bacterial species isolated from patients at Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP). The drug only exhibited activity on Gram-positive bacteria (zones of inhibition ≥ 12 mm, for preliminary testings): *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs), for NQD on *S. aureus* strains, ranged from $16\mu\text{g}$ to $256\mu\text{g/ml}$ and from $64\mu\text{g}$ to $512\mu\text{g/ml}$, respectively. On optical density readings (560nm), NQD's inhibition kinetics increased directly with drug concentration rises. In these experiments, $2 \times$ MIC had a lytic action against oxacillin-sensitive strains. On viability determinations (CFU/ml), the derivative also showed dose dependent kinetics, with very clear bactericidal responses at $2 \times$ MIC, on the strains sensitive to the beta-lactam. In spite of NQD's slower activity, by comparison with clinical antibiotics, these results stimulate us to modify the derivative structure, looking for better antibacterial actions.

Key words: antibiotics, bacteria, naphthoquinone derivatives, bacterial infections, bacterial resistance, *Staphylococcus aureus*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças às ajudas de PROPP-UFF e do CNPq, processos 500103/92-5(SU) e 620587/91-1-PADCT(QEQ).

Endereço para correspondência:
CÍCERO CARLOS DE FREITAS
Instituto de Biologia - UFF
Morro de São João Batista, s/nº - CEP 24001-970 - Niterói-RJ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRUMFITT, W. & HAMILTON-MILLER, J. - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.*, 320:1188-96, 1989.
2. JARVIS, W.R. & MARTONE, W.J. - Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, 29(Suppl.A): 19-24, 1992.
3. GRANINGER, W. et al. - Treatment of staphylococcal infection. *Cur. Op. Infect. Dis.*, 8(Suppl. 1):S20-S28, 1995.
4. SANDE, M.A. - Antimicrobial therapy of infections in patients with AIDS - an overview. *J. Antimicrob. Chemother.*, 23:63-5, 1989.
5. GOOTZ, T.D. - Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3:13-31, 1990.
6. NEU, H.C. - The crisis in antibiotic resistance. *Sci.*, 1992.257:1.064-76.
7. SILVER, L.L. & BOSTIAN, K.A. - Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37:377-83, 1993.
8. MITSCHER, L.A. - Chemistry of newer antibiotics toward overcoming bacterial resistance. *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 63:269-94, 1987.
9. HUTCHINSON, C. - Drug synthesis by genetically engineered microorganisms. *Bio/Technol.*, 12 April: 375-80, 1994.
10. ROLINSON, G.N. - The influence of 6-aminopenicillanic acid on antibiotic development. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22: 5-14, 1988.
11. CHOPPRA, I. et al. - Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.*, 29:245-77, 1992.
12. MAZZEI, T. et al. - Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31 (Suppl. C):1-9, 1993.
13. CHOPPRA, I. - Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38:637-40, 1994.
14. BENDZ, G. - An antibiotic agent from *Marasmius graminum*. *Acta Chem. Scand.*, 2:192, 1948.
15. BENDZ, G. - 6-methyl-1,4-naphthoquinone produced by *Marasmius graminum*. *Acta Chem. Scand.*, 5:489-90, 1951.
16. TANAKA, H. et al. - Nanaomycins, new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. I - structure and biosynthesis. *J. Antibiotics*, 26:868-75, 1975.
17. OSMAN, S.A.A. et al. - Synthesis of sulfanilamido-naphthoquinones as potential antituberculous agents. *J. Pharm. Sci.*, 72:68-71, 1983.
18. TUOMANEN, E. et al. - Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30:521-27, 1986.
19. VOORN, G.P. - Role of tolerance in cloxacillin prophylaxis of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J. Infect. Dis.*, 166:169-73, 1992.
20. LIMA, O.G. et al. - Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev. Inst. Ant., Recife*, 12(1/2): 3-18, 1972.

N.R.: O restante da Bibliografia encontra-se à disposição na redação da editora.

TÍTULO DE QUALIFICAÇÃO EM DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EDITAL SBDST Nº 01/96

Comissão Organizadora: Mauro Romero Leal Passos¹; Geraldo Duarte²; Gutemberg Leão de Almeida Filho³; Irineu Rubinstein⁴; Ivo Castelo Branco Coelho⁵; Lair Guerra de Macedo Rodrigues⁶; Marília de Abreu Silva⁷

Foi realizado nos dias 25 e 26 de setembro de 1996, durante o Congresso DST in Rio, o Concurso para Título de Qualificação em Doenças Sexualmente Transmissíveis. Foram muitos os candidatos, e publicamos agora a relação dos que conseguiram a média de 70% ou mais de acertos em cada prova, sendo portanto qualificados e aprovados.

Nome

1. Alberto Saraiva Tiburcio
2. Aléa Maria Carminate Bastos
3. Bruno Pompeu Marques
4. Faustino José Pereira Correa
5. Francisco de Assis Machado Massa
6. Heloisa Pereira Passarelli
7. Hildebrando Goes Barreto Filho
8. José Augusto Gori Torturella
9. Josiane Fontes Garcia
10. Luiz Alberto Vieira dos Santos Junior
11. Márcia Suely Silva D' Amaral

Nome

12. Mariângela da Silveira Steffens
13. Neiw Oliveira lamada
14. Octacilio Sant'anna Junior
15. Omar Lupi da Rosa Santos
16. Regis Kretchmann
17. Roberto Dias Fontes
18. Rosângela Vincenzo Gugliotta
19. Trícia de Mello Assad
20. Valéria Chamusca Simões
21. Vania Goyanna Pinheiro Silva
22. Yolanda Farias de Moraes

- 1 - Professor Doutor Coordenador de Pós-Graduação (Mestrado) em DST da Universidade Federal Fluminense (UFF).
- 2 - Professor Associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP).
- 3 - Professor Mestre em Ginecologia do Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).
- 4 - Professor Doutor Adjunto de Urologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).
- 5 - Professor Doutor Adjunto do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Ceará (UFCE).
- 6 - Coordenadora Geral do Programa Nacional DST/AIDS do Ministério da Saúde.
- 7 - Professora de Doenças Infecto-parasitárias da Universidade do Rio de Janeiro (UNI-RIO).