

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Fernando de Sá Del Fiol
Farmacêutico

Associação de ácido clavulânico a
cefalosporinas frente a
Staphylococcus aureus produtores
de beta-lactamase

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Doutor em Ciências -
Área Farmacologia

Piracicaba - S.P.
1998

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Fernando de Sá Del Fiol
Farmacêutico

Associação de ácido clavulânico a
cefalosporinas frente a
Staphylococcus aureus produtores
de beta-lactamase

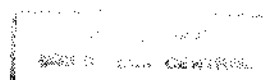
ESTE EXEMPLAR
Foi devidamente
colacionado
RESOLUÇÃO CC 96/036/83
8/7/98

Thales.../L. V. Filho

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Doutor em Ciências -
Área Farmacologia

Orientador:
Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho
FOP/Unicamp

Piracicaba - S.P.
1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	11/11/1000000
	D378a
V.	Ex
TOMAR	30/35061
PROD.	395/98
C	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/05/98
N.º CPO	

CM-00116385-8

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

D378a

Del Fiol, Fernando de Sá.

Associação de ácido clavulânico à cefalosporinas frente à *Staphylococcus aureus* produtores de beta-lactamase / Fernando de Sá Del Fiol. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1998.
97 f. : il.

Orientador : Thales Rocha de Mattos Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antibióticos beta-lactâmicos. 2. Medicamentos — Biodisponibilidade 3. Microbiologia farmacêutica. 4. Testes de sensibilidade bacteriana. I. Mattos Filho, Thales Rocha de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Antibióticos beta-lactâmicos
2. Medicamentos - Biodisponibilidade
3. Microbiologia farmacêutica
4. Testes de sensibilidade bacteriana



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Piracicaba, 03 de julho de 1998

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Doutorado**, em sessão pública realizada em **03 de julho de 1998**, considerou o candidato **FERNANDO DE SÁ DEL FIOL** aprovado.

1. PROF. DR. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO

Thales M. Mattos Filho

2. PROF. DR. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

F. C. Groppo

3. PROF. DR. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

Eduardo Dias de Andrade

4. PROF. DR. NEOCLAIR MOLINA

Neoclair Molina

5. PROF. DR. RONALDO CELIO MARIANO

Ronaldo Celio Mariano

À Cristiani e à minha Família;
pela paciência e incentivo, com
carinho, dedico este trabalho.

Ao meu Orientador, Professor e Amigo
Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho,
que me conduziu pelos rumos da Ciência
e principalmente pelos caminhos da vida.

À vocês muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. José Ranali;

Aos professores da Área de Farmacologia Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp; Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. José Ranali, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Prof.a. Dra. Maria Cristina Volpato. Este trabalho é fruto de toda a confiança, por vocês, em mim depositada;

Aos amigos Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Prof. Carlos Eduardo Pulz Araújo, Sinvaldo Baglie, pela valiosa ajuda durante toda a realização deste trabalho;

Ao Srs. José Carlos Gregório e Ademir Mariano, técnicos do Laboratório de Farmacologia da FOP - Unicamp, por toda a atenção e auxílio durante a fase experimental;

À Srta. Maria Elisa dos Santos, secretária da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pela dedicação e zelo sempre demonstrados;

À Sra. Ana Maria Cossa de Arruda Oliveira, secretária da CPG desta Faculdade, pela presteza profissional;

À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara, pela doação de microrganismos utilizados nesse experimento;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, incentivando este trabalho;

Especialmente à todos os amigos e colegas da Universidade de Marília, que com muita compreensão e dedicação preencheram minhas ausências, incentivando essa minha realização pessoal.

À vocês, muito obrigado.

SUMÁRIO

Item	Página
1. Listas.....	01
1.1 Quadros e tabelas.....	02
1.2 Figuras.....	03
1.3 Símbolos e abreviaturas.....	04
2. Resumo.....	05
3. Introdução.....	08
4. Revisão da Literatura.....	11
4.1 Antibióticos β -lactâmicos.....	15
4.2 Cefalosporinas.....	16
4.2.1 Histórico.....	16
4.2.2 Mecanismo de Ação.....	19
4.2.3 Cefalexina.....	22
4.2.4 Ceftriaxona.....	25
4.3 Resistência bacteriana à quimioterápicos.....	27
4.4 Bases bioquímicas da resistência à drogas.....	31
4.5 <i>Staphylococcus aureus</i> e β -lactamases.....	34
4.6 Inibidores de β -lactamases.....	38
5. Proposição.....	42
6. Material e Métodos.....	44
6.1 Fase 1 <i>ex vivo</i>	45
6.1.2 Material.....	45
6.1.3 Animais.....	45
6.1.4 Microrganismos.....	45
6.1.4.1 <i>S.aureus</i> ATCC 25923.....	45
6.1.4.2 <i>S.aureus</i> - β -lactamase.....	45
6.1.5 Identificação do microrganismo.....	46
6.1.6 Discos de esponja.....	47
6.1.7 Meios de cultura.....	47
6.1.8 Drogas.....	48
6.1.9 Metodologia.....	49
6.2 - Fase 2 <i>in vitro</i>	53
6.2.1 Metodologia <i>in vitro</i>	53
7. Resultados.....	57
7.1 Testes <i>ex vivo</i>	58
7.1.2 Cefalexina.....	58
7.1.3 Ceftriaxona.....	61
7.1.4 Clavulanato.....	64
7.1.5 <i>S.aureus</i> não produtores.....	65
7.1.6 <i>S.aureus</i> - β -lactamase.....	66
7.2 Testes <i>in vitro</i>	67
7.3 <i>ex vivo</i> versus <i>in vitro</i>	69
8. Discussão.....	71
9. Conclusão.....	78
10. Anexos.....	80
11. Summary.....	84
12. Referências Bibliográficas.....	87

1. LISTAS

1. Listas

1.1 Lista de quadros e tabelas presentes no texto.

Quadro/Tabela	Legenda	Página
Quadro 1	Índice de letalidade de doenças nas eras pré e pós antibióticos	14
Quadro 2	Médias da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para <i>S.aureus</i> em relação à β -lactamase	36
Quadro 3	Médias da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para <i>S.aureus</i> em relação à β -lactamase	37
Quadro 4	Constituição dos grupos experimentais - estudo <i>ex vivo</i>	49
Quadro 5	Constituição dos grupos experimentais - estudo <i>in vitro</i>	53
Quadro 6	Composição dos tubos	54
Tabela 1	Média dos diâmetros dos halos de inibição, n e desvio padrão	58
Tabela 2	Média dos diâmetros dos halos de inibição, n e desvio padrão	61
Tabela 3	Média dos diâmetros dos halos de inibição, n e desvio padrão	64
Tabela 4	Média dos diâmetros dos halos de inibição, n e desvio padrão	65
Tabela 5	Média dos diâmetros dos halos de inibição, n e desvio padrão	66
Tabela 6	CIM ($\mu\text{g/mL}$) das drogas testadas em função dos microrganismos: <i>S.aureus</i> , produtores e não de β -lactamase	67

1.2 Lista de figuras presentes no texto.

Figura	Legenda	Página
Figura 1	Estrutura básica das cefalosporinas	15
Figura 2	Estrutura básica da parede celular bacteriana	20
Figura 3	Relação entre [] obtidas após administração oral de cefalexina e CIM para <i>S.aureus</i> produtores de β -lactamase	24
Figura 4	Porcentagem de cepas de <i>S.aureus</i> produtoras de β -lactamase	28
Figura 5	Ação de β -lactamases em penicilinas e cefalosporinas	35
Figura 6	Ação de drogas em bactérias produtoras e não de β -lactamases	37
Figura 7	Fórmula estrutural do ácido clavulânico	39
Figura 8	CIM de drogas associadas frente à microrganismos produtores de β -lactamases	40
Figura 9	CIM de cepas de <i>S.aureus</i> frente à associações de antibióticos	41
Figura 10	Esquema da metodologia da fase 1 <i>ex vivo</i>	52
Figura 11	Esquema da metodologia da fase 2 <i>in vitro</i>	56
Figura 12	Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados	59
Figura 13	Análise estatística dos dados, comparação entre as médias	59
Figura 14	Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados	61
Figura 15	Análise estatística dos dados, comparação entre as médias	62
Figura 16	Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados	64
Figura 17	Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados	65
Figura 18	Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados	66
Figura 19	Comparação dos valores obtidos <i>ex vivo</i> (mm) com os obtidos <i>in vitro</i> ($\mu\text{g/mL}$)	69
Figura 20	Comparação dos valores obtidos <i>ex vivo</i> (mm) com os obtidos <i>in vitro</i> ($\mu\text{g/mL}$)	70

1.3 Lista de símbolos e abreviaturas presentes no texto:

%	por cento
&	e
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
ASC	àrea sob a curva
ATCC	American Type Culture Colection
bac/mL	número de bactérias por mililitro
BHI	brain heart infusion
CBM	concentração bactericida mínima
CIM	concentração inibitória mínima
C.Máx	concentração máxima
et al	e outros
g	grama
g/dia	gramas por dia
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por kilograma
mg/kg/dia	miligrama por kilograma por dia
mg/L	miligrama por litro
MHA	Mueller Hinton Ágar
n	Número de elementos da amostra
mm	milímetros
°C	graus Celsius
pH	logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica
PVC	policlorovinil
SPF	Specific Pathogen Free
sd	Standard deviation
T ½	Tempo de meia vida
TSA	Trypticasein Soya Agar
u.f.c.	unidades formadoras de colônias

2. RESUMO

2. RESUMO

Desde a década de 40, com o advento da antibioticoterapia clínica, há relatos de microrganismos resistentes às drogas. Essa resistência é preocupante na medida em que torna-se cada vez mais difícil o tratamento de determinadas infecções associadas a esses microrganismos. Estudos têm sido realizados no sentido de encontrar novas drogas ou associações, ou ainda novas terapias para tentar minimizar o aparecimento e a manifestação de resistência. Assim, o intuito deste trabalho foi avaliar a associação de ácido clavulânico (inibidor de β -lactamases, normalmente associado à penicilinas), à cefalosporinas, na tentativa de aumentar sua ação bactericida frente à bactérias produtoras ou não de β -lactamases. Para tanto, foram utilizados 160 ratos, divididos em grupos de 8 animais nos quais foram implantados cirurgicamente, na região dorsal, esponjas de PVC. Decorridos 7 dias do implante, cada grupo recebeu doses previamente estabelecidas de: cefalexina (75 e 150 mg/kg - grupos 1 e 2); cefalexina + ácido clavulânico (75 / 37,5 e 150 / 75 mg/kg - grupos 7 e 8); ceftriaxona (40 e 80 mg/kg - grupos 3 e 4); ceftriaxona + ácido clavulânico (40 / 20 e 80 / 40 mg/kg - grupos 9 e 10) e ainda ácido clavulânico isoladamente (20 e 60 mg/kg - grupos 5 e 6). Uma hora após a administração das drogas os tecidos granulomatosos, formados pelo implante da esponja de PVC, foram retirados e dispostos em meio de cultura em placas de Petri, previamente inoculadas com 10^8 u.f.c. de ***Staphylococcus aureus*** não produtores de β -lactamase (ATCC 25923) (grupos 1 a 10) em ágar Müller Hinton. O mesmo procedimento acima descrito foi repetido (grupos 11 a 20), alterando-se porém o microrganismo, utilizando-se agora ***Staphylococcus aureus*** produtores de β -lactamase (cepa de campo). Após 24h de incubação, os halos de inibição formados, quando formados, foram medidos e

anotados para posterior análise. Esse estudo foi designado como *ex vivo*. Paralelamente, foi realizado estudo *in vitro* das mesmas associações testadas *ex vivo*, para avaliar a reprodutibilidade do teste e dos resultados. Para os testes *in vitro*, foi realizada uma escala de diluições contendo: o microrganismo, meio de cultura e ainda diluições decrescentes da(s) droga(s) a ser(em) testada(s), ou seja determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima). A análise estatística dos dados obtidos, mostrou que: sem a presença de β -lactamase, a cefalexina, apresenta melhores resultados que a ceftriaxona, o que inverte-se quando o microrganismo em questão é produtor de β -lactamase ($P < 0,05$). Ainda, a adição de ácido clavulânico não interfere na ação antibiótica das drogas quando não há presença de β -lactamase e, em presença da enzima, a associação mostrou-se sinérgica, aumentando a ação bactericida das drogas ($P < 0,05$), revelando-se útil quando o microrganismo mostra-se resistente pela presença da β -lactamase. Os resultados dos testes *ex vivo* realizados mostraram reprodutibilidade quando comparados com os resultados dos testes *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: cefalexina, ceftriaxona, ácido clavulânico, β -lactamase, resistência bacteriana.

3. INTRODUÇÃO

3. INTRODUÇÃO

O conhecimento do fenômeno da resistência data do início da era antimicrobiana e relaciona-se à presença, nos microrganismos, de estruturas ou processos metabólicos que impedem ou diminuem a ação de drogas com ação antimicrobiana conhecida. Atualmente a resistência bacteriana é descrita em praticamente todas as espécies. São conhecidos os mecanismos de transferência dessa resistência à outras bactérias e ainda, o risco que isso representa para a sociedade como um todo.

De todos os mecanismos bioquímicos de expressão de resistência em bactérias, a produção de enzimas que degradam a molécula da droga é, sem dúvida, o mais proeminente. Dentre as enzimas, a classe mais importante é a das β -lactamases. São enzimas que atuam hidrolisando o anel β -lactâmico, destruindo completamente a atividade de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e análogos.

As β -lactamases são enzimas codificadas por cromossomos ou através de plasmídeos que determinam em microrganismos gram positivos ou negativos sua produção e expressão, especialmente no *Staphylococcus aureus*. Inúmeras foram as tentativas de minimizar a resistência aos antibióticos β -lactâmicos, visto que, são medicamentos de baixa toxicidade, amplo espectro de atividade, de grande valia no meio médico. Na década de 70, foi introduzido o ácido clavulânico, um inibidor seletivo para β -lactamases que, quando associado à penicilinas, potencializa sua ação, diminuindo a hidrólise das enzimas sobre essas drogas.

A idéia do uso do inibidor difundiu-se pelo meio científico e passou a ser mais uma alternativa no combate da resistência à drogas. No presente trabalho, buscamos estudar a viabilidade e o poder antimicrobiano da associação desse inibidor, o ácido clavulânico, à

cefalosporinas de primeira e terceira gerações, frente à microrganismos produtores e não produtores de β -lactamases, uma vez que, são antibióticos de grande serventia e que sofrem também interferência por ação desta enzima.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4. REVISÃO DA LITERATURA

Tem sido busca constante entre as civilizações a procura de drogas, ou ainda, terapias que tenham como finalidade combater infecções e dizimar doenças. Substâncias como o bolor (China, 3000 anos), cerveja, vinho, (Sumérios na Mesopotâmia) alho e bandagens com mel (Idade Média), foram utilizadas em feridas infectadas, ou ainda em doenças genitais femininas. (TAVARES, 1996).

Progressos substanciais nas pesquisas foram obtidos com os trabalhos de Pasteur e Koch em 1878, que demonstraram a natureza microbiana das doenças. Com a crescente preocupação em encontrar substâncias com ação antimicrobiana e cada vez menos tóxicas, as pesquisas foram se desenvolvendo até as publicações de Paul Ehrlich em 1910, que introduziu com seu trabalho denominado "606" ou Salvarsan, um tratamento para a sífilis, sendo também censurado pela Igreja, por interferir na punição de Deus pelos pecados cometidos. Com base nesses trabalhos, buscaram-se novas drogas através de modificações estruturais nos compostos, chegando-se ao grupo dos sulfonamídicos, até hoje utilizados (MIMS *et al.*, 1995).

Os sulfonamídicos tiveram seu reconhecimento como droga antimicrobiana somente na década de 30 com os trabalhos de Domagk em 1932 na Alemanha, que demonstrou sua atividade antibacteriana em animais infectados. Esse trabalho recebeu ainda a confirmação de Leveditti e Vaissman na França no mesmo ano e, graças a esses e outros resultados, Domagk foi agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina do ano de 1938 (VALLE *et al.*, 1991; BRYANT, 1981).

A partir desse período, até o início da Segunda Grande Guerra, surgiram novos compostos sulfonamídicos através de

modificações em sua estrutura química que refletiam em sua atividade farmacodinâmica e farmacocinética. Surgiram a sulfadiazina, o sulfatiazol, a sulfamerazina, etc. (TAVARES, 1996).

Paralelamente, em 1928, Alexander Fleming no St. Mary's Hospital, observou que um fungo contaminava suas culturas de estafilococos e que no local da contaminação havia lise celular das bactérias e, portanto, não havia crescimento. Ao isolar o fungo, percebeu tratar-se do *Penicillium notatum*, o que o levou a nomear a substância que provocava a morte do microrganismo como penicilina. Constatou também que essa substância era ativa não só contra estafilococos, mas também contra estreptococos, e mais, não era tóxica para animais. A partir da descoberta de Fleming, outros trabalhos e pesquisas vieram a complementá-lo. Chain e Florey, isolaram a nova substância e desenvolveram técnicas para sua obtenção (MANDELL & PETRI, 1996; TAVARES, 1996).

O primeiro uso de penicilinas em humanos ocorreu em 12 de fevereiro de 1941, quando a droga foi administrada a um policial de Londres, portador de uma infecção mista por estafilococos e estreptococos. A droga foi utilizada com sucesso, traduzido pela melhora significativa do estado geral do paciente. Com o decorrer do tratamento, o estoque da droga se esgotou e o paciente apresentou recaída, vindo a falecer em 17 de fevereiro do mesmo ano (TAVARES, 1996).

Entretanto, seu uso foi reconhecido pela comunidade científica e aprovado como droga terapeuticamente útil. Com a chegada da Segunda Guerra Mundial houve a necessidade de uma maior quantidade de droga disponível e com a dificuldade financeira atravessada pelos laboratórios Ingleses, aliado à proximidade geográfica da guerra, Florey e seu grupo levaram a tecnologia aos Estados Unidos, onde a penicilina começou a ser produzida em escala industrial. Em 1945 o uso da penicilina foi liberado à sociedade civil e

em 1949 foram fabricadas 800 bilhões de unidades de penicilina, posteriormente 500 trilhões, assumindo assim seu papel até hoje indispensável no arsenal terapêutico (WEINSTEIN & BARZA, 1977).

A partir daí inicia-se a época de ouro dos antibióticos com novas descobertas e a promessa de drogas que atuariam com eficácia sobre doenças que até então apresentavam alto índice de mortalidade, como ilustrado no quadro 1.

Quadro 1. Índice de letalidade de doenças nas eras pré e pós antibióticos.

DOENÇA	LETALIDADE (%)	
	ERA PRÉ-ANTIBIÓTICA	ERA PÓS-ANTIBIÓTICA
Pneumonia pneumocócica	20-85	+/- 5
Endocardite bacteriana	99	5
Meningite por H. influenzae	100	2-3
Meningite pneumocócica	100	8-10
Meningite meningocócica	20-90	1-5
Febre tifóide	8-10	1-2

Adaptado de Weinstein & Barza, 1977.

O termo antibiótico foi adotado inicialmente por Vuillemin em 1889 em um trabalho intitulado "Antibiose e Simbiose" que determinava a "luta entre os seres vivos pela sobrevivência". Posteriormente Waskman, descobridor da estreptomicina, define o termo como "substâncias dotadas de atividade antimicrobiana, extraídas de estruturas orgânicas vivas" (BERGOGLIO, 1993).

4.1 - ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Denominam-se β -lactâmicos os antibióticos derivados quimicamente do anel β -lactâmico, grupo responsável pela atividade farmacológica da classe, caracterizando-se como o grupo farmacofórico, sendo que, qualquer alteração em sua estrutura básica resulta em completa perda de atividade do composto.

Compõem os β -lactâmicos duas grandes classes: as penicilinas e as cefalosporinas e mais recentemente, dois novos grupos de fármacos, os carbapenêmicos e os monobactâmicos (JAWETZ, 1998).

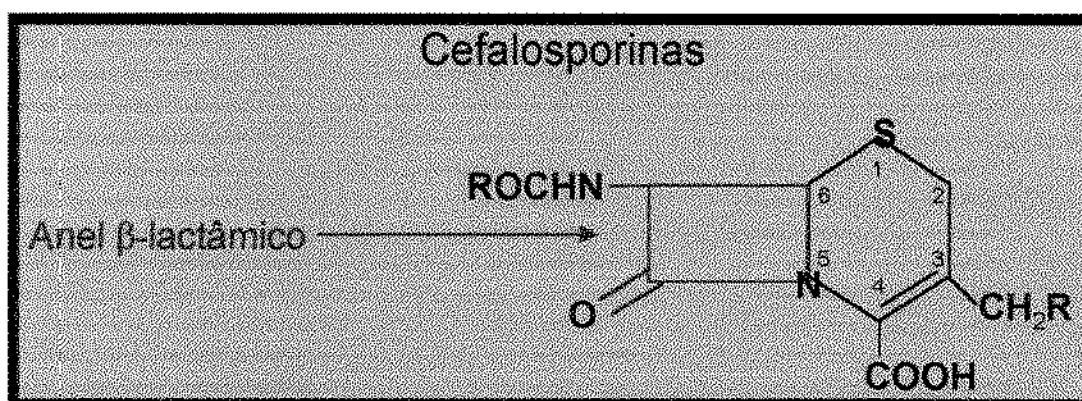


Figura 1 - Estrutura básica das cefalosporinas. Adaptado de Jawetz, 1997

4.2 CEFALOSPORINAS

4.2.1 - HISTÓRICO

As cefalosporinas são antibióticos β -lactâmicos, bactericidas, descobertos na década de 40 através de Giuseppe Brotzu, professor da Universidade de Cagliari na Itália. Ao realizar testes antibacterianos com microrganismos, o pesquisador isolou um fungo em uma poça d'água próximo a um esgoto na costa da Sardenha. Identificou-o como *Cephalosporium acremonium* e descobriu no microrganismo propriedades antibióticas semelhantes ao *Penicillium notatum* (MANDELL & PETRI, 1996).

