



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO TEÓRICO DO COMPLEXO CEFOXITINA-
PROTEÍNA 5 DE LIGAÇÃO À PENICILINA DA
Escherichia coli POR DINÂMICA MOLECULAR COM
MÉTODO HÍBRIDO DE MECÂNICA QUÂNTICA/
MECÂNICA MOLECULAR**

Thaís Boulhosa Barros da Silva

**BELÉM – PA
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO TEÓRICO DO COMPLEXO CEFOXITINA-
PROTEÍNA 5 DE LIGAÇÃO À PENICILINA DA
Escherichia coli POR DINÂMICA MOLECULAR COM
MÉTODO HÍBRIDO DE MECÂNICA QUÂNTICA/
MECÂNICA MOLECULAR**

Autora: Thaís Boulhosa Barros da Silva

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marta Chagas Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

**BELÉM – PA
2014**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaís Boulhosa Barros da Silva

ESTUDO TEÓRICO DO COMPLEXO CEFOXITINA-PROTEÍNA 5 DE LIGAÇÃO À PENICILINA DA *Escherichia coli* POR DINÂMICA MOLECULAR COM MÉTODO HÍBRIDO DE MECÂNICA QUÂNTICA/MECÂNICA MOLECULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em 12 de dezembro de 2014.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro
Orientadora

Prof. Dr. Carlos Augusto Lima Barros
Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.
Assinatura: _____

Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro
Instituição: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará.
Assinatura: _____

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira
Instituição: Universidade Federal do Pará.
Assinatura: _____

BELÉM – PA
2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Boulhosa Ramos da Silva e Liduina Maria de Lima Barros, os meus maiores educadores, as pessoas que mais contribuíram para o meu aperfeiçoamento moral, emocional e espiritual. Educadores estes que sempre estiveram ao meu lado durante os momentos mais importantes de minha vida, demonstrando confiança, vibrando com minhas vitórias e confortando-me nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Zuleide Boulhosa da Silva, Vívian Peres da Silva, João Boulhosa Ramos da Silva Filho, Thayrisson Boulhosa Barros da Silva e Jair da Silva e Silva, que assim como meus pais, foram participantes fundamentais na minha formação e na minha vida.

Aos meus amados sobrinhos, José Jaime Benjó Sampaio Júnior, Mariana da Silva Goes e Vera Luísa Boulhosa Sampaio, que encantam minha vida, enchendo-a de alegria.

Dedico com amor este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Não me é possível agradecer aqui a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que o presente trabalho fosse planejado, executado e concluído. Minha gratidão a essas pessoas é muito grande e não pode ser expressa com palavras. Contudo, quero expressar meus sinceros agradecimentos:

- Primeiramente a Deus pela oportunidade que me conferiu de lutar pelo que almejo.
- À minha família, pai, mãe e irmãos, pela confiança depositada, por ser a base da resolução dos meus problemas e por estimularem meu desenvolvimento pessoal e profissional, através da simples manifestação de amor, admiração e respeito por mim. Obrigada por ensinarem-me a enxergar beleza nas coisas simples da vida.
- A todos os meus amigos de turma que neste tempo de curso pude desfrutar da graciosidade particular de cada um em inúmeros momentos. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e pelos sorrisos que me proporcionaram neste tempo de convívio. Obrigada por terem vivenciado e tornado único e transcendental cada minuto compartilhado. Tudo isso iluminou meu mundo e enriqueceu a minha vida.
- À Professora Dr^a Marta Chagas Monteiro, ao Professor Dr. Carlos Augusto Lima Barros e ao Professor Dr. Agnaldo da Silva Carneiro por disponibilizarem-se a me orientar, mesmo premidos por seus inúmeros afazeres.
- A todos os meus professores, pelos ensinamentos, pela amizade e por terem me impelido o desejo de aprender, de crescer profissionalmente.
- Aos colegas do Laboratório de Química Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia da UFPA, em especial ao Diego Xavier de Freitas, pelo carinho e pela amizade.

- Aos colegas do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, da UFPA, pela solicitude e contribuição na realização deste estudo, em especial à Natália Silva, Robson Sousa, Anderson Lima e Nelson Alencar.
- Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, da Faculdade de Farmácia da UFPA, Fábio Oliveira, Ana Lúcia Oliveira, Carla Mendonça, pela colaboração.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissional de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudo.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”.

Louis Pasteur

RESUMO

SILVA, T.B.B. **ESTUDO TEÓRICO DO COMPLEXO CEFOXITINA-PROTEÍNA 5 DE LIGAÇÃO À PENICILINA DA *Escherichia coli* POR DINÂMICA MOLECULAR COM MÉTODO HÍBRIDO DE MECÂNICA QUÂNTICA/ MECÂNICA MOLECULAR.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 106 f. 2014.