O trabalho do Professor Brotzu foi publicado alguns anos mais tarde na *Lavori dell' Istituto d' Igiene dell' Università de Cagliari*, revista científica de pouca expressão e talvez por esse motivo, não despertou maiores interesses (TAVARES, 1996).

Essa descoberta foi levada à Inglaterra às mãos de Sir Haward Florey, em Oxford, que em parceria com outros pesquisadores identificou e confirmou a atividade antibacteriana do microrganismo. Isolou três substâncias assim denominadas: cefalosporinas, P, N e C. As duas primeiras, P e N, após estudos de espectro de atividade foram descartadas permanecendo a cefalosporina C em estudo. No ano de 1953, Abraham e Newton demonstraram na substância, atividade contra a penicilinase estafilocócica, despertando grande interesse em toda a comunidade científica. Finalmente em 1961, através de Loder e cols. isolou-se seu grupamento farmacofórico, denominado de ác. 7-aminocefalosporânico (7-ACA), substância constituída por dois anéis; um β -lactâmico e outro di-hidrotiazina (ABRAHAM, 1962).

A partir desse composto surgiram novas cefalosporinas: de uso parenteral; cefalotina (1962), cefaloridina (1964) e as de uso oral como: a cefalexina (1967), cefradina (1970) e cefapirina (1972)

(BERGOGLIO, 1993). Atualmente, compõem o grupo de antibióticos mais prescritos mundialmente, atingindo valores entre 30 e 50% das receitas aviadas, principalmente à pacientes hospitalizados (MEDICAL LETTER, 1992).

As cefalosporinas são derivados sintéticos do ácido 7-aminocefalosporânico, sendo que, as alterações geradas na cadeia ligada ao carbono 3 do anel (Figura 1) modificam suas características farmacológicas como metabolismo e farmacocinética (HUBER *et al.*, 1972). Se as alterações forem promovidas no próprio anel β -lactâmico, conferem maior ou menor resistência às β -lactamases (MANDELL & PETRI, 1996).

A cefalotina foi a primeira cefalosporina introduzida na clínica em 1962 pelo Laboratório Lilly e a partir dela surgiram outras que de acordo com seu comportamento farmacocinético, antimicrobiano e ainda seguindo a cronologia de sua síntese, foram divididas e classificadas em gerações (MOELLERING, 1976).

Primeira geração: Incluem as seguintes cefalosporinas de uso parenteral: cefalotina, cefaloridina, cefazolina, cefacetila, cefanona, cefazaflur, ceftazol, cefazedona e as de absorção oral como: cefalexina, cefradina, cefadroxil, cefaloglicina, cefatrizina e cefroxadina. Todas essas cefalosporinas exercem a mesma atividade antibacteriana, apresentando boa atividade bactericida contra cocos gram positivos e pequena contra gram negativos(MOELLERING, 1976).

Essas drogas ainda possuem uma relativa atividade contra bactérias produtoras de β -lactamase porém, mostram-se pouco úteis frente à estafilococos oxacilina-resistentes (DONOWITZ & MANDELL, 1988).

Segunda geração: São resultado de pesquisas buscando alternativas à microrganismos resistentes às de primeira geração. Introduzidas na clínica em 1978 buscando preencher a lacuna das bactérias produtoras de penicilinase ou ainda as oxacilina-resistentes.

Apresentam uma menor atividade contra microrganismos gram positivos que as de primeira geração (FONSECA, 1991; GRAUMLICH & SIDHU, 1997). Incluem drogas de uso oral: cefaclor, cefprozila, axetil cefuroxima e hexetil cefotiano e de uso parenteral: cefamandol, cefuroxima, ceforanida, cefonicida, cefotiano, cefoxitina e cefmetazol.

Terceira geração: Disponíveis desde 1981 com a introdução da cefotaxima. São drogas de grande atividade contra microrganismos gram-negativos, muito mais que as de primeira e segunda gerações, atuando ainda contra *Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia*, *Neisseria gonorrhoeae*. Sua maior estabilidade frente à microrganismos produtores de β -lactamase não significa necessariamente sua efetividade contra essas bactérias. As β -lactamases podem não inativar completamente a droga através de hidrólise, mas sim ligar-se a ela formando complexos (trapping ou aprisionamento) impedindo sua ligação às PBPs (PENICILIN BINDING PROTEIN) levando à uma queda acentuada em sua atividade (MALOIUN & BRYAN, 1986).

Esse grupo inclui drogas de uso parenteral: cefotaxima, ceftriaxona, cefodizima, cefmenoxima, ceftizoxima, ceftazidima, cefoperazona e cefsulodina e ainda algumas de absorção por via oral: cefixima, cefpodoxima, ceftibuten, cefetamet e cefdinir (BERGOGLIO, 1993; KAISER, 1994).

Quarta geração: Desenvolvida e introduzida em 1983 pelo laboratório Hoechst (Alemanha) em conjunto com Roussel Uclaf (França), a cefpiroma inaugura a classe das cefalosporinas de quarta geração vindo a complementar o espectro de atividade das drogas de terceira geração, muito potentes contra bactérias gram negativas porém com menor ação sobre gram positivos como enterococos e estafilococos (WATANABE & KATSU, 1993). Assim, as cefalosporinas de quarta geração preservam a atividade das drogas da terceira geração (gram negativos), associada a uma maior ação em gram

positivos ou seja, são drogas que apresentam o espectro de atividade das cefalosporinas de primeira e terceira gerações juntas (CHENG, 1993). Compreendem drogas como a cefpiroma, cefepima, cefquinoma e cefprozam, todas administradas por via parenteral.

4.2.2 - MECANISMO DE AÇÃO

A parede celular é um reforço externo da membrana citoplasmática das bactérias, com exceção dos micoplasmas. Tem como principal função, manter sua morfologia e a hipertonicidade do meio, atuando como barreira osmótica legando à bactéria a propriedade de manter em seu interior elementos essenciais à sua sobrevivência (MIMS *et al.*, 1995; CALDWELL, 1995).

Sua constituição varia de espécie para espécie e entre gram positivos e negativos, porém todas apresentam em comum a presença de mucopeptídeo, o peptidoglicano, formado por açúcares aminados (acetilglicosamina e acetilmurâmico). Nos microrganismos gram positivos, o mucopeptídeo corresponde a 40-90% da composição da parede celular, enquanto que nos negativos, de 4 a 10% (GEORGOPAPADAKOU, 1980). Nos gram positivos, a parede celular é formada por uma estrutura simples e espessa seguida pela membrana plasmática (Figura 2). Nos gram negativos, a célula é recoberta por uma membrana denominada membrana externa. Mais internamente apresenta-se o espaço periplásmico, seguido da parede celular e ainda, a membrana citoplasmática (MANDELL & PETRI, 1996).

Associadas à parede celular de alguns gram positivos e também no espaço periplásmico dos gram negativos encontram-se as β -lactamases (Figura 2), enzimas capazes de bloquear a ação de drogas através da hidrólise do anel β -lactâmico, presente em penicilinas e cefalosporinas (MIMS *et al.*, 1995).

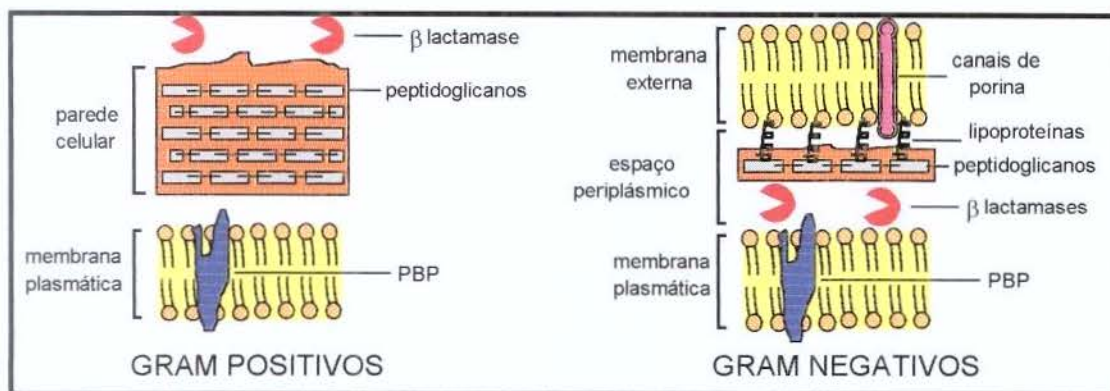


Figura 2 - Esquema da parede celular de bactérias. Adaptado de Mims e cols., 1995.

As bactérias estão em constante reprodução e, conseqüentemente, a parede celular está continuamente sendo destruída e sintetizada. A síntese da parede, ocorre em três etapas distintas. A primeira realiza-se no citoplasma da bactéria e é responsável pela produção de precursores necessários à elaboração da parede. A segunda ocorre na membrana citoplasmática onde, por intermédio de um transportador, o bactoprenol, as moléculas de aminoaçucars são exteriorizadas. Na terceira etapa, que ocorre no espaço periplásmico dos gram negativos e no extra celular dos gram positivos, promove-se a polimerização, isto é, os pares de aminoaçucars são ligados entre si originando longas cadeias polissacarídicas (CALDWELL, 1995). São reações catalisadas por enzimas denominadas transglicosidases. Posteriormente, ocorre a transpeptidação, isto é, o entrelaçamento dos segmentos peptídicos das cadeias polissacarídicas formando-se o polímero peptidoglicano que irá compor a parede e o septo da bactéria em divisão. Essas reações são catalisadas por transpeptidases havendo também a participação de carboxipeptidases (CALDWELL, 1995).

Nesta fase ocorre interferência e conseqüente ação bactericida dos β -lactâmicos, ligam-se irreversivelmente às PBPs (Penicillin Binding Proteins), ou proteínas ligadoras de penicilinas, localizadas na face externa da membrana plasmática. As PBPs são

classificadas em sete sub-tipos de acordo com seu peso molecular. As do grupo 1A, 1B, 2 e 3 estão presentes em pequena quantidade na célula e tem peso molecular entre 60.000 e 140.000. As do grupo 4, 5 e 6 correspondem a 70-80% de todas as presentes na célula e têm baixo peso molecular (40.000 a 60.000). Cada uma dessas proteínas tem uma função específica na produção da parede celular, atuando na terceira e última etapa da produção da parede, por isso tornaram-se alvos para drogas que inibem a formação da parede. Sob ação de cefalosporinas há ligação irreversível com as do grupo 1A, 1B e 3. As do grupo 1A e 1B têm atividade específica de transpeptidase e transglicosidase, relacionando-se com o alongamento da célula em divisão. As do grupo 3 são as mais importantes, responsáveis pela formação do peptidoglicano que constituirá o septo que divide a bactéria durante a multiplicação (BOYD, 1995; MARSHALL, 1995). Com sua inibição, a bactéria cresce continuamente sem ocorrer divisão septal, terminando por sofrer lise após um período de desenvolvimento. Para uma boa atividade de drogas β -lactâmicas é necessário que, além da inibição das PBPs, essas drogas cheguem ao local de ação, o que muitas vezes é impedido ou dificultado por ação de β -lactamases que inativam a droga antes que alcance seu receptor. A ação em bactérias gram negativas depende ainda da chegada da droga até as PBPs controlada seletivamente pelos canais de porina que limitam a passagem de drogas muito grandes e pouco solúveis (Figura 2). A impermeabilidade dessa membrana ou diminuição da formação desses canais constitui mecanismo de resistência a ação desses antibióticos (LAURENCE *et al.*, 1997).

Sob ação dessas drogas ocorre a formação de uma parede celular defeituosa e/ou incompleta, levando a bactéria à lise pois a hipertonicidade intracelular promoverá a entrada de água na bactéria determinando sua morte, caracterizando assim a ação bactericida dessas drogas (FONSECA, 1991).

4.2.3 - CEFALEXINA

A cefalexina é uma cefalosporina de primeira geração introduzida na clínica por Wick em 1967. Já no ano seguinte foi determinada grande parte de sua farmacocinética e atividade antibacteriana (PERKINS *et al.*, 1968). É uma cefalosporina disponível para uso oral sendo que, a presença de alimentos no ato da ingestão alterara pouco seus níveis séricos não tendo qualquer interferência significativa. Após uma ingestão oral de 250 mg atinge níveis plasmáticos em torno de 6,8 $\mu\text{g/mL}$. Quando a ingestão vai a 500 mg encontramos níveis plasmáticos entre 13 e 18 $\mu\text{g/mL}$ e se a administração oral chegar a 1g, teremos concentrações plasmáticas em torno de 25,0 $\mu\text{g/mL}$, determinando quantidade de droga suficiente para inibir a maioria das bactérias gram positivas causadoras de infecções em tecidos moles (PERKINS *et al.*, 1968; MOELLERING & SWARTZ, 1976).

Outros estudos mostram ainda que, após a administração de doses orais de 250 e 500 mg obtiveram-se as seguintes variáveis farmacocinéticas: T. Máx. de 60 minutos para as duas doses e a C.Máx. de 8,5 e 19 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (ORSOLINI, 1970). Tem boa distribuição pelo organismo atingindo com facilidade tecidos bem perfundidos não atravessando a barreira hematoencefálica quando sadia. Atravessa em pequena proporção a barreira placentária promovendo níveis fetais de 15 a 30% da concentração plasmática materna. Sua taxa de ligação à proteínas plasmáticas está em torno de 25%, sendo encontrada de 80 a 95% de forma inalterada na urina. Sofre excreção renal por secreção tubular e filtração glomerular. De 5 a 10% é metabolizada no fígado e tem um tempo de meia vida de 0,8 a 1,0 hora, podendo estar aumentado à até 24 horas em casos de anúria ou insuficiência renal aguda (JAWETZ, 1998).

A droga deve ser administrada de 250 a 500mg a cada 6 horas, podendo chegar até 1g quatro vezes ao dia (BAXTER *et al.*, 1990) ou ainda, optar-se pelo regime de 30 a 50 mg/kg/dia sem que a dose total administrada ultrapasse a 4g/dia. Esse regime posológico deve ser empregado em tratamentos pediátricos. A droga pode ser associada à probenecida aumentando sua concentração plasmática por competição pelo mesmo sítio de excreção (TAVARES, 1996).

A cefalexina tem como espectro principal de atividade cocos gram positivos e alguns germes gram negativos incluindo *E.coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis* e alguns *Eterobacter*. Não apresenta atividade contra *Haemophilus influenzae*, *Serratia*, *Pseudomonas* ou *Bacterioides fragilis*.

Tem como principais indicações: infecções do trato urinário como pielonefrites, infecções ginecológicas, respiratórias e dermatológicas, ou ainda como droga alternativa à penicilinas na uretrite gonocócica (TAVARES, 1996).

Em um estudo, realizado por Perkins e cols. (1968), o autor correlaciona a concentração plasmática, obtida após varias doses administradas à humanos ,com a CIM (concentração inibitória mínima) para os patógenos mais comuns, incluindo o *S.aureus* produtor de penicilinase. Os resultados são apresentados na figura 3.

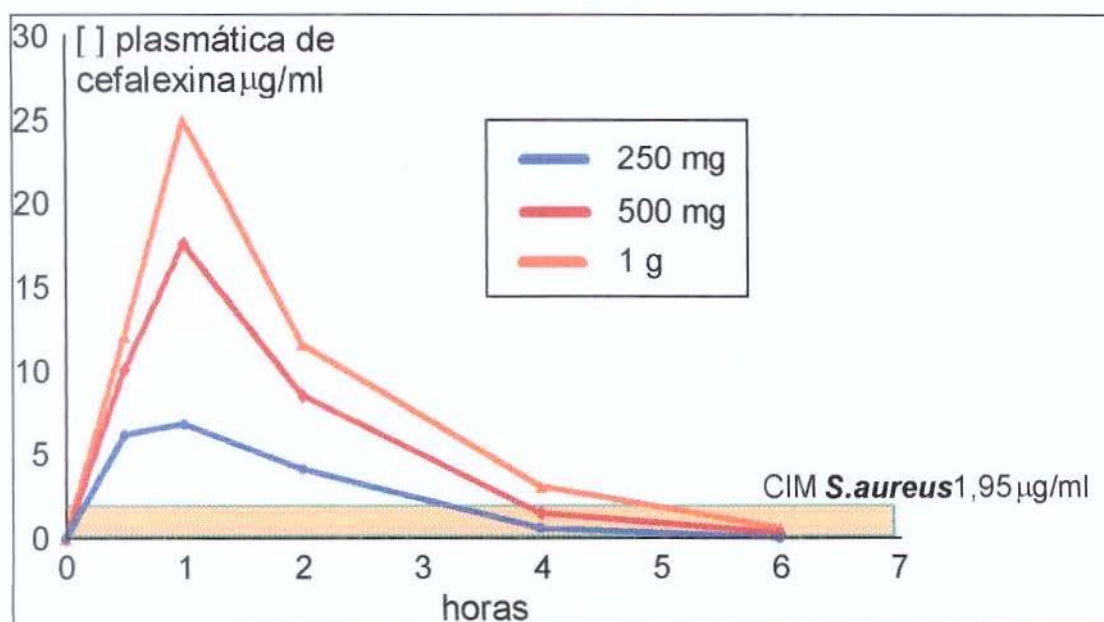


Figura 3 - Relação entre [] obtidas após administração oral de cefalexina e CIM para *S. aureus* produtores de β -lactamase (n=25). Adaptado de Perkins e cols., 1968

Como visto, a cefalexina atinge a CIM para o *S. aureus* até três horas para a dose de 250 mg e chegando à cinco horas para a dose de 1g, mostrando-se relativamente útil para esse tipo de microrganismo, devendo ser utilizada em altas doses (1g) e/ou em intervalos menores (6 horas).

Dados muito próximos a esses são encontrados por Lacey e Stokes (1977) que mostram valores de CIM para *S. aureus* produtores de β -lactamase em torno de 1,84 a 6,6 $\mu\text{g/mL}$ e de 1,64 $\mu\text{g/mL}$ para os não produtores.

Farrar e O'dell (1978), ao compararem várias cefalosporinas de uso oral e parenteral frente à *S. aureus* produtores de β -lactamase, encontraram valores de CIM entre 2,5 e 16,0 $\mu\text{g/mL}$ conforme a metodologia empregada para a cefalexina. Os autores ainda discutem e comparam a taxa de hidrólise pela β -lactamases sobre as cefalosporinas testadas, classificando a cefalexina como de resistência "intermediária" à hidrólise pela β -lactamase.

Mais recentemente, Takenouchi e cols. (1994) estudaram a ação de cefalosporinas de primeira geração frente a *Staphylococcus*

aureus produtores de β -lactamase, encontrando valores de CIM para a cefalexina em torno de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ para β -lactamase do sub-tipo A e 3,13 $\mu\text{g/mL}$ para o sub-tipo C. Os autores ressaltam que; “a cefalexina não deve ser utilizada terapêuticamente em infecções associadas à **S.aureus** produtores de β -lactamase”.

4.2.4 - CEFTRIAXONA

É uma cefalosporina de terceira geração, de uso parenteral, introduzida em 1980 sob a sigla de RO 13-9904 pelo laboratório Roche - Suíça (PARADIS *et al.*, 1992). Tem como principal característica sua meia vida prolongada, de 6 a 8 horas, representando a meia vida mais longa de todas as cefalosporinas disponíveis, possibilitando sua utilização 1 a 2 vezes ao dia (PATEL, 1984). Em um experimento realizado em humanos, a ceftriaxona teve sua farmacocinética comparada à três antibióticos β -lactâmicos; cefpiroma, ceftazidima, imipenem e ainda uma quinolona, a ciprofloxacina. Após dose endovenosa de 1g, a ceftriaxona, alcançou o maior $T_{1/2} = 7,65\text{h}$ e também a maior $C_{\text{máx}} = 137,8 \mu\text{g/mL}$ entre todas as drogas testadas. Esse mesmo experimento mostrou parâmetros farmacocinéticos de interesse como seu volume de distribuição ($0,11\text{L/kg}$), sua área sob a curva ($\text{AUC} = 1190,71 \mu\text{g/mL.h}^{-1}$), seu clearance total ($\text{CL} = 0,2 \text{ mL/min/kg}$) e ainda a fração da droga excretada *in natura* na urina ($F_u = 50,8\%$) (PARADIS *et al.*, 1992). Sua grande meia vida deve-se à dois fatores farmacocinéticos; uma lenta eliminação renal, que mantém concentrações urinárias até 48 horas após uma dose única, e seu alto grau de ligação à proteínas plasmáticas chegando a 95%, determinando uma liberação lenta de droga ativa no plasma (PARADIS *et al.*, 1992). Doses endovenosas de 1g de ceftriaxona promovem concentrações plasmáticas em torno de $120 \mu\text{g/mL}$, caindo em 12 horas

a níveis próximos a 32 µg/mL, chegando à 10 µg/mL 24 horas após a administração. A droga é bem distribuída aos tecidos moles com grande penetração no SNC, permanecendo no líquido em concentrações de 20 a 40 µg/mL por até 18 horas. Esses fatores tornam a droga como de primeira escolha para meningites provocadas por patógenos sensíveis (MEDICAL LETTER, 1992). Atravessa a placenta promovendo níveis terapêuticos adequados no feto e líquido amniótico (PARADIS *et al.*, 1992). Sua excreção é essencialmente renal, em torno de 60% da dose administrada (metabólitos ativos), sendo que o restante é eliminado através da bile.

Tem como espectro de atividade microrganismos gram positivos e gram negativos tendo pouca ação contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacterioides fragilis*. Suas principais indicações são as meningites causadas por microrganismos gram negativos, destacando-se ainda, sua atividade frente à gonococos, meningococos e *H. influenzae*, infecções do trato urinário e osteomielites (BERGOGLIO, 1993).

A posologia para adultos varia em doses de 1 a 4g/dia, dependendo do patógeno associado, sendo que em crianças a dose recomendada é de 50-100 mg/kg/dia (BERGOGLIO, 1993).

Sua ação contra *Staphylococcus aureus* não produtores de β-lactamase é ligeiramente menor que as cefalosporinas de primeira geração, atingindo CIM em torno de 2 a 6 µg/mL para esses microrganismos, enquanto que a cefalexina (primeira geração) pode atingir valores próximos à 1,5 µg/mL (LACEY & STOKES, 1977). A droga apresenta uma certa estabilidade frente à maioria das β-lactamases (CLEELAND & SQUIRES, 1984), podendo perder completamente sua atividade frente à algumas classes de β-lactamases produzidas por *Proteus* (CHRISTENSON *et al.*, 1982).

Em um experimento realizado por Neu (1990), comparando a atividade antimicrobiana de cefalosporinas de terceira geração,

conclui-se que; "Cefalosporinas de primeira e segunda gerações são 2 a 16 vezes mais ativas do que as de terceira geração frente a ***Staphylococcus aureus*** não produtores de penicilinase e que apresentam também maior atividade frente à algumas, mas não todas, cepas produtoras de β -lactamase".

4.3- RESISTÊNCIA BACTERIANA À QUIMIOTERÁPICOS

Com a introdução dos primeiros quimioterápicos em terapêutica adveio também a resistência a eles. Paul Ehrlich em 1907 trabalhando no Instituto Experimental de Frankfurt com uma cultura de tripanossomas descobriu a atividade antimicrobiana de um composto do arsênico, o atoxil. Neste mesmo momento ele observou e relatou o fato de que alguns microrganismos de uma mesma espécie eram resistentes ao tratamento (MEDEIROS *et al.*, 1984).

Em 1929, com o descobrimento da penicilina por Alexander Fleming, houve o primeiro relato de resistência natural de microrganismos aos antibióticos. Fleming relatou que bactérias do grupo "coli-tifóide" não eram sensíveis à penicilina. A causa dessa resistência foi logo relatada por Abraham e Chaim que, de posse de um extrato de ***E.coli***, observaram a inibição da atividade antimicrobiana da penicilina. Observaram também que a ação do calor e a digestão pela papaína sobre esse extrato determinava queda em sua capacidade de inibir a ação da penicilina. Baseados nessas observações concluíram que a inibição na atividade da penicilina era promovida por uma enzima, dando a ela o nome de penicilinase (MEDEIROS *et al.*, 1984).

Kirby em 1944, relata que alguns estafilococos anteriormente sensíveis agora eram resistentes à penicilina, devido à produção de penicilinases, caracterizando o primeiro relato de resistência adquirida à quimioterápicos (STRYNADKA *et al.*, 1994).

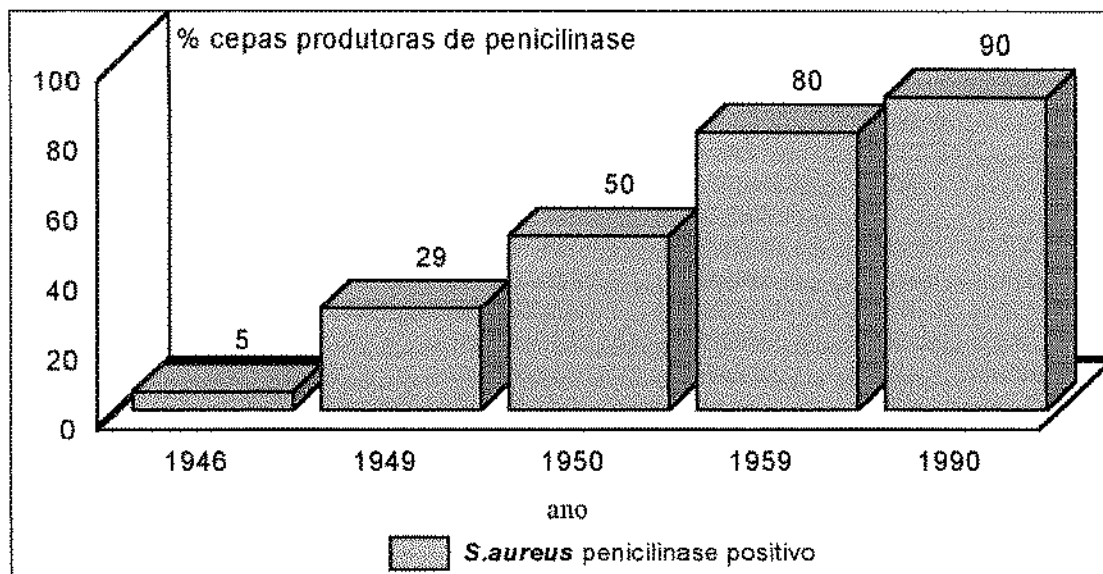


Figura 4 - Porcentagem de cepas de *S. aureus* produtoras de β -lactamase. Adaptada de Rosdahal, 1973 e Livermore, 1994.

Com a introdução da antibioticoterapia as cepas de *S. aureus* foram se tornando cada vez mais resistentes devido à produção de β -lactamase por esses microrganismos (Figura 4) (ROSDAHL, 1973; LIVERMORE, 1994).

Define-se como resistente, um microrganismo que não será inibido ou destruído por um agente antibacteriano em concentrações alcançadas *in vivo* após administração de doses terapêuticas (MIMS *et al.*, 1995). A resistência de microrganismos à quimioterápicos pode ser dividida em:

I. NATURAL: intrínseca ou primária. Caracterizada pela peculiaridade natural e original do microrganismo, ou seja, normalmente há ausência de receptores para as drogas nessas células (BERGOGLIO, 1993). Um exemplo clássico é a inatividade de β -lactâmicos frente à micoplasmas, visto que esses microrganismos não apresentam parede celular, impossibilitando completamente a ação dessas drogas (TRABULSI, 1973).

II. ADQUIRIDA: Quando há o aparecimento de resistência à um ou mais antibióticos em uma população bacteriana originalmente

sensível à essas drogas. Caracterizada pelo aparecimento de uma nova propriedade fenotípica em muitos integrantes de uma mesma espécie, nem sempre em todos (TRABULSI, 1973).

A aquisição de resistência por um microrganismo pode dar-se de diversas formas, a saber:

MUTAÇÃO: É uma alteração espontânea ou não que ocorre no cromossomo bacteriano levando à mudanças nas propriedades bioquímicas ou estruturais da bactéria como por exemplo o surgimento de resistência. A mutação pode ser determinada por raios X, ultravioleta, ácido nitroso e promove o surgimento de um resistente a cada um bilhão de microrganismos. Esse número não teria tanta importância não fosse o grau e a velocidade de divisão das bactérias, haja visto que a cada oito horas sucedem-se 36 gerações de bactérias. Para que isso ocorresse em humanos, o tempo estimado seria de 1000 anos (BERGOGLIO, 1993). Apesar disso a incidência de resistência a antibióticos por esse mecanismo se mostra pequena, já que os quimioterápicos parecem não estimular a mutação em microrganismos. Clinicamente pode ocorrer resistência por esse mecanismo em infecções crônicas e de difícil tratamento, como na tuberculose e hanseníase, onde o antibiótico permanecerá por um longo período de tempo em contato com o mesmo microrganismo. Esse tipo de mecanismo é transmitido somente verticalmente, ou seja, da célula genitora às células filhas (TAVARES, 1996).

Os microrganismos resistentes têm ainda a capacidade de transmitir seus genes de resistência, sendo que essa transferência pode se dar de quatro formas distintas:

1. TRANSFORMAÇÃO - É um mecanismo de transferência de todo ou parte de um cromossomo de uma bactéria à outra,

cromossomo este, portador do gene e resistência. Para que haja a transferência do material genético faz-se necessária a morte da bactéria doadora e incorporação do material genético pela receptora, implicando ainda na produção de proteínas de superfície pela bactéria receptora para torna-la apta a receber o material (estado de competência). Ocorre somente em bactérias da mesma espécie. É muito incomum e de pouca importância (CALDWELL, 1995).

2. TRANSDUÇÃO - É um recurso de intercâmbio genético caracterizado pela transferência de material de uma bactéria à outra por meio de bacteriófagos. Esses fagos usam o DNA da bactéria para sua multiplicação. Nesse processo, podem incorporar ao genoma das novas partículas virais, fragmentos de DNA cromossômico ou plasmídeo da bactéria parasitada, que contenham genes de resistência. Essas novas partículas virais ao parasitarem outras bactérias transferem o gene de resistência. É o principal mecanismo de aquisição de resistência por gram positivos, tendo pouca importância para os gram negativos. Os estafilococos são grandemente afetados por esse mecanismo tendo sido encontrados mais de 40 fragmentos de plasmídeos em uma única célula bacteriana. Esses plasmídeos podem conter genes determinantes de resistência à vários grupos de antibióticos (PELCZAR *et al.*, 1993; PAYNE *et al.*, 1992).

3. CONJUGAÇÃO - Para que esse mecanismo se estabeleça, faz-se necessário a presença em uma das bactérias de um plasmídeo codificante de Fator F (fertilidade). Esse fator F lega à bactéria que o possui, a possibilidade de, através de pilus ou fimbrias, estabelecer um contato físico com outras bactérias e, através dessa ponte, transferir material genético que contenha um gene determinante de resistência (Fator R), caracterizando a conjugação. Quando há a transferência de gene de resistência (Fator R) associado ao fator F, esse passa a

chamar-se fator RTF. O fator R, ou plasmídeo de resistência carrega genes de resistência múltipla, não só a um antibiótico, mas a várias drogas. Assim, a pressão genética exercida por uma só droga pode levar um microrganismo a desenvolver resistência a outro grupo de drogas. Atualmente, esse processo de transferência de resistência é o mais freqüente, favorecido pela pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos (REESE & BETTS, 1993).

4. TRANSPOSIÇÃO - A transposição permite o intercâmbio de material genético entre plasmídeos, ou entre plasmídeos e cromossoma, bacteriófagos e plasmídeos, tudo dentro de uma mesma bactéria, caracterizando uma "promiscuidade gênica". Essa transferência dá-se através de elementos genéticos denominados transposons. São capazes de inserirem-se entre moléculas de DNA quaisquer. Não têm capacidade de auto-replicação e por isso permanecem associados ao DNA, podendo trocar de posição no mesmo DNA (BERGOGLIO, 1993). Por serem segmentos pequenos de DNA, os transposons carregam pequena quantidade de informação, sendo capazes de codificar resistência apenas a duas ou no máximo três drogas (CALDWELL, 1995; PELCZAR *et al.*, 1993).

4.4 - BASES BIOQUÍMICAS DA RESISTÊNCIA À DROGAS:

A resistência bacteriana pode manifestar-se por seis mecanismos bioquímicos principais:

4.4.1 - Alteração da permeabilidade bacteriana à droga. Pode ser natural ou ainda adquirida. As bactérias gram negativas são envolvidas por um sistema de membranas extremamente especializado, o que dificulta a penetração de antibióticos. Essa penetração depende da lipossolubilidade, tamanho e carga elétrica da droga. Os germes gram negativos são praticamente insensíveis à

penicilina G devido à sua incapacidade de penetração e ligação às PBPs, (Penicillin binding proteins) caracterizando assim, resistência natural desses microrganismos à essas drogas. A resistência adquirida pode advir de genes cromossômicos e plasmidais determinando, por exemplo, uma diminuição ou extinção completa dos canais de porinas, utilizados por cefalosporinas para penetração em microrganismos. Essa extinção leva à incapacidade dessas drogas em atuar sobre essas bactérias (MEDEIROS *et al.*, 1987).

4.4.2 - Alteração de sistemas de transporte na célula. Para penetração nas células bacterianas, os antibióticos aminoglicosídeos utilizam-se de mecanismo de transporte ativo do germe envolvendo oxigênio, o que explica sua não efetividade contra microrganismos anaeróbios. Alterações nesse sistemas de transporte envolvendo aminoglicosídeos têm sido os maiores responsáveis pelo aparecimento de resistência à *P. aeruginosa*, caracterizando a resistência adquirida (PHILIPS *et al.*, 1986).

4.4.3 - Exclusão, ou retirada ativa da droga do meio intracelular. São genes plasmidais ou incluídos em transposons que codificam e determinam a produção de proteínas presentes na membrana com capacidade de secretar ativamente drogas para fora do espaço citoplasmático da bactéria. Esse sistema está presente na resistência adquirida à tetraciclina por bacilos gram negativos entéricos (CHOPRA, 1984).

4.4.4 - Alteração do receptor da droga. Esse tipo de alteração normalmente é mediada por mutações cromossômicas, sendo pequeno o papel de plasmídeos ou transposons. As alterações podem ocorrer nas PBPs diminuindo a afinidade de penicilinas e cefalosporinas por seu receptor, alterações no ribossoma bacteriano diminuindo ligação de

aminoglicosídeos e macrolídeos ou ainda modificações na RNA polimerase pela incorporação de novos aminoácidos determinando uma diminuição da ligação das rifamicinas (MALOIUN & BRYAN, 1986).

4.4.5 - Modificação de sistemas metabólicos na bactéria.

Consiste na abertura de vias metabólicas alternativas que contornam e produzem o mesmo produto final que a via bloqueada pelo antibiótico produziria. O exemplo mais clássico é a alteração da via de síntese do folato induzida pelas sulfas (VALLE *et al.*, 1991).

4.4.6 - Inativação enzimática da droga. É o mecanismo mais eficiente e comum relacionado à resistência de microrganismos à antibióticos. Relatado pela primeira vez por Abraham e Chaim que, em 1940, ao estudarem amostras de *E.coli* observaram a ação de enzimas que degradavam a penicilina, dando a ela o nome de penicilinase (MEDEIROS *et al.*, 1984). Já na década de 60 com a ação dessas enzimas sobre cefalosporinas, passaram a ser chamadas de cefalosporinases e, com o passar dos anos, o termo passou a designar enzimas que degradavam antibióticos β -lactâmicos, recebendo o nome de β -lactamases (MEDEIROS *et al.*, 1984).

Essas enzimas atuam hidrolisando o anel β -lactâmico, ou apenas ligando-se ao anel (trapping), levando a perda de atividade da droga. Um outro mecanismo ligado a inativação enzimática de drogas é a ação de enzimas sobre aminoglicosídeos (PHILIPS *et al.*, 1986) ou sobre o cloranfenicol ou fosfomicina (BENVENISTE & DAVIES, 1973), porém, o mecanismo mais eficiente e mais estudado de resistência de microrganismos à drogas, é a produção de β -lactamases sendo o principal determinante de resistência à antibióticos β -lactâmicos (MEDEIROS *et al.*, 1984).

Classificação: Entre as bactérias gram positivas, os estafilococos são os principais produtores de β -lactamases. Richmond

(1965) e Rosdahl (1973) identificaram e dividiram-nas sorologicamente em 4 sub-tipos designados; A, B, C e D (KERNODLE *et al.*, 1990). São estabelecidas por genes presentes em plasmídeos transferidos por transdução e encontradas na maioria das cepas de *S.aureus* e *S. epidermidis*. Para as bactérias gram negativas inúmeras são as classificações, divididas de acordo com seu substrato, ponto isoelétrico, elemento genético de formação da enzima (SYKES & MATTHEW, 1979) e, mais recentemente, baseada na seqüência de aminoácidos da enzima (BERGSTRÖM *et al.*, 1982). De todas as classificações de β -lactamases produzidas por gram negativos, a mais aceita é a de Richmond e Sykes (1973) que divide-as em cinco grupos com base no tipo de substrato utilizado pela enzima: tipo 1: cefalosporinas como substrato; tipo 2: penicilinas; tipo 3 e 4 enzimas que inativam tanto penicilinas quanto cefalosporinas, distintas ainda pela susceptibilidade à inibidores e por último; tipo 5: que utilizam meticilina e isoxazolilpenicilinas como substratos. Mais recentemente ainda foi proposta uma outra classificação de acordo com o tamanho das enzimas; classe A: 30.000 daltons, classe B: 23.000 daltons e ainda classe C: 39.000 daltons porém sem muita representatividade (MEDEIROS *et al.*, 1984).

4.5 - *Staphylococcus aureus* e β -lactamases

Coincidente com a introdução e disseminação do uso de antibióticos desde a década de 40, a prevalência de cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de β -lactamases cresce vertiginosamente (KERNODLE *et al.*, 1989; BONOMO *et al.*, 1995). Atualmente, alguns relatos giram em torno de 80 a 90% de cepas produtoras de β -lactamase (LIVERMORE, 1994). Por conta disso muitos estudos têm sido realizados no sentido de relacionar a atividade de cada um desses sub-tipos enzimáticos frente à antibióticos β -

lactâmicos, pois essa classe de drogas é ainda de primeira escolha para infecções por agentes gram positivos (KERNODLE *et al.*, 1989).

Sob a ação dessas enzimas, os antibióticos β -lactâmicos perdem parcial ou totalmente sua atividade. No caso das penicilinas, ocorre a hidrólise do anel β -lactâmico resultando na produção do ácido penicilóico desprovido de atividade. Para as cefalosporinas a reação é a mesma, hidrólise no anel β -lactâmico do ácido 7-aminocefalosporânico, resultando na formação do ácido cefalosporônico, completamente inativo (Figura 5) (LIVERMORE, 1994).

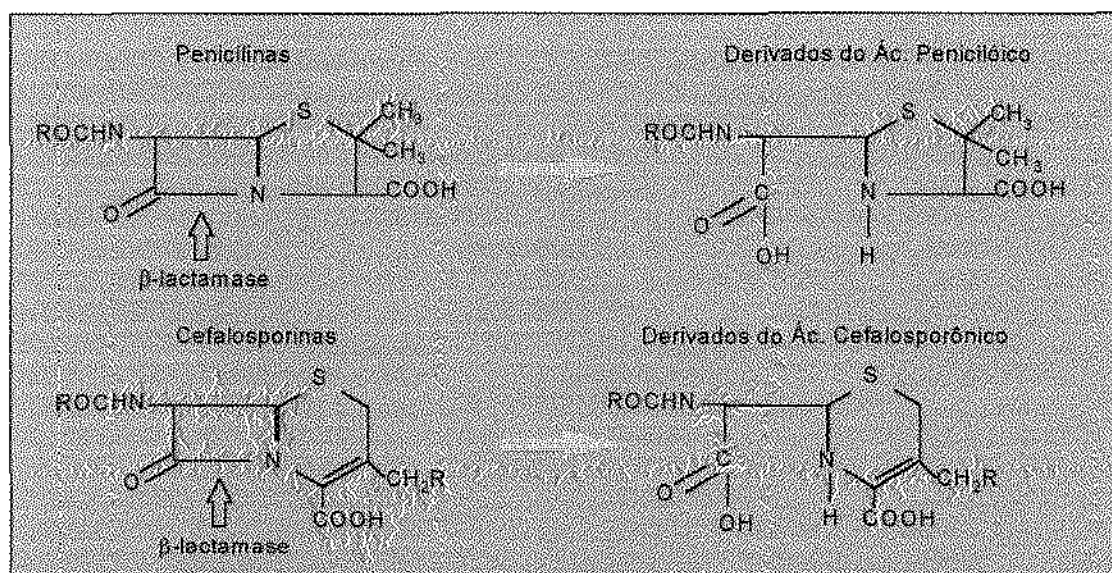


Figura 5. Ação de β -lactamases em penicilinas e cefalosporinas. Adaptado de Jawetz, 1997.

Inúmeros são os autores que relatam a ação dessas enzimas sobre esses antibióticos. Bonfiglio e Livermore (1994), através de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) em cepas de *Staphylococcus aureus*, produtoras e não de β -lactamases, mostram a ação clara dessas enzimas sobre essas drogas (quadro 2). Os autores utilizaram cepas isoladas em hospitais e posteriormente submeteram-nas à ação de penicilinas para diferenciá-las quanto à sua produção ou não de β -lactamases. Após identificadas, as cepas

produtoras de β -lactamases foram ainda submetidas à diferenciação quanto ao sub-tipo enzimático pelo método de Kernodle e cols. (1990).