As Proteínas de Ligação à Penicilina (“*Penicillin Binding Proteins*”) (PLPs/PBPs) são alvos biológicos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos contra infecções bacterianas. Neste estudo, objetivou-se, compreender a interação entre a cefoxitina e a Proteína 5 de Ligação à Penicilina (PBP5) da *Escherichia coli* (depositado no PDB sob o código 3MZE), através de simulação de Dinâmica Molecular (DM), usando a abordagem híbrida de mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM). Assim como, desenvolver um protótipo para avaliar, através de simulação computacional, a suscetibilidade de bactérias Gram negativas frente a antimicrobianos. A análise da suscetibilidade antimicrobiana aos antibióticos testados revelou que a cepa de *E. coli* ATCC 8739 foi sensível aos 5 antimicrobianos do estudo. A cepa de *E. coli* proveniente do isolado clínico apresentou resistência à ciprofloxacina 5 µg e à gentamicina 10 µg, sensibilidade intermediária à cefepime 30 µg e à ceftazidima 30 µg e sensibilidade à cefoxitina 30 µg. A diferença na suscetibilidade entre a cepa de *E. coli* ATCC 8739 e a cepa de *E. coli* proveniente de isolado clínico pode evidenciar uma memória imunológica molecular da bactéria. Observou-se ausência de produção de β-lactamases pela cepa de *E. coli* oriunda de isolado clínico, sugerida por não se ter observado diferença de suscetibilidade antimicrobiana com relação à presença ou à ausência de EDTA nos discos contendo os antimicrobianos. A análise de protonação revelou estarem desprotonados os resíduos His146, His151, His216 e His320. A estabilização do complexo estudado ocorreu após 0,6 ns de simulação de DM. Além disso, uma análise de decomposição em termos de energia foi realizada para determinar as contribuições individuais dos resíduos de aminoácidos para as interações proteína-ligante. Os resultados revelaram que a cefoxitina apresenta forte interação com os resíduos Lis44, Lis210, Ser41, Gli212, His213, Glu246, além da água, os quais são importantes para estabilizar o complexo cefoxitina-PBP5. O Mapa do Potencial Eletrostático Molecular da cefoxitina revelou um centro altamente eletrofílico na região correspondente ao anel β-lactâmico, o que favorece o ataque nucleofílico da hidroxila do resíduo de serina do sítio ativo da PBP5 de *E. coli*. Estes resultados podem dar suporte para o planejamento de novos fármacos mais seletivos e eficazes no controle de infecções bacterianas. Os resultados experimentais foram estatisticamente condizentes com os resultados teóricos, portanto, esse trabalho pode ser utilizado como um protótipo teórico computacional para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativas. Esse estudo poderá encontrar aplicações futuras no planejamento e desenvolvimento de novos e potentes compostos com atividade antimicrobiana. Principalmente, nas tentativas de modificar um inibidor, em particular da classe das cefalosporinas, a fim de melhorar a sua seletividade e a sua atividade.

Palavras-chave: Cefoxitina; PBP5; Antibiograma; QM/MM; Dinâmica Molecular; Modelagem Molecular.

ABSTRACT

SILVA, T.B.B. THEORETICAL STUDY OF THE COMPLEX CEFOXITIN-PENICILLIN-BINDING PROTEIN 5 FROM *Escherichia coli* FOR MOLECULAR DYNAMICS WITH HYBRID METHOD OF QUANTUM MECHANICS/MOLECULAR MECHANICS. Master's Dissertation, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Belém-PA, 106 f. 2014.