Quadro 2. Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para *S. aureus* em relação à β -lactamase

ANTIBIÓTICOS	β -lactamase negativo (n=20)	β -lactamase tipo A (n=45)	β -lactamase tipo C (n=30)
Piperacilina	0,73	66,00	16,37
Amoxicilina	0,26	21,77	4,09
Meticilina	2,29	3,53	3,17
Penicilina G	0,05	30,55	5,65
Cefaloridina	0,05	0,21	0,2
Cefazolina	0,46	1,52	0,77
Cefalotina	0,39	0,74	0,63

Adaptado de Bonfiglio and Livemore, 1994.

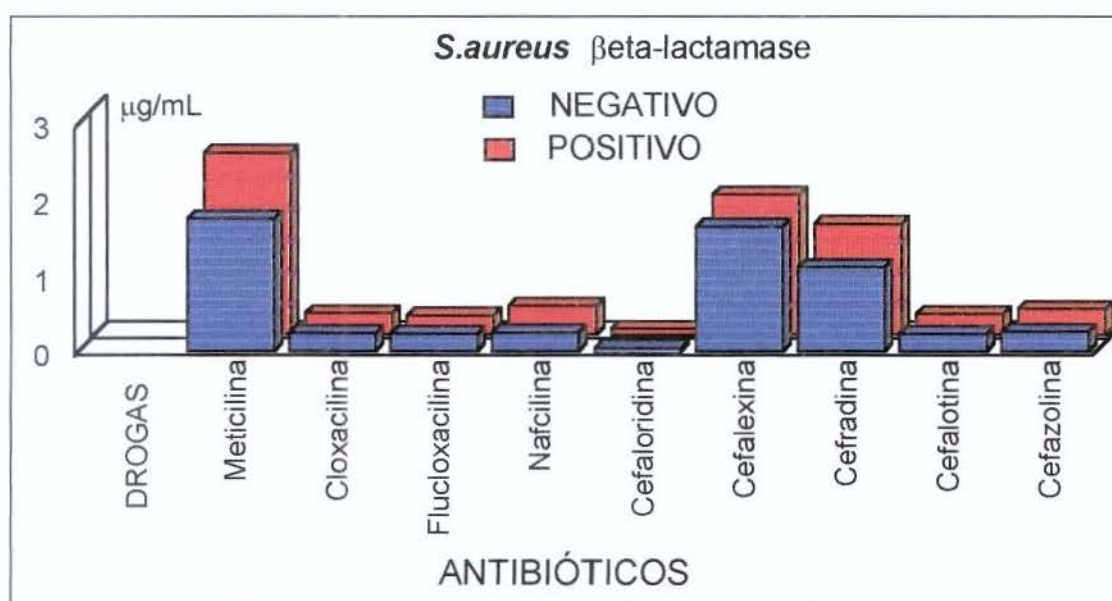
De posse dos dados do quadro 2 nota-se claramente; a influência exercida por essas enzimas na ação dos antibióticos e ainda; que a piperacilina, uma penicilina de espectro aumentado, mostra-se eficaz (0,73 $\mu\text{g/mL}$) quando β -lactamases estão ausentes porém perde imensamente sua atividade, apresentando-se como a droga mais sensível à ação de β -lactamases, quando da presença da enzima.

Em outro estudo semelhante, Lacey e Stokes (1977), determinando a atividade de cefalosporinas e penicilinas frente a *S. aureus* produtores de penicilinase, encontraram resultados semelhantes, como visto no quadro 3.

Quadro 3. Média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) para *S.aureus* em relação à β -lactamase

ANTIBIÓTICOS	β -lactamase	
	negativo (n=44)	positivo (n=14)
Meticilina	1,75	2,38
Cloxacilina	0,24	0,28
Flucloxacilina	0,23	0,25
Nafcilina	0,25	0,38
Cefaloridina	0,04	0,07
Cefalexina	1,64	1,84
Cefradina	1,11	1,45
Cefalotina	0,23	0,27
Cefazolina	0,26	0,34

Adaptado de Lacey & Stokes, 1977.

Figura 6. Ação de drogas em bactérias produtoras e não de β -lactamases. Adaptado de Lacey & Stokes, 1977.

4.6 - Inibidores de β -lactamases

As β -lactamases são a maior causa de resistência bacteriana à penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e drogas relacionadas. Atuam hidrolisando o anel β -lactâmico, fração da molécula essencial para a ligação às PBPs e inibição da síntese da parede bacteriana. Uma vez hidrolisado o antibiótico perde completamente sua atividade (LIVERMORE, 1994).

A utilização de substâncias que atuam inibindo essas enzimas apresenta-se atualmente como a alternativa mais viável no combate à resistência bacteriana aos β -lactâmicos (BRYSON & BROGDEN, 1994)

Uma estratégia alternativa ao desenvolvimento de agentes β -lactâmicos mais resistentes é a de associar-se um agente sensível à enzima com um inibidor da mesma. Essa tentativa foi introduzida na década de 60 quando pesquisadores notaram que a ampicilina tornou-se ineficaz contra *Pseudomonas*, *Enterobacter* spp e *Citrobacter* spp, pois esses microrganismos eram potentes produtores de β -lactamases. Nesse mesmo trabalho os pesquisadores notaram que a meticilina era um potente inibidor dessa classe enzimática e à partir dessas conclusões, a terapia contra esses microrganismos passou a ser composta de ampicilina para atuar e matar a bactéria e meticilina para inibir a ação da enzima (SABATH *et al.*, 1967). Essa tentativa funcionou muito bem na teoria porém não muitas vezes na prática, visto que a meticilina atuava pouco em gram negativos (LIVERMORE, 1994).

Já na década de 70 houve uma reintrodução do uso de inibidores com a descoberta do ácido clavulânico. Originalmente, um antibiótico retirado do *Streptomyces clavuligerus* foi introduzido em 1976 pelos Laboratórios Beecham, através de Brown e cols., Howart e cols. (TAVARES, 1996). A droga foi estudada com a finalidade de utilização como um novo β -lactâmico, porém sua potência mostrou-se

extremamente baixa atuando contra anaeróbios em concentrações entre 16 e 156 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado sua atividade como inibidor de β -lactamases apresentou-se eficazmente alta, atuando contra enzimas produzidas por bacilos gram negativos, gonococos e estreptococos, o que notabilizou seu uso como inibidor de β -lactamases associado à penicilinas. Outros compostos, análogos ao ácido clavulânico, foram também sintetizados e alguns estão disponíveis em clínica: sulbactam, tazobactam e brobactam (CHARDON *et al.*, 1995).

O ácido clavulânico penetra bem na parede celular mais complexa e estruturada de gram negativos, conseguindo atuar em β -lactamases presentes no espaço periplásmico desses microrganismos. As enzimas ligam-se à seu anel β -lactâmico causando sua degradação. Os produtos dessa degradação permanecem firmemente ligados à enzima, inativando-a por completo, caracterizando sua ação como a de um "inibidor suicida". Alguns autores sugerem seu uso em associação à β -lactâmicos em infecções estafilocócicas, estreptocócicas e ainda em infecções urinárias (BERGOGLIO, 1993).

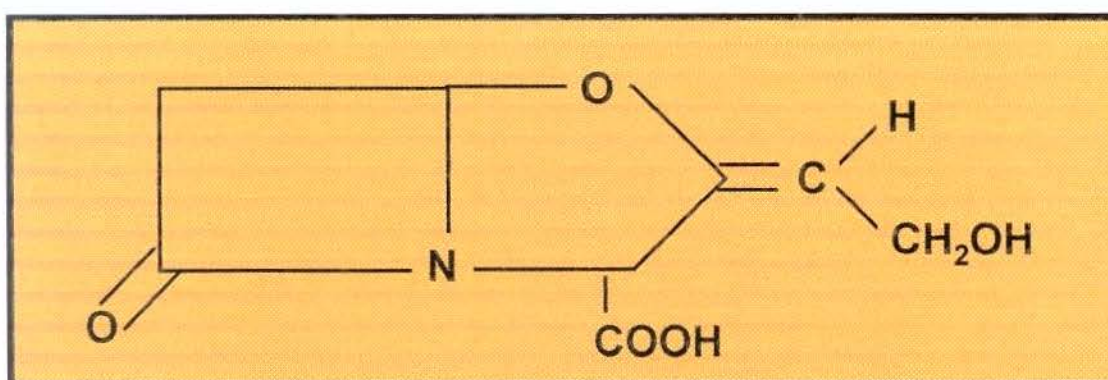


Figura 7 Fórmula estrutural do ácido clavulânico. Adaptado de Mandell & Petri, 1996.

Sua ação como droga inibidora foi exaustivamente comprovada. Inúmeros trabalhos já mostraram sua atividade como inibidor e portanto como um potencializador de drogas β -lactâmicas, especialmente penicilinas (BRYSON & BROGDEN, 1994; BUSH *et al.*, 1993; BONFIGLIO & LIVERMORE, 1994; TRABULSI & VIOTTO, 1988;

BARRY *et al.*, 1993). Em um trabalho realizado por Brogden e cols. (1982), fica evidente a ação potencializadora do clavulanato associado à amoxicilina, diminuindo em dez vezes ou mais a dose da droga necessária para atingir-se a CIM. É clara, conforme a figura 8, a ação inibidora do ácido clavulânico frente às β -lactamases.

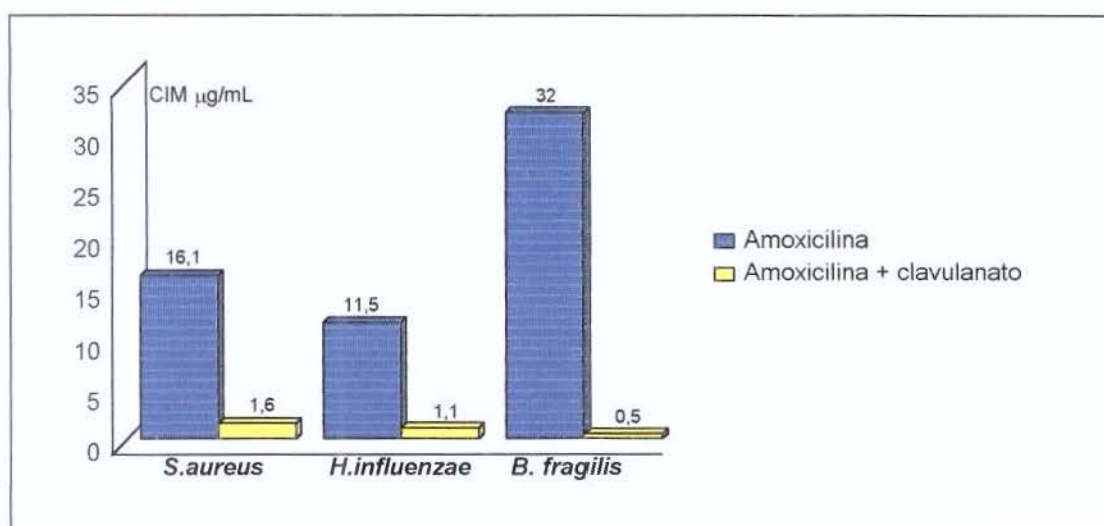


Figura 8. CIM de drogas associadas frente à microrganismos produtores de β -lactamases Adaptado de Brogden e cols., 1982.

Em um extenso estudo realizado por Bonfiglio e Livermore (1994), oitenta cepas de *S. aureus* produtoras de β -lactamase e vinte não produtoras foram testadas quanto a sua sensibilidade frente a antibióticos β -lactâmicos e frente à associações desses antibióticos com inibidores de β -lactamase. Os autores ainda classificaram as cepas e dividiram-nas conforme Richmond (1965) e Rosdahl (1973), e de acordo com Kernodle e cols. (1990) em sub-tipos A, B, C e D, testando ainda sua sensibilidade frente à associação de drogas. Os resultados são expressos na figura 9.

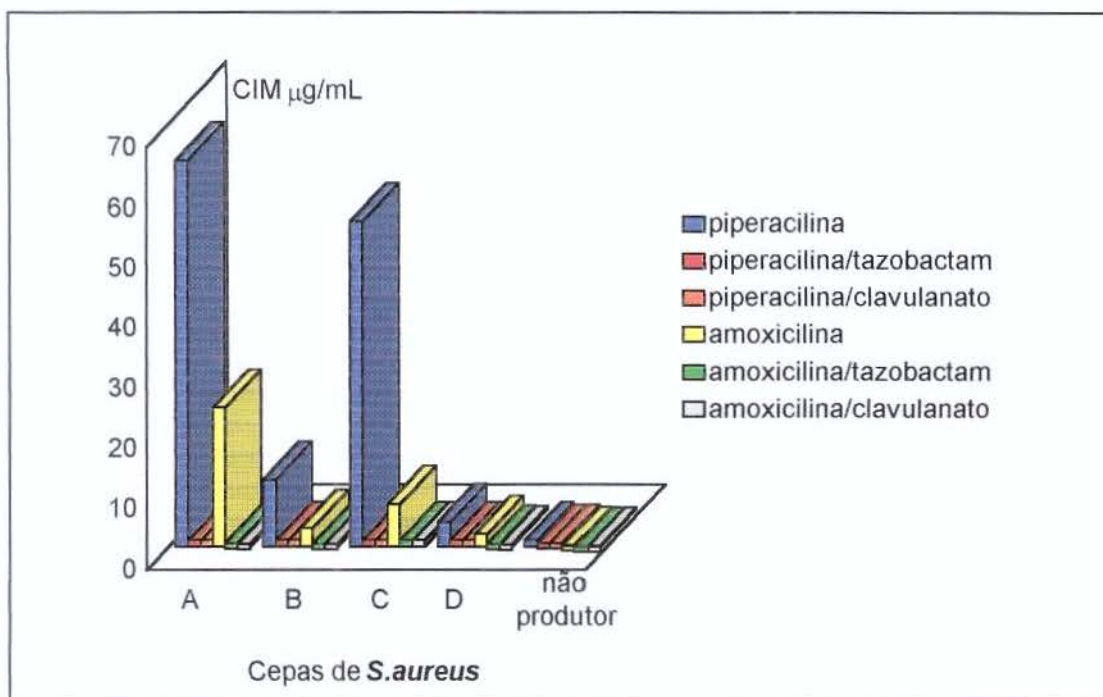


Figura 9. CIM de cepas de *S. aureus* frente à associações de antibióticos. Adaptado de Bonfiglio & Livermore, 1994.

De acordo com os dados obtidos no trabalho, fica-nos clara a ação dos inibidores da β -lactamase, quando associados à antibióticos. Quando observamos as CIMs dos antibióticos isolados, nota-se a ineficácia dessas drogas frente à bactérias produtoras de β -lactamase. Quando essas drogas são associadas aos inibidores (tazobactam ou clavulanato), a CIM cai à níveis até 10 vezes menores.

Com os dados desse estudo, nota-se também que os subtipos enzimáticos A e C são os mais ativos contra antibióticos β -lactâmicos (BONFIGLIO & LIVERMORE, 1994).

5. PROPOSIÇÃO

5. PROPOSIÇÃO

O trabalho tem por objetivos:

1. Avaliar a ação antimicrobiana da associação de um inibidor de β -lactamases (ácido clavulânico) à duas cefalosporinas (cefalexina e ceftriaxona), frente à cepas de *S.aureus* produtores e não produtores de β -lactamase.
2. Comparar os resultados obtidos *ex vivo* com os obtidos *in vitro*, buscando referendar a metodologia *ex vivo* empregada.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi basicamente dividido em duas fases. Uma avaliação da associação de drogas *ex vivo* e uma *in vitro*. Dessa forma, o item material e métodos também será apresentado em duas fases.

6.1 - FASE 1 *ex vivo*:

6.1.2 - MATERIAL E MÉTODOS

6.1.3 - **ANIMAIS** - Foram utilizados 160 ratos (*Rattus norvegicus* - albinus, Wistar), adultos jovens (em torno de 50 dias), pesando em média 180g, S.P.F.(Specific Pathogen Free), fornecidos pelo centro de bioterismo da Unicamp.

Os animais receberam ração comercial balanceada e água *ad libitum*, durante todo o experimento. No dia anterior ao início experimento, os animais foram privados de ração, para que não houvesse interferência da alimentação na absorção da droga quando administrada por via oral.

6.1.4 - MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados foram cepas de *S. aureus*, produtores e não de β -lactamases.

6.1.4.1 - Não produtores de β -lactamases - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cepa de referência para estudos com antimicrobianos (WRIGHT *et al.*, 1989; RENNEBERG & WALDER, 1988) obtida junto à Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello.

6.1.4.2 - Produtores de β -lactamases - ***Staphylococcus aureus*** obtidos junto ao Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara, Universidade Estadual Paulista - Unesp.

6.1.5 - **Identificação do microrganismo produtor de β -lactamase** - ***Staphylococcus aureus*** MM6 fagotipo 29 grupo I RSSSS.

- **Procedência:** Fossas nasais de manipuladores de alimentos.

- **Deteção e isolamento:** Material de fossas nasais foi colhido através de zaragatoa e mantido em caldo tripticase soja (TSB) por 24h a 37°C. Após esse período foi feito o isolamento em ágar sangue azida e meio Chapman. As colônias suspeitas foram caracterizadas seguindo metodologia proposta por Blair (1958). As amostras coagulase positiva foram submetidas ao antibiograma, seguindo Bauer & Kirby (1966). Esse modelo corresponde à resposta das amostras ensaiadas contra os seguintes agentes antimicrobianos (CEFAR Fármaco Diagnóstica): penicilina G (10U); estreptomicina (10 μ g); cloranfenicol (30 μ g); tetraciclina (30 μ g) e meticilina (5 μ g), sem finalidade terapêutica. Também foi realizada a fagotipagem frente aos fagos do conjunto básico internacional: grupos: I, II, III e não classificados.

- **Descrição da amostra bacteriana:**

- (R) Resistente à penicilina
- (S) Sensível à meticilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina
- Fagotipo 29 grupo I

- **Produção de β -lactamase:** A detecção e confirmação da produção de β -lactamase por esse microrganismo deu-se através de metodologia preconizada por O'Callaghan (1972). O microrganismo é

colocado em meio líquido contendo tampão fosfato pH 6,0 e ainda nitrocefina, uma cefalosporina cromogênica, que em contato com microrganismos produtores de β -lactamase hidrolisa-se alterando sua cor e a do meio. Assim, os microrganismos produtores de β -lactamase têm a capacidade de modificar a cor do meio de amarelo à vermelho em menos de 30 minutos. Para tanto, utilizou-se Kit Oxoid® Nitrocefina (SR 112 C), adquirido comercialmente (SUTTON *et al.*, 1995).

- **Deteção do sub-tipo enzimático:** Para o microrganismo produtor de β -lactamase foi ainda determinado a qual sub-tipo enzimático a amostra pertencia; A, B, C ou D, (ROSDAHL, 1973; KERNODLE *et al.*, 1990; RICHMOND, 1965). A metodologia empregada foi a preconizada por Kernodle e cols. (1990), onde o microrganismo é submetido à meios líquidos contendo soluções padrões de 100 μ mol de nitrocefina (Oxoid® SR 112 C), 100 μ mol de cefaloridina (Sigma® C 3519) e 100 μ mol de cefazolina (Sigma® C 5020). Após incubação, procedeu-se à leitura, em espectrofotômetro da taxa de hidrólise de cada droga frente ao microrganismo. A relação entre as taxas e capacidade de hidrólise, determinam o sub-tipo da β -lactamase produzida pelo *S. aureus* (FUKAGAWA, 1980).

6.1.6 - DISCOS DE ESPONJA

Os discos de policlorovinil (PVC) foram obtidos através de perfurador, ficando com 1mm de altura e 6,2 mm de diâmetro cada. Todos foram autoclavados a 120°C por 15 minutos antes do procedimento cirúrgico.

6.1.7 - MEIOS DE CULTURA

Para a manutenção da cepa foram utilizados tubos inclinados contendo meio TSA (Ágar Trypticase Soja Oxoid®)

inoculando-os a cada sete dias. No dia do experimento o microrganismo foi inoculado em meio BHI (Infuso de Cérebro Coração - Difco®), segundo Koneman e cols.(1994).

Para a disposição do tecido de granulomatoso foi utilizado o meio MHA (Ágar Mueller-Hinton - Oxoid®) sendo que a placa de Petri que recebeu os tecidos granulomatosos foi preparada da seguinte forma:

1. Com alça de platina esterilizada, foi colhida uma alçada da bactéria cultivada em TSA inclinado, respeitando-se a bactéria referente a cada grupo em questão.

2. A colônia foi então disposta em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio BHI e incubada em estufa de cultura a 37°C por 4-5 horas, para que a bactéria fosse utilizada em crescimento exponencial.

3. Após a incubação, tomou-se uma alíquota (1,0 mL) da suspensão bacteriana e diluiu-se em solução salina (NaCl 0,9%) até obtenção de uma suspensão de bactérias com densidade óptica de 60% de transmitância, a 800nm de comprimento de onda (HINDLER *et al.*, 1990).

4. Com a amostra padronizada e ajustada, transferiu-se 1,0 mL do inóculo à 99,0 mL de meio MHA, em temperatura de 45°C, obtendo-se a concentração de bactérias desejadas 10^8 u.f.c. A partir dessa concentração de bactérias presentes no meio de cultura, foi então distribuído à placas de Petri (20X150mm, 22 mL por placa).

5. As placas foram dispostas em superfície horizontal para solidificação do meio, desse modo foram preparadas para receber o tecido granulomatoso retirado do animal.

6.1.8 - DROGAS

As drogas utilizadas para administração nos animais, objeto do estudo, foram obtidas comercialmente como Cefalexina (Keflex®, pó para preparação de suspensão oral - Lilly®) e Ceftriaxona

(Rocefin[®], sob a forma de pó para administração parenteral- Roche[®]). O ácido clavulânico, sob a forma de clavulanato de potássio foi obtido junto à Glaxo[®], lote 223.

6.1.9 - METODOLOGIA

Para a obtenção de dados referentes à viabilidade da associação de cefalosporinas ao ácido clavulânico, a metodologia adotada, foi a seguinte:

1 - Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 20 grupos de oito animais cada, da maneira que se segue:

Quadro 4. Constituição dos grupos experimentais

GRUPOS	Droga ou associação administrada	Dose (mg/kg)	microrganismo <i>S aureus</i>
1	CEFALEXINA	75	NÃO PRODUTORES
2	CEFALEXINA	150	NÃO PRODUTORES
3	CEFTRIAXONA	40	NÃO PRODUTORES
4	CEFTRIAXONA	80	NÃO PRODUTORES
5	CLAVULANATO	20	NÃO PRODUTORES
6	CLAVULANATO	60	NÃO PRODUTORES
7	CEFALEXINA/CLAVULANATO	75/37,5	NÃO PRODUTORES
8	CEFALEXINA/CLAVULANATO	150/75	NÃO PRODUTORES
9	CEFTRIAXONA/CLAVULANATO	40/20	NÃO PRODUTORES
10	CEFTRIAXONA/CLAVULANATO	80/40	NÃO PRODUTORES
11	CEFALEXINA	75	β -LACTAMASE
12	CEFALEXINA	150	β -LACTAMASE
13	CEFTRIAXONA	40	β -LACTAMASE
14	CEFTRIAXONA	80	β -LACTAMASE
15	CLAVULANATO	20	β -LACTAMASE
16	CLAVULANATO	60	β -LACTAMASE
17	CEFALEXINA/CLAVULANATO	75/37,5	β -LACTAMASE
18	CEFALEXINA/CLAVULANATO	150/75	β -LACTAMASE
19	CEFTRIAXONA/CLAVULANATO	40/20	β -LACTAMASE
20	CEFTRIAXONA/CLAVULANATO	80/40	β -LACTAMASE

Os animais do grupo 1 foram tratados com cefalexina a 75 mg/kg e submetidos à teste *ex vivo* com *S.aureus* não produtores de β -lactamase. Esse procedimento foi repetido até o grupo 10, conforme o quadro 4, quando então os grupos passaram a repetir-se porém com a variação do microrganismo que do grupo 11 ao 20 foi o *S.aureus* produtor de β -lactamase.

Feita a divisão, foi seguida a rotina da metodologia empregada, conforme Mattos Filho e cols. (1994), esquematizada na figura 10.

2 - Os animais de cada grupo foram submetidos à cirurgia de implante da esponja para obtenção do tecido granulomatoso da seguinte forma:

2.1 - Anestesia do animal com éter etílico (Chemco®) em campânula de vidro;

2.2 - Tricotomia da região dorsal mediana e anti-sepsia com solução de álcool iodado a 2%;

2.3 - Incisão de aproximadamente 1cm, perpendicularmente à coluna vertebral, na derme, sem invasão de tecido muscular, com tesoura de ponta fina;

2.4 - Divulsão do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba;

2.5 - Introdução dos discos de esponja, previamente descritos, o mais distante possível da incisão, em posições laterais, uma à esquerda e outra à direita em direção à cabeça, sendo dois discos de esponja por animal;

2.6 - Sutura, com dois pontos simples, com fio de algodão número zero;

3 - Uma semana após a cirurgia, com o tecido granulomatoso já formado, cada animal recebeu a dose de antibiótico referente ao grupo a que pertencia, ou seja, os animais do grupo 1 receberam cefalexina pela via oral na dose de 75 mg/kg e assim

sucessivamente por todos os 20 grupos. Para a administração oral de drogas foi utilizada uma agulha especial (Agulha para administração oral, curva, 70X15, Arkansas®), acoplada à seringa hipodérmica. Os grupos que foram predeterminados à receber clavulanato mais cefalexina, tiveram a administração oral das duas drogas em separado, porém uma em seguida à outra. Para os grupos em que houve a determinação da administração de ceftriaxona, a mesma foi administrada com seringa hipodérmica agulhada pela via intramuscular, utilizando-se a musculatura interna da porção superior da pata traseira dos animais.

4 - Uma hora após a administração da(s) droga(s) referente à cada grupo, o animal foi anestesiado com éter etílico e em seguida sacrificado por secção do plexo carotídeo.

5 - Após a morte do animal, foi feita nova incisão no mesmo local da incisão anterior para a retirada do tecido granulomatoso formado.

6 - Esse tecido foi então retirado cuidadosamente do animal (dois tecidos por animal) e disposto assepticamente em Placas de Petri (4 tecidos por placa) com meio de cultura e bactérias previamente preparadas (descrito anteriormente Item 6.1.7). Após 24 horas de incubação a 37°C, os halos de inibição promovidos pelo antibiótico presente no tecido granulomatoso foram medidos com auxílio de paquímetro, levando-se em consideração o diâmetro total do halo de inibição, incluindo o tecido.

7 - As medidas de diâmetro dos halos obtidos foram submetidas à análise de variância seguido do teste de Tukey à nível de 5% de significância.

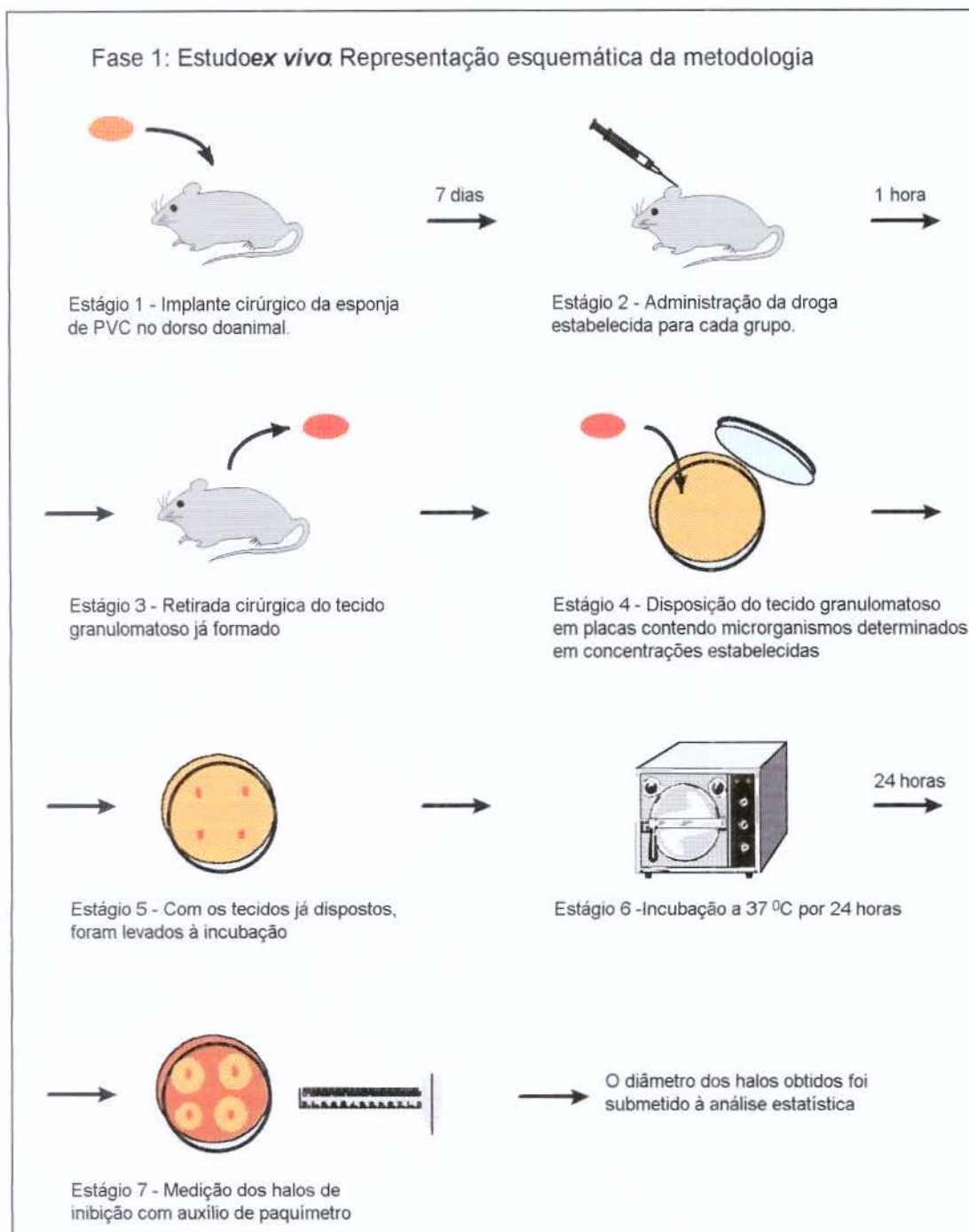


Figura 10: Esquema da metodologia da fase 1 *ex vivo*.

6.2 - FASE 2 *in vitro*:

Nessa fase do experimento foi determinada a CIM (concentração inibitória mínima) de cada associação de drogas utilizadas na fase 1 (*ex vivo*), em relação às bactérias em estudo: *S.aureus* produtores e não de β -lactamase. Para melhor desenvolvimento da metodologia, as drogas e associações testadas foram também divididas em grupos:

Quadro 5. Divisão das drogas a serem testadas em grupos.

GRUPOS	DROGA (S) OU ASSOCIAÇÕES TESTADAS	MICROORGANISMO <i>S.aureus</i>
I	CEFALEXINA	NÃO PRODUTORES
II	CEFTRIAXONA	NÃO PRODUTORES
III	CLAVULANATO	NÃO PRODUTORES
IV	CEFALEXINA/CLAVULANATO	NÃO PRODUTORES
V	CEFTRIAXONA/CLAVULANATO	NÃO PRODUTORES
VI	CEFALEXINA	β -LACTAMASE
VII	CEFTRIAXONA	β -LACTAMASE
VIII	CLAVULANATO	β -LACTAMASE
IX	CEFALEXINA/CLAVULANATO	β -LACTAMASE
X	CEFTRIAXONA/CLAVULANATO	β -LACTAMASE

Cada grupo (I ao X) foi submetido à testes de CIM, conforme descrição abaixo e figura 11:

6.2.1 Metodologia *in vitro*

1 - Foi preparada uma solução inicial da droga referente à cada grupo a ser testado, ou seja, para o grupo I preparou-se uma solução de 200 μ g/mL de cefalexina e assim para todos os grupos conforme quadro acima. Para os grupos que apresentavam associação com clavulanato, a solução inicial foi composta de 200 μ g/mL do antibiótico

mais 100 $\mu\text{g/mL}$ de clavulanato. Para os grupos III e VIII, onde o clavulanato foi testado sozinho, a solução inicial, foi de 200 $\mu\text{g/mL}$.

2 - No mesmo momento foi preparada uma suspensão contendo meia parte de meio de cultura MHB mais meia parte de uma solução salina contendo 10^6 u.f.c./mL do microrganismo referente ao grupo em questão. Essa solução de 10^6 u.f.c./mL foi obtida através de comparação espectrofotométrica com padrões da escala de Mac Farland.

3 - Após preparada, aliquotas de 1,0 mL da solução do ítem 2 (meio de cultura mais bactéria) foram colocadas em bateria de 12 tubos de ensaio com rosca, previamente esterilizados, doravante chamados 1 a 12. Após distribuição nos doze tubos, tomou-se 1,0 mL da solução da droga ou da associação de drogas a ser testada (solução do item 1) e colocou-se no tubo 1, que já continha bactérias mais meio de cultura. Promoveu-se agitação e homogeneização e, nesse momento, retirou-se 1,0 mL do tubo 1 e colocou-se no tubo 2, agitou-se e homogeneizou-se e novamente 1,0 mL foi retirado e passado ao tubo 3 e assim sucessivamente até o tubo 12, de modo que se obtivesse uma diluição sucessiva da droga a ser testada. Dessa forma os tubos 1 a 12 apresentaram as seguintes composições:

Quadro 6. Composição dos tubos

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bactéria 10^6 u.f.c. (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
meio MHB (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Conc droga ($\mu\text{g/mL}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,045

4 - Além dos doze tubos de teste, ainda foram preparados mais dois tubos semelhantes ao tubo 12. Um desses tubos sem a presença de bactérias, serviu como controle de esterilidade de todo o processo.

Se houvesse qualquer tipo de contaminação nesse tubo todos os resultados do grupo seriam desprezados. O outro tubo foi preparado também como o tubo 12, porém não foi adicionado a ele qualquer substância antibiótica, servindo como controle de crescimento da bactéria. Se por qualquer motivo não houvesse crescimento bacteriano nesse tubo, todos os resultados do grupo seriam desprezados. Foi utilizado como controle de crescimento.

5 - Após preparada, a bateria de tubos foi incubada a 37°C por 24 horas e observou-se então quais tubos apresentaram crescimento, determinado pela turbidez do meio. O tubo de menor concentração de antibiótico que não apresentou crescimento, foi determinado como a CIM, ou seja a concentração mínima do antibiótico ou da associação, capaz de inibir o crescimento bacteriano.

6 - Nesse mesmo momento foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do tubo que apresentou a CIM e de dois adjacentes com concentrações imediatamente maiores. Essas alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio MHA sem qualquer substância antibiótica e então incubadas a 37° C por mais 24 horas para estabelecer-se a CBM (Concentração bactericida mínima), ou seja, determinar se realmente aquele tubo que aparentemente não apresentou turvação, e portanto crescimento, continha qualquer bactéria viva e portanto viável. Esse teste teve o intuito de verificar se droga testada atuou como antibiótico bacteriostático ou bactericida.

Toda essa metodologia foi conduzida de acordo com instruções de Moura e cols. (1994) em duplicata, com os mais rigorosos padrões de esterilização.

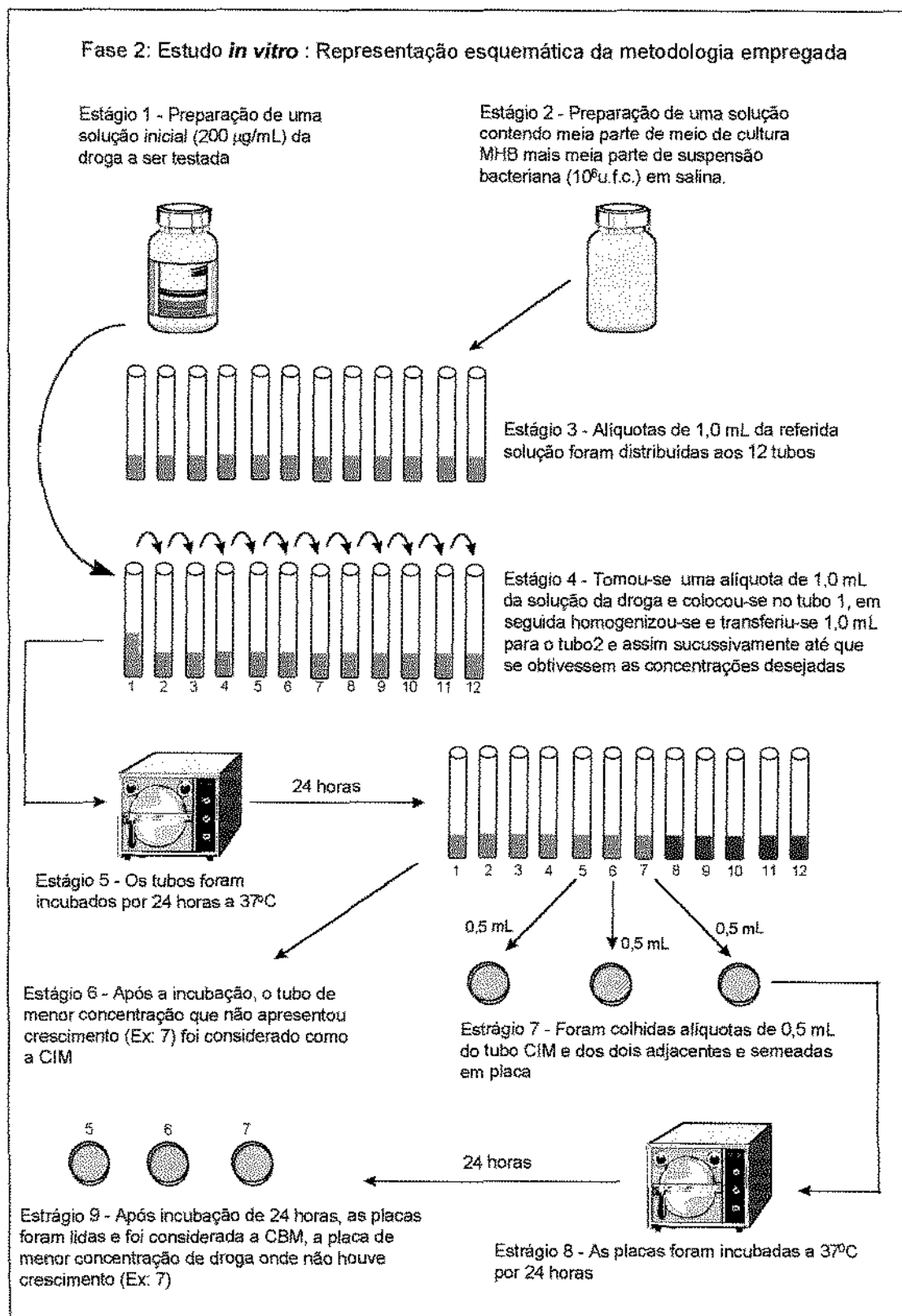


Figura 11:Esquema da metodologia da fase 2 *in vitro*.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

I - Para as análises preliminares de confirmação do microrganismo produtor de β -lactamase temos que: o teste preconizado por O'Callaghan e cols. (1972) apresentou resultado positivo, ou seja, o meio apresentou virada de cor, de amarelo à vermelho em menos de 30 minutos, caracterizando e confirmando a presença de β -lactamase.

II - Para a detecção do sub-tipo enzimático e de acordo com a metodologia empregada por Kernodle e cols. (1990), os resultados de hidrólise das cefalosporinas empregadas determinaram que o microrganismo era produtor de β -lactamase do sub-tipo C.

Os resultados serão apresentados de acordo com a divisão da metodologia empregada, iniciando com os testes *ex vivo*.

7.1 - Resultados dos testes *ex vivo*:

7.1.2 - Para a cefalexina temos:

Tabela 1. Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm), número de amostras para cada grupo e desvio padrão.

GRUPOS	1	2	7	8	11	12	17	18
halo (mm)	21,51	25,92	22,31	27,19	0,00	0,00	20,70	22,57
n	7	6	8	7	8	8	7	5
S.D.	0,84	1,77	1,28	0,94	0,0	0,0	0,93	1,16

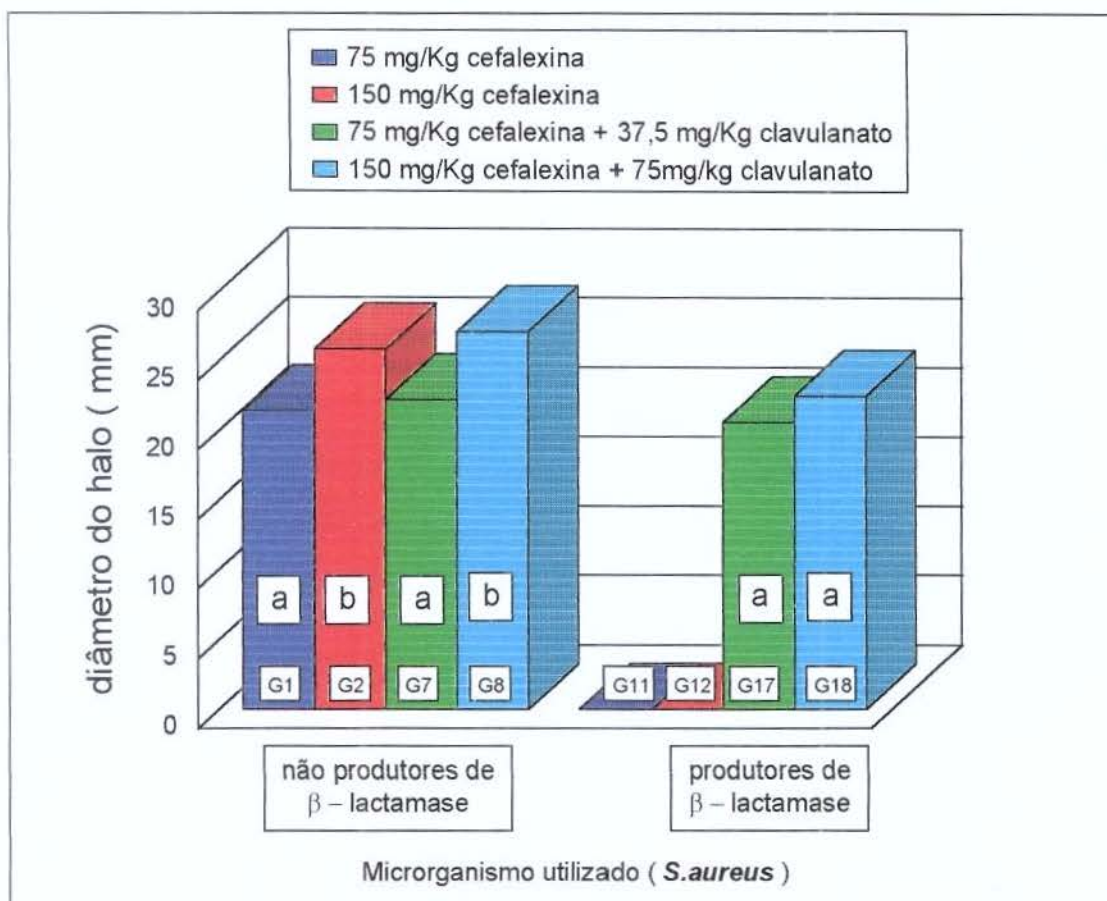


Figura 12. Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados, letras distintas diferem entre si a nível de 5% de significância.

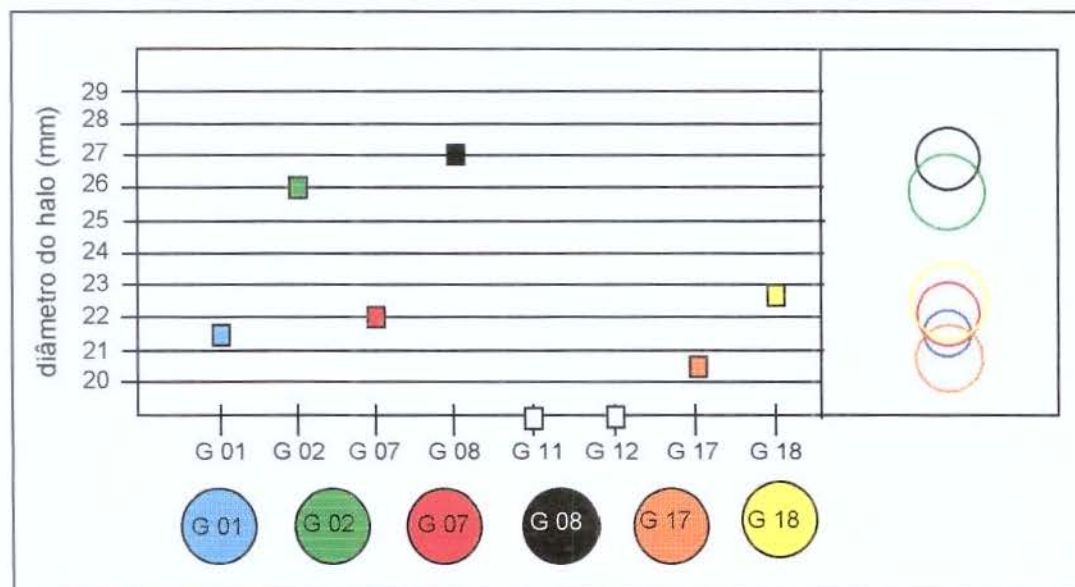


Figura 13. Análise estatística dos dados, comparação entre as médias - Tukey - Kramer 0,05 - Círculos em intersecção, não apresentam diferença estatística.

De posse dos dados da tabela 1 e figura 12, nota-se que:

1 - Quando houve a adição de clavulanato à cefalexina, em microrganismos não produtores de β -lactamase, essa adição não impôs qualquer alteração significativa no tamanho dos halos obtidos, quer seja para a menor dose, 75 mg/kg (grupos 1 e 7), quer seja para a dose de 150 mg/kg (grupos 2 e 8). Dessa forma a adição de ácido clavulânico não interferiu na atividade antimicrobiana da cefalexina em ausência de β -lactamase.

2 - Ao observar-se os grupos 11 e 12, ou seja quando a cefalexina foi administrada isoladamente frente à microrganismos produtores de β -lactamase, nota-se sua ineficácia, visto que não apresentou qualquer halo de inibição, tanto para a dose de 75 mg/kg (grupo 11) como para a dose de 150 mg/kg (grupo 12), mostrando claramente a ação das β -lactamases produzidas por esses microrganismos, levando à inatividade da droga.

3 - A adição de clavulanato à cefalexina em microrganismos produtores de β -lactamase aumenta muito sua atividade (grupos 17 e 18), ao contrário dos grupos 11 e 12 em que a cefalexina é administrada isoladamente e não há qualquer halo. Nos grupos 17 e 18 (75 e 150 mg/kg de cefalexina mais clavulanato) o tamanho dos halos obtidos é comparável à ação da cefalexina isolada em ausência de β -lactamase (grupos 1 e 2). Isso mostra a ação direta do ácido clavulânico bloqueando a atividade das β -lactamases, permitindo que a cefalexina atue livremente na parede do *S. aureus*.

4 - De acordo ainda com os dados em questão nota-se claramente, ao compararmos os grupos 1 com 2, 7 com 8 e 17 com 18 ou seja, quando houve aumento da dose, que esse aumento refletiu no tamanho do halo. Portanto, revela-se uma relação direta, porém não proporcional, já que houve um aumento estatisticamente significativo do halo (exceção aos grupos 17 e 18) quando dobrou-se a dose, porém sem a mesma proporção.

7.1.3 - Para a ceftriaxona temos:

Tabela 2. Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm), número de amostras para cada grupo e desvio padrão.

GRUPOS	3	4	9	10	13	14	19	20
halo (mm)	15,26	18,83	16,31	19,36	12,32	14,34	16,23	19,31
N	7	5	7	8	6	7	8	7
S.D.	1,02	0,90	1,00	1,08	1,40	1,00	0,99	1,65

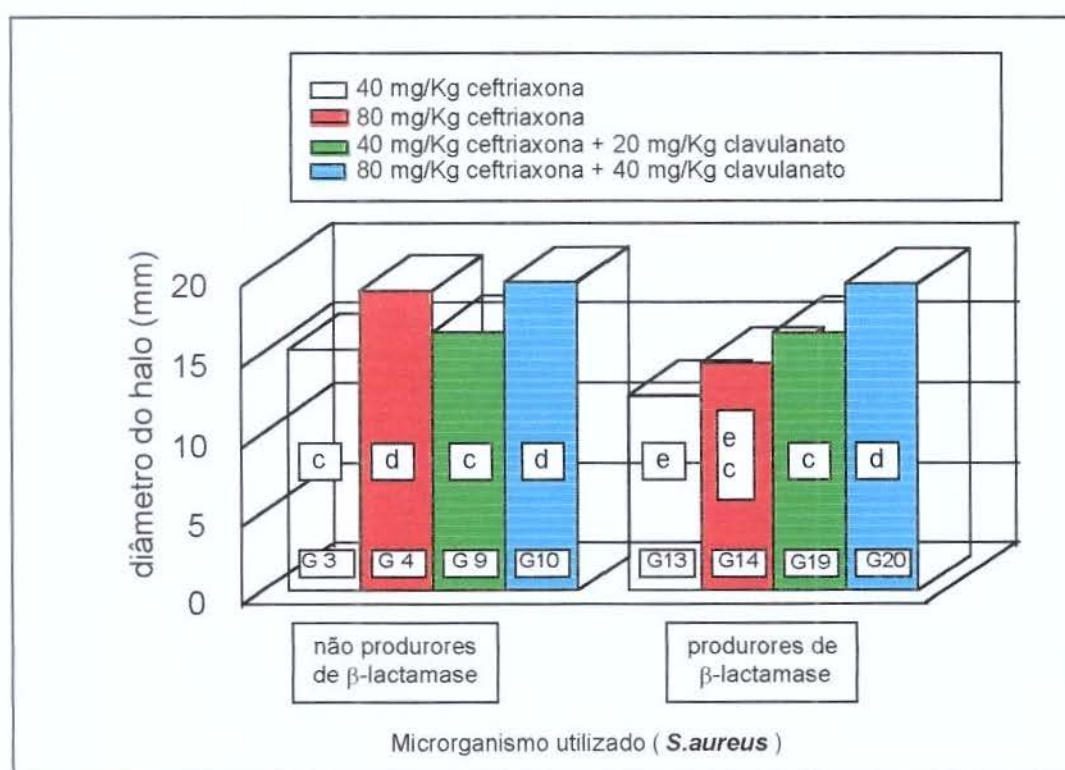


Figura 14. Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados, letras distintas diferem entre si a nível de 5% de significância.

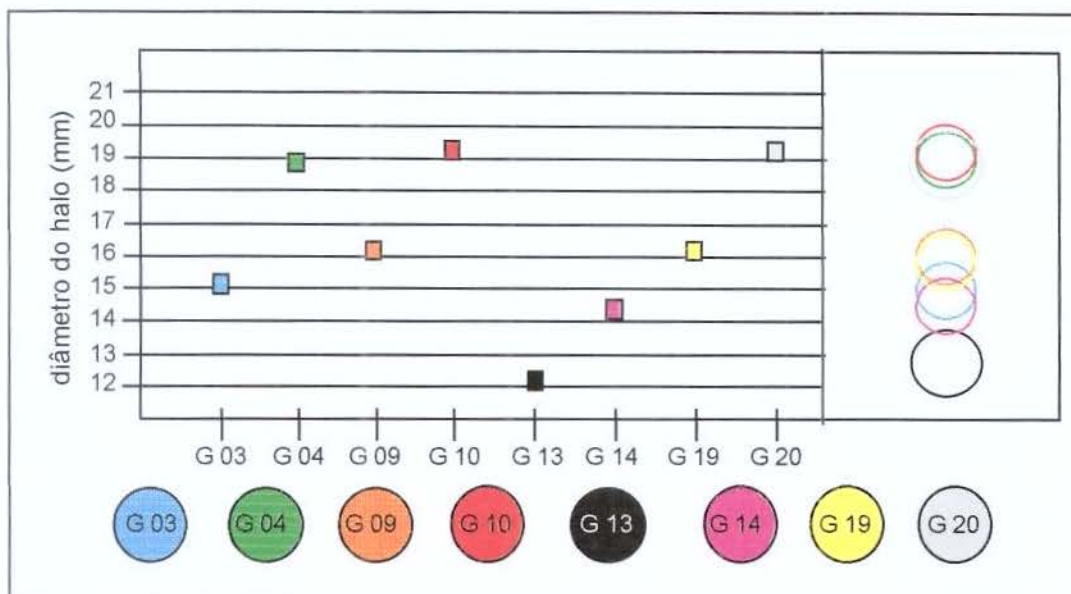


Figura 15. Análise estatística dos dados, comparação entre as médias - Tukey - Kramer 0,05
- Círculos em intersecção, não apresentam diferença estatística.

De posse dos dados da tabela 2 e figura 14, temos que:

1 - Quando compara-se os grupos 3 com 9 e 4 com 10, ou seja a adição de ácido clavulânico à ceftriaxona frente à microrganismos não produtores de β -lactamase, nota-se que não houve qualquer diferença. Dessa forma a adição de ácido clavulânico à ceftriaxona mostra os mesmos resultados da ceftriaxona quando administrada isoladamente, independente da dose.

2 - Em microrganismos produtores de β -lactamase, a ceftriaxona mostrou-se ativa, mesmo administrada isoladamente, fornecendo médias de diâmetro de halos entre 12,32mm e 14,34mm para os grupos 13 e 14 respectivamente.

3 - Quando comparam-se os grupos 3 com 13 e 4 com 14, ou seja a ceftriaxona administrada isoladamente em microrganismos não produtores e produtores de β -lactamase, nota-se que; em presença da enzima ocorre uma diminuição, estatisticamente significativa, da atividade da droga frente à esses microrganismos.

4 - Quando adiciona-se ácido clavulânico à ceftriaxona frente à microrganismos produtores de β -lactamase, grupos 13, 14 e 19, 20, fica

claro o aumento, estatisticamente significante, em sua ação mostrando mais uma vez a ação inibidora do ácido clavulânico frente às β -lactamases.

5 - De forma semelhante à cefalexina, o aumento da dose em qualquer das situações refletiu em aumento significativo do tamanho do halo, estabelecendo novamente uma relação direta e não diretamente proporcional entre dose administrada e tamanho de halo. Todas as diferenças entre doses foram estatisticamente significantes. Grupos 3 com 4, 9 com 10, 19 com 20, fazendo-se exceção aos grupos 13 com 14 que apresentaram diferença sem significado estatístico.

7.1.4 - Para os resultados referentes à administração isolada de ácido clavulânico, temos:

Tabela 3. Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm), número de amostras para cada grupo e desvio padrão.

GRUPOS	5	6	15	16
halo (mm)	0,0	0,0	0,0	0,0
N	7	8	8	8
S.D.	0	0	0	0

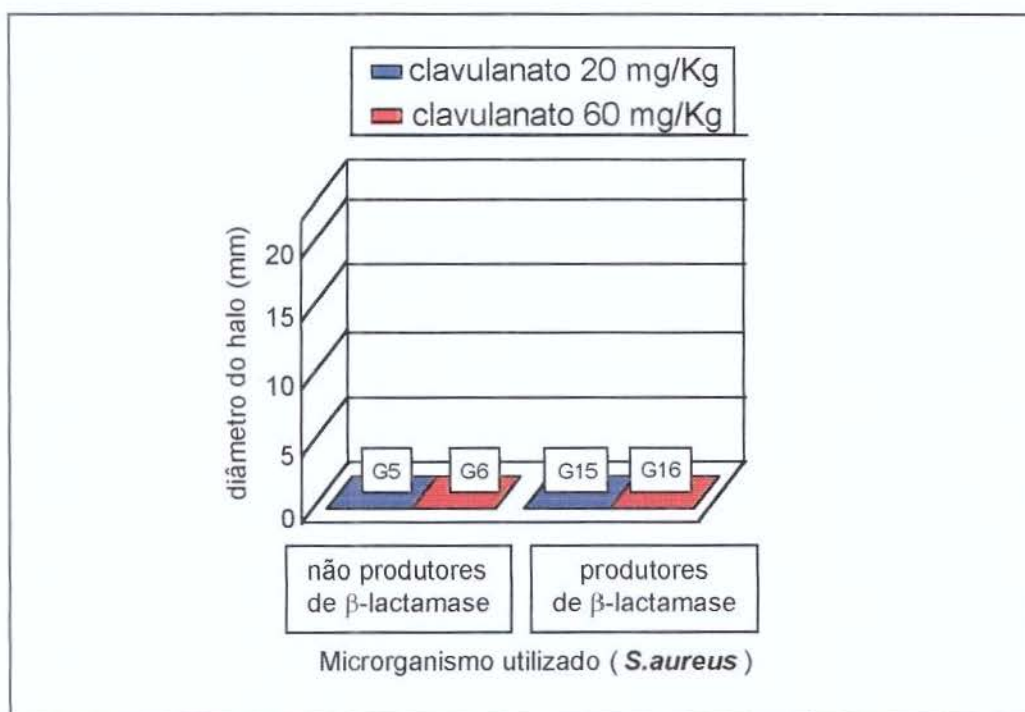


Figura 16. Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados.

De posse dos dados da tabela 3 e figura 16, nota-se claramente que o ácido clavulânico quando administrado isoladamente (grupos 5, 6, 15 e 16) não produziu qualquer halo em qualquer circunstância, não exercendo portanto qualquer ação antimicrobiana em nenhum dos microrganismos testados.

Para uma melhor compreensão dos resultados, reapresentamos os resultados dos testes *ex vivo*, divididos não em função da droga, mas em função do microrganismo testado.

7.1.5 - Para os microrganismos não produtores de β -lactamase, temos:

Tabela 4. Média dos diâmetros dos halos de inibição (mm), número de amostras para cada grupo e desvio padrão.

GRUPOS	1	2	7	8	3	4	9	10
halo (mm)	21,51	25,92	22,31	27,19	15,26	18,83	16,31	19,36
N	7	6	6	7	7	5	7	8
S.D.	0,84	1,77	1,28	0,94	1,02	0,90	1,00	1,08

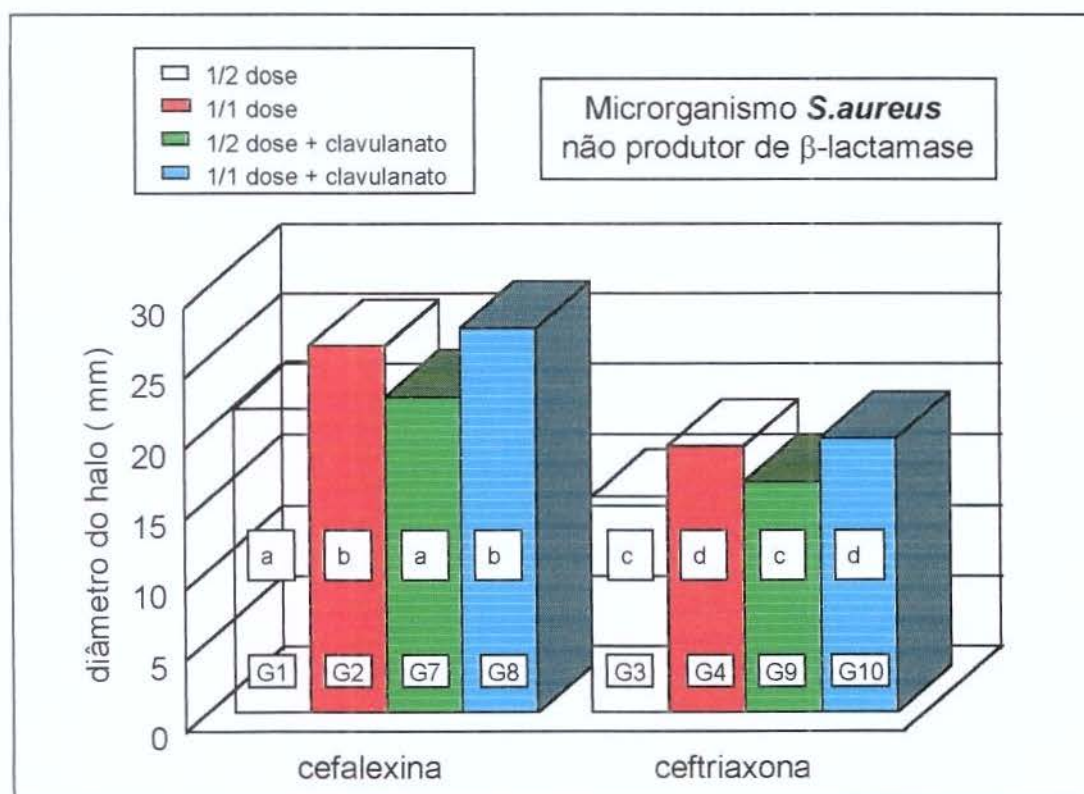


Figura 17. Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados, letras distintas diferem entre si a nível de 5% de significância.

De posse dos dados da tabela 4 e figura 17, temos que:

1 - Em bactérias não produtoras de β -lactamase e nas condições do experimento, a cefalexina apresentou melhores resultados quando comparada à ceftriaxona em qualquer tratamento independente da adição de clavulanato, ou seja quando comparam-se os grupos 1 com 3; 2 com 4; 7 com 9 e 8 com 10. Todas as diferenças apresentadas foram estatisticamente significantes.

7.1.6 - Para os microrganismos produtores de β -lactamase, temos:

Tabela 5. Média dos diâmetros dos halos de inibição, número de amostras para cada grupo e desvio padrão.

GRUPOS	11	12	17	18	13	14	19	20
HALO (mm)	0,00	0,00	20,70	22,57	12,32	14,34	16,23	19,31
N	8	8	7	5	6	7	8	7
S.D.	0,0	0,0	0,93	1,16	1,40	1,00	0,99	1,65

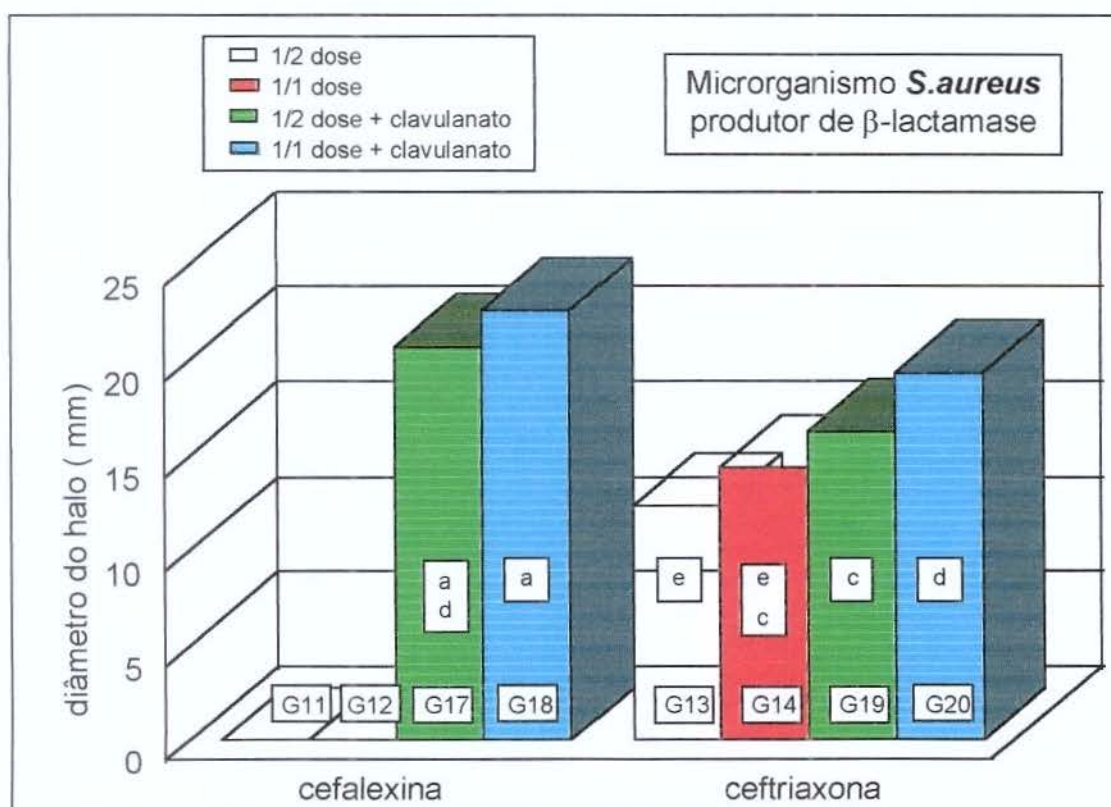


Figura 18. Médias dos halos obtidos (mm) em função dos tratamentos empregados, letras distintas diferem entre si a nível de 5% de significância.

De posse dos dados da tabela 5 e figura 18, temos que:

1 - Em presença de β -lactamase, a cefalexina administrada isoladamente perde completamente sua atividade (grupos 11 e 12), ao contrário da ceftriaxona que mantém-se ativa (grupos 13 e 14) mostrando-se mais estável frente a microrganismos produtores da enzima.

2 - Com a adição de clavulanato, a cefalexina volta a apresentar melhores resultados, ou seja um maior diâmetro de halo (grupos 17 e 18) quando comparada à ceftriaxona associada ao clavulanato (grupos 19 e 20).

7.2 - Resultados dos testes *in vitro*:

De acordo com a metodologia empregada obtivemos os resultados *in vitro* referentes à CIM (concentração inibitória mínima) para cada droga ou associação em função de cada microrganismo. A tabela 6 mostra esses resultados:

Tabela 6: CIM ($\mu\text{g/mL}$) das drogas testadas em função dos microrganismos: *S.aerues*, produtores e não de β -lactamase.

DROGAS	Não produtores (GRUPO)	Produtores (GRUPO)
CEFALEXINA	1,56 (I)	12,5 (VI)
CEFTRIAXONA	3,12 (II)	6,25 (VII)
CEFALEXINA + CLAVULANATO	1,56 (IV)	3,12 (IX)
CEFTRIAXONA + CLAVULANATO	3,12 (V)	3,12 (X)
CLAVULANATO	+ 100 (III)	+ 100 (VIII)

Em função dos resultados obtidos com os testes *in vitro*, nota-se que:

1 - A cefalexina apresentou a menor CIM, ou seja maior atividade em ausência de β -lactamase (grupo I). Quando em presença

de microrganismos produtores da enzima (grupo VI) perde muito sua atividade, elevando a CIM a valores em torno de 12,5 µg/mL.

2 - Na comparação da atividade da ceftriaxona com a cefalexina em ausência de β-lactamase, nota-se uma maior atividade da cefalexina (grupo I com II). Em presença de β-lactamase esse resultado inverte-se (grupos VI e VII), mostrando menor CIM e portanto maior atividade para a ceftriaxona, quando comparada à cefalexina.

3 - Em microrganismos não produtores β-lactamase, a adição de clavulanato não interferiu na atividade antimicrobiana das drogas, ou seja em ausência ou presença de clavulanato associado às drogas, suas CIMs mantiveram-se as mesmas (grupo I com IV e II com V).

4 - Em presença da enzima (β-lactamase), a adição de clavulanato às drogas testadas aumentou sua ação, havendo uma diminuição da CIM para as duas drogas testadas. Para a cefalexina, uma diminuição de 12,5 (grupo VI) para 3,12 µg/mL (grupo IX) e para a ceftriaxona, uma queda de 6,25 (grupo VII) para também 3,12 µg/mL (grupo X), mostrando mais uma vez a ação inibidora do clavulanato frente à β-lactamases.

Os resultados encontrados para a CBM (Concentração bactericida mínima) da(s) droga(s) e/ou associações testadas foram as mesmas das CIMs, ou seja o tubo que não apresentou turvação, e aparente ausência de crescimento bacteriano, quando repicado em placas com meio nutritivo também não apresentou crescimento. Dessa forma as CIMs atingidas pelas drogas frente aos microrganismos atuaram também como bactericidas, ou seja, na concentração em que houve a inibição do crescimento houve também a morte do microrganismo, e não apenas ação bacteriostática da droga, caracterizando as drogas como bactericidas.

7.3 - Comparação entre os testes *in vitro* e *ex vivo*.

7.3.1 - A figura 19 mostra uma confrontação dos resultados obtidos *ex vivo* e *in vitro*, em presença de microrganismos não produtores de β -lactamase.

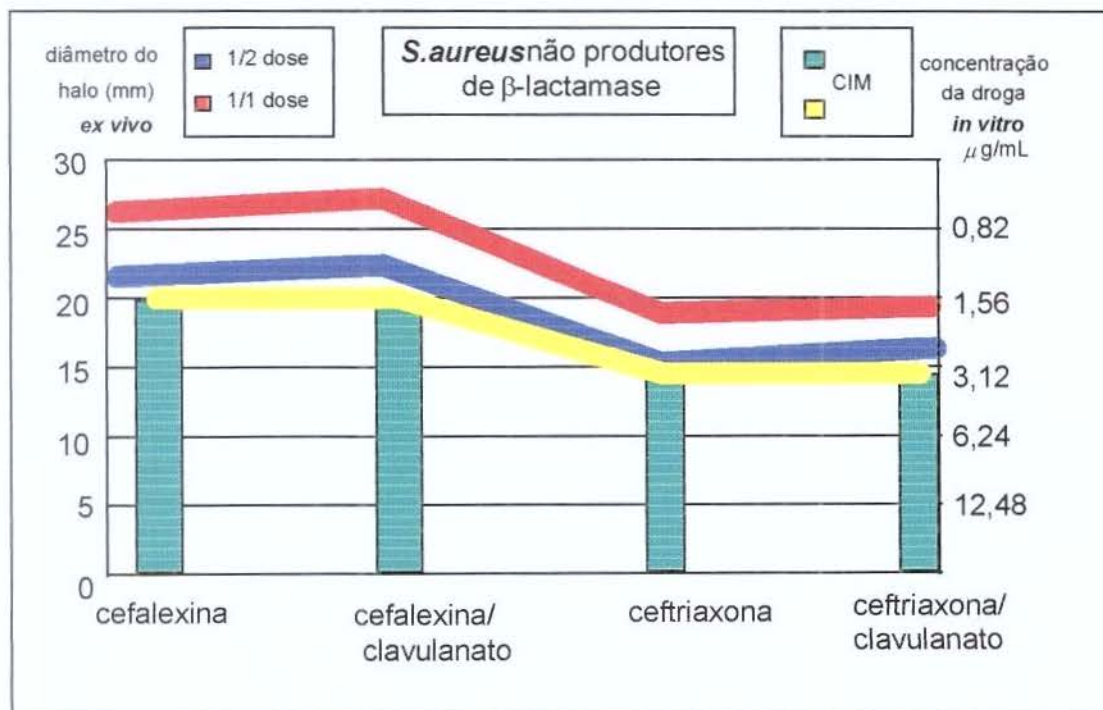


Figura 19. Comparação dos valores obtidos *ex vivo* (mm) com os obtidos *in vitro* ($\mu\text{g/mL}$).

Na observação dos dados da figura 19 nota-se uma íntima relação entre os resultados obtidos *ex vivo* (linhas; azul com $\frac{1}{2}$ dose e vermelha com dose inteira) com os obtidos *in vitro* (barras em verde e linha amarela, CIM [$\mu\text{g/mL}$]), revelando ambos os testes perfis similares para as duas drogas, associadas ou não ao ácido clavulânico.

7.3.2 - A figura 20 mostra uma confrontação dos resultados obtidos *ex vivo* e *in vitro*, em presença de microrganismos produtores de β -lactamase.

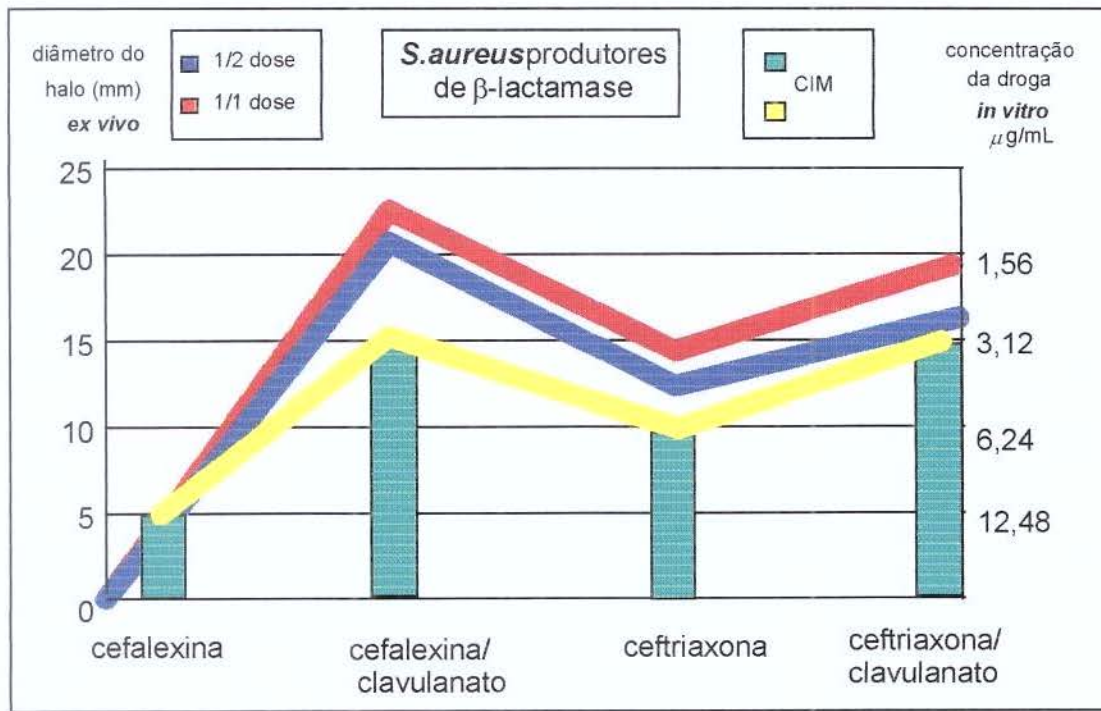


Figura 20. Comparação dos valores obtidos *ex vivo* (mm) com os obtidos *in vitro* ($\mu\text{g/mL}$).

Ao exame dos dados da figura 20 nota-se novamente uma estreita relação entre os resultados *ex vivo* (linhas vermelha e azul) e *in vitro* (linha amarela e barras verdes). Da mesma forma que em microrganismos não produtores, nos produtores revela-se para ambos testes, perfis similares para as duas drogas, associadas ou não ao ácido clavulânico.

8. DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão discutidos separadamente, de acordo com a apresentação dos mesmos.

8.1 - FASE *in vitro*:

8.1.2 - **CEFALEXINA** - Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos para microrganismos não produtores de β -lactamase (grupo I) foram de 1,56 $\mu\text{g/mL}$. Valores próximos a esse foram encontrados por Lacey & Stokes (1977), que mesmo utilizando metodologia diferente, determinaram a CIM para ***S.aureus*** não produtores de β -lactamase em torno de 1,64 $\mu\text{g/mL}$. Perkins e cols. (1968), ao empregar metodologia semelhante à aplicada neste experimento, encontrou valores em torno de 1,95 $\mu\text{g/mL}$, também próximos aos aqui encontrados. Orsolini (1970) encontra valores de 1,6 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados encontrados neste trabalho vêm ao encontro da literatura no que diz respeito à aplicabilidade da droga, ou seja torna-a útil em infecções em que o patógeno associado é o ***S. aureus*** não produtor de β -lactamase (RODRIGUES *et al.*, 1997; MANDELL & PETRI, 1996; NEU, 1990).

Ainda para a cefalexina, porém frente à microrganismos produtores de β -lactamase, os valores da CIM *in vitro* obtidos foram em torno de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (grupo VI). Com relação à ação da droga frente a esses microrganismos a literatura é vasta e mostra valores diversos como: 1,56 a 3,13 $\mu\text{g/mL}$ (TAKENOUCHI *et al.*, 1994); 1,84 $\mu\text{g/mL}$ a 6,6 $\mu\text{g/mL}$ (LACEY & STOKES, 1977); 7,8 $\mu\text{g/mL}$ (PERKINS *et al.*, 1968) e 2,5 a 16,0 $\mu\text{g/mL}$ (FARRAR & O'Dell, 1978). Embora empregando metodologias semelhantes os autores encontraram valores diversos, apesar disso os mesmos harmonizam-se ao não aconselharem seu uso

em infecções quando o microrganismo associado é produtor de β -lactamase. Takenouchi e cols.(1994) citam: "A cefalexina não deve ser usada terapêuticamente em infecções associadas à **S.aureus** produtores de β -lactamase.". Perkins e cols. (1968) relatam que "de acordo com os dados de sensibilidade obtidos, far-se-á necessária uma grande quantidade de cefalexina para tratamento dessas infecções". Lacey e Stokes (1977) ainda concluem: "...todavia, parece pouco inteligente fazer-se uso de cefalexina em infecções estafilocócicas associadas à β -lactamase". Isto posto, os resultados desse trabalho (12,5 μ g/mL) estão de acordo com o alerta dos referidos autores mostrando a pouca eficácia dessa droga frente à esses microrganismos, não sendo portanto, prudente seu uso nesses casos.

8.1.3 - **CEFTRIAXONA** - Nas condições em que foi realizado o experimento, a droga apresentou CIM de 3,12 μ g/mL (grupo II) para **S. aureus** não produtores de β -lactamase, valor muito semelhante aos encontrados na literatura, ou seja Cleeland e Squires (1984) 5,00 μ g/mL; Paradis e cols. (1992) de 4,0 a 8,0 μ g/mL e Moellering e Swartz (1984) de 2,0 a 6,0 μ g/mL. Os resultados obtidos no presente estudo e os encontrados por outros autores estão de acordo, já que mostram a ceftriaxona com atividade intermediária frente à **S. aureus** não produtores de β -lactamase. Cleeland e Squires (1984) relatam que: "A droga apresentou moderada atividade contra o microrganismo". Outros autores, como Reese e Betts (1995), destacam que: "Embora não seja tão ativa como as cefalosporinas de primeira e segunda gerações contra **S. aureus**, a ceftriaxona possui CIM razoáveis (4,0 μ g/mL) para esses microrganismos". Os mesmos autores ainda citam: "Em pacientes com infecções estafilocócicas graves documentadas (**S.aureus**) não usaríamos uma cefalosporina de

terceira geração como antibiótico de escolha, preferindo uma penicilina anti-estafilocócica ou uma cefalosporina de primeira geração”.

Com os resultados do presente trabalho aliado ainda à literatura fica clara a não conveniência da escolha dessa droga para o tratamento de infecções onde o microrganismo é o *S.aureus*.

Para os resultados referentes à ação da ceftriaxona frente à *S.aureus* produtores de β -lactamase obteve-se no presente estudo CIM de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (grupo VII). Para essa mesma metodologia e microrganismo, a literatura mostra valores entre 4,3 e 4,7 $\mu\text{g/mL}$ (CLEELAND & SQUIRES, 1984) valores muito semelhantes aos encontrados no presente estudo.

8.1.4 - ÁCIDO CLAVULÂNICO - Os resultados referentes à CIM do ácido clavulânico frente aos dois microrganismos utilizados nesse experimento apresentaram-se muito acima da diluição utilizada, ou seja mais de 100 $\mu\text{g/mL}$ (grupos III e VIII), caracterizando sua ineficácia como antibacteriano quando usado isoladamente. Chang e cols. (1995) ao realizarem a mesma metodologia, porém utilizando uma escala de diluição mais abrangente, encontram como valores de CIM para o ácido clavulânico mais de 256 $\mu\text{g/mL}$, o que vem confirmar os resultados obtidos no presente estudo que mostram sua ineficácia antibiótica.

8.1.5 - ASSOCIAÇÃO DAS DROGAS AO ÁCIDO CLAVULÂNICO

Os resultados de CIM referentes à associação das cefalosporinas ao ácido clavulânico mostrou que: quando associado às cefalosporinas e frente a microrganismos não produtores de β -lactamase, a ação antibacteriana da droga não se altera mantendo-se com os mesmos valores de CIM, tanto para a cefalexina (1,56 $\mu\text{g/mL}$,

grupos I e IV) como para a ceftriaxona (3,12 µg/mL, grupos II e V). Esses resultados estão de acordo com os de outros autores, que ao testarem associações de ácido clavulânico com penicilinas caracterizam a ação do ácido clavulânico apenas como de um inibidor de β -lactamase e não de um antibacteriano propriamente dito (LIVERMORE, 1994; BRYSON & BROGDEN, 1994; GEHANNO *et al.*, 1994).

Quando o ácido clavulânico foi testado associado à cefalexina em presença de β -lactamase (grupo IX), obteve-se uma CIM de 3,12 µg/mL, bem menor do que a encontrada para a mesma droga quando testada isoladamente (12,5 µg/mL, grupo VI). O mesmo ocorreu quando associou-se o ácido clavulânico à ceftriaxona, ou seja sua CIM foi diminuída de 6,25 µg/mL, quando testada isoladamente (grupo VII), para 3,12 µg/mL, quando associada ao ácido clavulânico (grupo X). Esses resultados vêm referendar os dados encontrados na literatura que mostram que, penicilinas associadas ao ácido clavulânico têm sua ação incrementada, deixando clara, no presente estudo, a ação inibidora de β -lactamases pelo ácido clavulânico quando associado à cefalosporinas de primeira e terceira gerações (CHANG *et al.*, 1995; LIVERMORE, 1994; TRABULSI & VIOTTO, 1988; BRYSON & BROGDEN, 1994; GEHANNO *et al.*, 1994).

8.2. - FASE *ex vivo*

De acordo com a metodologia empregada pode-se observar que; em bactérias não produtoras de β -lactamase, a cefalexina apresentou os melhores resultados quando comparada à ceftriaxona, ou seja maior diâmetro de halo, comprovando assim os achados da literatura que referendam e indicam o uso de cefalosporinas de primeira geração em infecções por gram positivos ao

invés de cefalosporinas de terceira geração (RODRIGUES *et al.*, 1997; MANDELL & PETRI, 1996; NEU, 1990; REESE & BETTS, 1995).

Em presença de β -lactamase a cefalexina torna-se pouco útil, visto que tanto os resultados *ex vivo* como *in vitro* demonstraram sua vulnerabilidade frente à enzima. Nessa situação, a ceftriaxona apresentou uma maior estabilidade quando comparada à cefalexina. Esses resultados estão em conformidade com os achados da literatura. Cleeland e Squires (1984) citam: "A ceftriaxona apresenta excelente estabilidade frente à β -lactamases". Tavares (1996) ao relatar o espectro de atividade da ceftriaxona, aponta-a como "mais estável frente à β -lactamases que as cefalosporinas de primeira e segunda gerações". Mandell e Petri (1996) citam ainda que: "As drogas de terceira geração apresentam alta resistência às β -lactamases produzidas por germes gram positivos e gram negativos". Isto posto, e em conformidade com os resultados encontrados no presente estudo, fica mais do que claro que as drogas de terceira geração (ceftriaxona) são mais estáveis do que as de primeira (cefalexina) em relação às β -lactamases.

Com os resultados obtidos *ex vivo*, fica evidente a ação potencializadora do ácido clavulânico associado à cefalosporinas frente à germes produtores de β -lactamase. Estudos com essa associação inexistem na literatura, apenas encontram-se os que relatam a associação de penicilinas à inibidores de β -lactamase. Os inúmeros estudos dessa associação (CHANG *et al.*, 1995; LIVERMORE, 1994; TRABULSI & VIOTTO, 1988; BRYSON & BROGDEN, 1994; GEHANNO *et al.*, 1994) são unânimes em mostrar, como no presente estudo, a ação inibidora do ácido clavulânico frente à β -lactamases.

8.3 - FASE *ex vivo* versus *in vitro*

Conforme estabelecido na proposição do presente estudo, um dos objetivos foi comparar os testes *ex vivo* e *in vitro* buscando referendar o modelo experimental empregado - tecido granulomatoso (MATTOS FILHO *et al.*, 1994). De posse de todos os dados obtidos no experimento e comparados entre si, figuras 19 e 20, fica-nos clara a correlação íntima dos resultados, ou seja os resultados obtidos *ex vivo* foram exatamente os mesmos dos obtidos *in vitro*. O comportamento antimicrobiano das drogas e das associações foi representado pelo mesmo perfil para ambos os testes. Esses dados sugerem-nos então uma correlação muito estreita entre os testes, mostrando ser o modelo *ex vivo* empregado de grande valia e utilidade na avaliação do poder antimicrobiano de drogas.

Embora saibamos do alto custo de mercado das cefalosporinas, a associação desses medicamentos ao ácido clavulânico pode vir a se excelente alternativa em odontologia, quando estivermos frente à infecções produzidas por germes produtores de β -lactamases.

9. CONCLUSÃO

9. CONCLUSÃO

Fundamentado nos resultados obtidos, de acordo com a metodologia empregada e com base na literatura, pode-se concluir que:

1. A cefalexina (1ª geração) mostra-se mais eficiente que a ceftriaxona (3ª geração) frente à ***S.aureus*** não produtores de β -lactamase.
2. Quando em presença de ***S.aureus*** produtores de β -lactamase, a ceftriaxona apresenta-se mais estável quando comparada à cefalexina.
3. A associação de ácido clavulânico aumenta a atividade antibacteriana das cefalosporinas testadas em presença de β -lactamase, revelando uma relação sinérgica, não interferindo em sua ação na ausência da enzima.
4. A metodologia **ex vivo** empregada mostrou reprodutibilidade quando comparada à testes clássicos e preconizados de CIM **in vitro**.

10. ANEXOS

10. ANEXOS

Anexo 1 - Valores obtidos do halo de inibição (mm) para os grupos, número de amostras por grupo e desvio padrão. Tratamento *ex vivo*.

GRUPO 1			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	22.65	21.78	22.215
2	20.84	19.49	20.165
3	21.17	21.65	21.41
4	23.41	22.16	22.78
5	20.14	21.77	20.955
6	21.08	22.00	21.54
7	21.55	21.47	21.51
8	---	---	---
Média			21.510
Desvio			0.84

GRUPO2			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	25.83	25.00	25.415
2	27.12	26.16	26.64
3	24.19	21.14	22.66
4	26.81	27.36	27.08
5	26.65	26.67	27.66
6	26.04	26.19	26.11
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			25.92
Desvio			1.778

GRUPO 3			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	13.85	14.12	13.985
2	15.00	---	15.00
3	15.67	15.03	15.35
4	17.8	16.47	17.135
5	15.5	16.1	15.8
6	14.8	13.91	14.365
7	15.44	15.06	15.245
8	---	---	---
Média			15.267
Desvio			1.026

GRUPO 4			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	18.73	19.05	18.89
2	17.68	17.39	17.535
3	18.58	18.9	18.74
4	20.20	20.00	20.10
5	18.94	---	18.94
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			18.95
Desvio			0.85

GRUPO 5			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			---
Desvio			

GRUPO 6			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			---
Desvio			

GRUPO 7			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	20.96	21.75	21.355
2	23.16	22.44	22.8
3	22.19	23.05	22.62
4	24.61	23.09	23.85
5	19.64	20.91	20.27
6	23.00	---	23.00
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			22.31
Desvio			1.285

GRUPO 8			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	27.91	28.3	28.105
2	24.19	26.14	25.165
3	27.56	---	27.56
4	27.40	27.00	27.20
5	26.91	27.65	27.28
6	28.16	27.34	27.75
7	26.13	28.41	27.27
8	---	---	---
Média			27.19
Desvio			0.94

GRUPO 9			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	15.80	15.58	15.69
2	18.07	18.00	18.35
3	17.36	16.29	16.82
4	16.48	15.79	16.135
5	16.00	---	16.00
6	15.68	16.08	15.88
7	14.91	15.76	15.33
8	---	---	---
Média			16.315
Desvio			1.006

GRUPO 10			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	20.00	---	20.00
2	19.48	18.71	19.095
3	17.8	16.49	17.145
4	21.44	20.66	21.05
5	19.50	19.38	19.44
6	19.68	19.19	19.435
7	20.13	18.76	19.445
8	19.3	---	19.3
Média			19.363
Desvio			1.086

GRUPO 11			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			---
Desvio			

GRUPO 12			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			---
Desvio			

GRUPO 13			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	10.94	11.71	11.325
2	9.36	10.8	10.08
3	13.24	12.91	13.075
4	14.06	13.78	13.92
5	13.61	12.8	13.205
6	12.58	12.07	12.325
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			12.321
Desvio			1.408

GRUPO 14			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	14.70	13.28	13.99
2	11.94	13.16	12.55
3	15.61	16.04	15.825
4	14.56	14.70	14.63
5	13.85	15.03	14.44
6	14.08	---	14.08
7	15.19	14.61	14.90
8	---	---	---
Média			14.345
Desvio			1.000

GRUPO 15			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			---
Desvio			

GRUPO 16			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			---
Desvio			

GRUPO 17			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	18.74	19.06	18.90
2	21.14	22.16	21.65
3	20.64	20.00	20.32
4	19.81	21.43	20.62
5	21.41	20.19	20.80
6	22.64	19.36	21.00
7	21.62	---	21.62
8	---	---	---
Média			20.70
Desvio			0.934

GRUPO 18			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	24.19	23.16	23.9
2	20.46	21.17	20.81
3	22.56	22.81	22.685
4	23.81	22.68	23.245
5	22.00	22.5	22.25
6	---	---	---
7	---	---	---
8	---	---	---
Média			22.578
Desvio			1.16

GRUPO 19			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	15.36	14.71	15.035
2	17.18	18.01	17.595
3	16.49	16.12	16.305
4	17.24	16.39	16.815
5	14.21	16.40	15.305
6	18.46	16.61	17.535
7	15.77	---	15.77
8	14.19	16.88	15.535
Média			16.236
Desvio			0.99

GRUPO 20			
ANIMAL	Granul. 1	Granul. 2	Média
1	18.74	19.01	18.875
2	16.34	---	16.34
3	17.68	20.13	18.905
4	22.46	21.19	21.825
5	20.80	19.76	20.28
6	19.50	19.46	19.48
7	19.38	19.61	19.495
8	---	---	---
Média			19.31
Desvio			1.65

11. SUMMARY

11. SUMMARY

Since the 40's decade, with the coming of the clinical chemotherapy, there are already reports of bacterial resistance to drugs. This resistance is preoccupying, since it becomes more and more difficult the treatment certain infections associated to the those microorganisms. Countless attempts take place in the sense of finding new drugs or associations, or still new therapies trying minimize the emergence and the resistance manifestation. In that way, the aim of this study was to evaluate the association of clavulanic acid, a β -lactamases inhibitor that usually comes associated to penicillins, to cephalosporins, in the attempt of increasing its bactericidal action against bacterias producer or not of β -lactamases. Therefore, 160 rats were used, which receive surgically implants of PVC sponges. After 7 days of the implants, the animals received doses previously established of cephalexin (75 and 150 mg/kg - groups 1 and 2); cephalexin + clavulanic acid (75 / 37,5 and 150/75 mg/kg - groups 7 and 8); ceftriaxone (40 and 80 mg/kg - groups 3 and 4); ceftriaxone + clavulanic acid (40 / 20 and 80 / 40 mg/kg - groups 9 and 10) and still clavulanic acid separately (20 and 60 mg/kg - groups 5 and 6). One hour after the administration, the formed tissue was retired and disposed in Petri dishes, previously inoculated with 10^8 c.f.u. of ***Staphylococcus aureus*** (β -lactamase producers [clinical isolate] or no producers [ATCC 25923]) in Muller Hinton Agar. After 24h of incubation, the formed inhibition halos were measured and scored for posterior analysis. Parallely to that an **in vitro** study of the same **ex vivo** associations tested was accomplished in the attempt of reproducing the results. For the tests **in vitro**, a scale of dilutions was accomplished contends the microorganism, media and still decreasing dilutions of the drugs to be tested, an MIC. The statistical analysis show: in the β -lactamase absence, the cephalexin presents better results than

the ceftriaxone, what is inverted when the microorganism in subject is producer of β -lactamase ($P<0,05$). Still, the addition of clavulanic acid doesn't interfere in the antibiotic action of the drugs when there is β -lactamase absence. In presence of the enzyme, the association was shown synergic, increasing the bactericide action of the drugs, being revealed useful when the microorganism show resistance.

KEY-WORDS: cephalixin, ceftriaxone, clavulanic acid, β -lactamases, bacterial resistance.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, E.P. The Cephalosporins. Pharmac. Rev v.14, n.4, p. 473-500, 1962.
2. BARRY, A.L.; FUCHS, P.C.; PFALLER, M.A. Susceptibilities of β -lactamase-producing and nonproducing ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* to ceftibutem, cefaclor, cefuroxima, cefixime, cefotaxime, and amoxicillin-clavulanic acid. Antim Agents and Chemother v.37, n.1, p.14-18, 1993.
3. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCH, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol. v.45, p.493-96, 1966.
4. BAXTER, R.; CHAPMAN, J.; DREW, W.L.; Comparison of bactericidal activity of five antibiotics against *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. v.161, p.1023, 1990.
5. BENVENISTE, R.; DAVIES, J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. Ann Rev Bioch v.42, p.471-506, 1973.
6. BERGOGLIO, R.L. Antibióticos. 5ª ed. Buenos Aires: Panamericana Editora, 1993.
7. BERGSTRÖM, S.; OLSSON, O.; NORMARK, S. Common evolutionary origin of chromosomal β -lactamase genes in enterobacteria. J. Bacteriol v.150, p.528-34, 1982.

8. BLAIR, J.E. Laboratory diagnosis of staphylococcal infections. Bull. Wld. Heth. Org., v.18, p.291-307, 1958.
9. BONFIGLIO, G.; LIVERMORE, D.M. β -lactamase types amongst ***Staphylococcus aureus*** isolates in relation to susceptibility to β -lactamase inhibitor combinations. Journal Antim Chemoth v.33, p.465-481, 1994.
10. BONOMO, R. A. et al. Complementary roles and mutations at positions 69 in a class A β -lactamase. Biochemica et Biophysica Acta, v. 1247, n. 1, p.113-20, 1995.
11. BOYD, R.F. Basic Medical Microbiology Little, Brown Company 5th edition New York, N.Y. , 1995.
12. BROGDEN, R.N. et al. Amoxicilin/clavulanic acid: a review. Drugs v.22, n. 5, p. 337-62. 1982.
13. BRYANT, M.C. Laboratory Control of Antibacterial Chemoterapy Wright Psg ed.: Boston, 1981.
14. BRYSON, H.M.; BROGDEN, R.N. Piperacillin/Tazobactam A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. Drugs v.47, n.3, p.506-535, 1994.
15. BUSH, K. et al. Kinetic interactions of tazobactam with β -lactamases from all major structural classes. Antim Agents and Chemother v.37, n.4, p. 851-58, 1993.

16. CALDWELL, D.R. Microbial Physiology & Metabolism. Wm.C. Brown Publishers Inc.All, Dubuque Iowa, 1995.

17. CHANG, S.C.; HSIEH, W.C.; LUH, K.T. Influence of β -lactamase inhibitors on the activity of Oxacillin Against Methicillin-Resistant ***Staphylococcus aureus***. Diagn Microbiol Infect Dis. v. 21, n.2 p. 81-84, 1995.

18. CHARDON, H. et al. Analysis of β -lactamases produced by cephalotin susceptible ***Escherichia coli*** clinical isolates resistant to co-amoxiclav and ticarcilin clavulanic acid. J. Antimicrob Chemother v. 36, n.1, p.267-69, 1995.

19. CHENG, A.F.B. et al. The antimicrobial activity and β -lactamase stability of cefpirome, a new fourth generation cephalosporin in comparison with other agents. Journal Antim Chemoth v.31, p. 699-709, 1993.

20. CHOPRA, I. Antibiotic resistance resulting from decreased drug accumulation. Br. Med. Bull v.40, n.1, p.11-17,1984.

21. CHRISTENSON, J. et al. Purification and characterization of ***Proteus vulgaris*** β -lactamase that hydrolyses methoxyiminocephalosporins. Curr. Chemother, Immunother v.1 p.748-51, 1982.

22. CLEELAND,R.; SQUIRES, E. Antimicrobial activity of ceftriaxone: A review. Am J. Med v. 77, n.4c, p.3, 1984.

23. DONOWITZ, G.R.; MANDELL, G.L. β -lactam antibiotics. N. England J. Med, v.318, p.419-26, 490-500, 1988.
24. FARRAR, E.W.; O'DELL, N.M. Comparative β -lactamase resistance and antistaphylococcal activities of parenterally and orally administered cephalosporins. Journal Infec Dis v.137, n.4, p.490-93, 1978.
25. FONSECA, A.L. Antibióticos na Clínica Diária. 4ª ed. Rio de Janeiro, EDPUME, 1991.
26. FUKAGAWA, Y. A. computer-assisted spectrophotometric enzyme assay. Biochem. J. v.185, p.186-188, 1980.
27. GEHANNO, P. et al. Comparative efficacy and safety of cefprozil and amoxicillin/clavulanate in the treatment of acute otitis media in children. Journal Antim Chemoth v.33, p.1209-1218, 1994.
28. GEORGOPAPADAKOU, N.H.; LIU, F.Y. Penicillin binding proteins in bacteria. Antimicrob Agents Chemoth v.18, n.1, p.148-57, 1980.
29. GRAUMLICH, J.F.; SIDHU, D.S. In Craig, C.R. & Stitzel, R.E. Modern Pharmacology With Clinical Applications 5th edition Little, Brown Inc. New York 1997.
30. HINDLER, J.A.; GONZALES, A.H.; DRAKE, T.A. Stability of viable-bacterium counts in liquid media used for preparation of inocula and subsequent impact on antimicrobial susceptibility test

- results. J. clin Microbiol., Washington, v.28, n.6, p.1271,1275, 1990.
31. HUBER, F.M.; CHAUVETTE, R.R.; JACKSON, B.G. Preparative methods for 7-aminocephalosporanic acid and 6-aminopenicillanic acid. In Cephalosporins and Penicilins Academic Press Inc., New York, p.27, 1972.
32. JAWETZ, E. Penicilins and Cephalosporins. In Katzung, B.G. Basic & Clinical Pharmacology. 7th edition Appleton & Lange. Conecticut, 1997.
33. KAISER, F.H. *In vitro* Activity of Cefpodoxime in Comparison With Other Oral β -lactam Antibiotics. Infection. v.22, n.5, p.66-71, 1994.
34. KERNODLE, D.S. et al Differentiation of β -lactamase Variants os ***Staphylococcus aureus*** by substrate hydrolysis profiles. Journal Infec Dis v.159, n.1, p.103-108, 1989.
35. _____ et al Use of extracts versus whole-cell bacterial suspensions in the identification of ***Staphylococcus aureus*** β -lactamase variants. Antimic Agents Chemoth v.34, p.420-5,1990.
36. KONEMAN, E.W. et al. Introduction to diagnostic microbiology. 1^a ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.

37. LACEY , R.W.; STOKES, A. Susceptibility of the "penicillinase-resistant" penicillins and cephalosporins to penicillinase of ***Staphylococcus aureus*** J.Clin. Path,v.30, p.35-39, 1977.
38. LAURENCE, D.R. et al. In Clinical Pharmacology 8th edition Churchill Livingstone San Francisco, 1997
39. LIVERMORE, D.M. Evolution of β -lactamase inhibitors. Intesive Care Med v.20, p.S10-S13, 1994.
40. MATTOS FILHO, T.R.; RANALI, J.; BARROS, P.P. Presence of antibiotic in granulation tissue. Journal of Dental Research, 73 (4):773, 1994. (Res)
41. MALOIUN, F.; BRYAN, L.E. Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of β -Lactam Resistance. Antim Agents and Chemoth, v.30, n.1, p.1-5, 1986.
42. MANDELL, G.L.; PETRI, W.A.Jr. Penicillins, Cephalosporins, and other β -Lactam Antibiotics In: Hardman, J.G.; et al. Goodman & Gilman's Pharmacological Basics of Therapeutics. 9th edition. International Edition Mac Graw Hill, 1996.
43. MARSHALL, W.J. Clinical Chemistry 3rd edition. Mosby, 1995. London U.K.
44. MEDEIROS, A.A. et al. Loss of Omp C porin in a strain of ***Salmonella typhimurium*** causes increased resistance to cephalosporins during therapy. J. Infec Dis v.156, n.5, p.751-57,1987.

45. MEDEIROS, A. A. β -Lactamases. British Medical Bulletin v.40, n.1, p.18-27, 1984.
46. Medical Letter. Choice of antimicrobial drugs. Drugs Ther. v.34, n.49, 1992.
47. MIMS, C.A. et al. Microbiologia Médica 1ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1995.
48. MOELLERING, R.C.Jr.; SWARTZ, M.N. The newer cephalosporins. N. Engl. J. Med. v.24, p.294, 1976.
49. MOURA, R.A. et al Técnicas de Laboratório 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1994.
50. NEU, H. Pathophysiologic basis for the use of third generation cephalosporins. Am. J. Med. v.88(Suppl. 4A), p.3S,1990.
51. O'CALLAGHAN C.H. et al. A novel method for detection of β -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob. Agents Chemother. v. 1, p.283-88, 1972.
52. ORSOLINI, P. Tissue distribution and serum levels of cephalexin in man. Postgrad Med J v.46(suppl) p.13-16, 1970.
53. PARADIS, D. et al. Comparative studey of pharmacokinetics and serum bactericidal activities of cefpirome, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother v.36, n.10, p. 2085-2092, 1992.

54. PATEL, I.H. Pharmacokinetic profile of ceftriaxone in man. Am J Med v.77, n.4c, p.17, 1984.
55. PAYNE, D.J.; WOODFORD, N; AMIYES, S. G. B. Characterization of the plasmid mediated β -lactamase BIL-1. Journal Antim Chemoth v.30, p.119-127, 1992.
56. PELCZAR, M.J. et al. Microbiology: concepts and applications 4th edition. McGraw Hill, Inc. Auckland, 1993.
57. PERKINS, R.L.; CARLISLE, H.N.; SASLAW, S. Cephalixin: in vitro bacterial susceptibility, absorption in volunteers, and antibacterial of sera and urine. Am J Med Sci v. 256, n.2, p.122-129, 1968.
58. PHILIPS, I et al. Prevalence and mechanisms of aminoglycoside resistance. Am J Med 80 (suppl 68): 48-55, 1986.
59. REESE, R.E.; BETTS, R.F. Manual of Antibiotics 2^a ed. Little Brown and Company Ed., 1993.
60. RICHMOND, M.H.; SYKES, R.B. The β -lactamases of gram negative bacteria and their possible physiological role. Adv Microbial Physiol v.9, p. 31-88, 1973.
61. _____ Wild-type variants of exopenicillinase from ***Staphylococcus aureus***. Biochem. J. v.49, p.584-93, 1965.
62. RODRIGUES, E.A.C. et al Infeções hospitalares, prevenção e controle. 1^a ed. São Paulo. Editora Sarvier, 1997.

-
63. ROSDAHL, V.T. Penicilinase production in ***Staphylococcus aureus*** strains of clinical importance. Danish Medical Bulletin v.33, p.175-84, 1973.
64. SABATH, L.D. et al. Synergistic combinations of penicillins in the treatment of bacteriuria. N. Engl J Med v. 277, p. 232-38, 1967.
65. STRYNADKA, N.C. et al. Structural and kinetic characterization of a β -lactamase-inhibitor protein Nature v. 368, p. 657-660, 1994.
66. SUTTON, L.D. et al. Development, characterization, and initial evaluation of S1, a new chromogenic cephalosporin for β -lactamase detection. Diagn Microbiol Infect Dis v.21, n.1, p.1-8, 1995.
67. SYKES, R.B.; MATTHEW, M. Detection, assay and immunology of β -lactamases. In: Hamilton-Miller JMT, SMITH, J.T., eds. β -lactamases. London: Academic Press p.17-49, 1979.
68. TAKENOUCHI, T. et al. Role of β -lactamase of methicillin-susceptible ***Staphylococcus aureus*** in resistance to first generation oral cephems both *in vitro* and *in vivo*. Journal Antim Chemoth v.34, p.909-920, 1994.
69. TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. 2ª ed. São Paulo: Livraria Editora Atheneu, 1996.

70. TRABULSI, L.R. Aspectos médicos da resistência bacteriana à drogas. Rev Microbiol. São Paulo (Supl) p.1-30, 1973.
71. _____ e VIOTTO, L.H. Atividade *in vitro* da associação de sulbactam-ampicilina frente a amostras de ***S.aureus*** produtoras de β -lactamase. A folha Médica. v.96, n.3, p.130-33. 1988.
72. VALLE, L.B.S et al. Farmacologia Integrada. 1ª ed. São Paulo: Livraria Editora Atheneu, 1991.
73. WATANABE, N.; KATSU, K. Affinity of E1077, a new cephalosporin, for penicillin-binding proteins of ***Staphylococcus aureus*** and its antistaphylococcal activity. The Journal of Antibiotics v. 46, n. 11, p.1707-1715, 1993.
74. WEINSTEIN, J.; BARZA, M. Bacterial infections: an overview of the development of basic and clinical knowledge. Am. J. Med. Sci. v. 273, n.1, p.4-20, 1977
75. WICK WE. Cephalexin, a new orally absorbed cephalosporin antibiotic. Appl Microb v.15, n.4, p.765-69,1967.
76. WRIGHT, D.N. et al. Evaluation of four newer antimicrobial agents in the advantage susceptibility test system. J. Clin Microbiol., Washington, v. 27, n. 10, p. 2381-2383, 1989.

A bibliografia foi descrita de acordo com a NBR-6023, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 1989. Abreviatura dos Periódicos conforme o "World List of Scientific Periodical"