The Penicillin Binding Proteins (PBPs) are important for the development of new drugs against bacterial infections biological targets. This study was aimed to understand the interaction between the protein and cefoxitin 5 Penicillin-Binding (PBP5) of *Escherichia coli* (deposited in the PDB under the code 3MZE) through simulation Molecular Dynamics (MD), using the approach hybrid quantum molecular mechanics (QM/MM) and mechanical. As well as develop a prototype to evaluate, through computer simulation, the susceptibility of Gram negative bacteria against antibiotics. The analysis of antimicrobial susceptibility to antibiotics tested has shown that this strain of *E. coli* ATCC 8739 was sensitive to 5 antimicrobials study. The strain of *E. coli* derived from the clinical isolate was resistant to ciprofloxacin 5 µg and gentamicin 10 µg, intermediate sensitivity to cefepime 30 µg and ceftazidime 30 µg, and sensitivity to cefoxitina 30 µg. The difference in susceptibility of *E. coli* strain ATCC 8739 and strain of *E. coli* isolated from a clinical can show a molecular immunological memory of the bacteria. We observed no production of β-lactamases by the strain of *E. coli* derived from clinical isolate, suggested because no observed difference in antimicrobial susceptibility with respect to the presence or absence of EDTA on the disks containing the antibiotics. The analysis has revealed that protonation of the deprotonated His146, His151, His216 and His320 residues. The stabilization of the complex was studied after 0,6 ns of MD simulation. Moreover, a decomposition analysis in terms of energy was performed to determine the contributions of individual amino acid residues for protein-ligand interactions. The results revealed that cefoxitin has a strong interaction with Lis44, Lis210, Ser41, Gli212, His213, Glu246 residue, apart from water, which are important for stabilizing cefoxitin-PBP5 complex. The electrostatic potential map Molecular cefoxitin revealed a highly electrophilic center corresponding to the β-lactam ring, which promotes hydroxyl attack nucleofílico the serine residue of the *E. coli* PBP5 active site region. These results can give support the planning of new more selective and effective drugs to control bacterial infections. The experimental results were statistically consistent with the theoretical results thus this work can be used as a prototype for computing theoretical evaluate the antimicrobial susceptibility to Gram negative bacteria. This study may find applications in future planning and development of new and potent compounds with antimicrobial activity. Mainly in attempts to modify an inhibitor, particularly of the cephalosporin class in order to improve its selectivity and its activity.

Keywords: Cefoxitin; PBP5; Antibiogram; QM/MM; Molecular Dynamics; Molecular Modeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Corte transversal de uma bactéria. (a) Esquema. (b) Micrografia.....	22
Figura 2 –	Esquema da constituição da parede celular de bactérias Gram positivas e de bactéria Gram negativas.....	24
Figura 3 –	Fórmula estrutural do peptidoglicano maduro.....	26
Figura 4 –	(A) Estrutura básica do peptidoglicano. (B) Precursores da síntese de peptidoglicano em <i>Escherichia coli</i> (bactéria Gram negativa) e em <i>Staphylococcus aureus</i> (bactéria Gram positiva).....	27
Figura 5 –	Estrutura química geral dos antibióticos β -lactâmicos.....	31
Figura 6 –	(A) Mecanismo de hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por PBP. (B) Mecanismo de ação das cefalosporinas.....	32
Figura 7 –	Semelhança estrutural entre o sistema β -lactâmico (direita) e a sequência terminal D-alanil-D-alanina (esquerda).....	33
Figura 8 –	Colônia do fungo <i>Cephalosporium acremonium</i>	34
Figura 9 –	Estrutura química geral das cefalosporinas (A) e estrutura química geral das penicilinas (B).....	35
Figura 10 –	Colônia do fungo <i>Streptomyces</i> . Fotografado por Ramón Santamaría. IMB/CSIS-USAL. Salamanca.....	36
Figura 11 –	Estrutura química da cefoxitina.....	37
Figura 12 –	Resumo esquemático do método de cristalografia por difração de raios-X. Adaptado de Project crystal, 2013.....	42
Figura 13 –	Imagem de uma proteína obtida por cristalografia de difração de raios-X.....	43
Figura 14 –	Esquema para aplicação de discos de antimicrobianos.....	52
Figura 15 –	Potenciais vibracionais e tipos de interações de uma determinada molécula.....	55
Figura 16 –	Representação esquemática da divisão de um sistema na região QM, região MM e região de contorno.....	61

Figura 17 –	Estrutura cristalográfica da cefoxitina complexada com a PBP5 de <i>E. coli</i> . Código PDB: 3MZE.....	64
Figura 18 –	Visão global do complexo cefoxitina-PBP5 e o sistema molecular completo solvatado em uma caixa cúbica de 80 Å de lado (parte inferior).....	66
Figura 19 –	Principais interações da cefoxitina com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da PBP5.....	68
Figura 20 –	Sistema de partida para realização das Simulações de Dinâmica Molecular.....	69
Figura 21 –	Placas de Ágar Müller-Hinton com formação dos halos de inibição após 24 horas de incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ frente à cepa ATCC 8739 de <i>Escherichia coli</i> , discos de antibiograma não impregnados com EDTA (A); à cepa de <i>Escherichia coli</i> oriunda de isolado clínico, discos de antibiograma impregnados com EDTA (B); e à cepa de <i>Escherichia coli</i> oriunda de isolado clínico, discos de antibiograma não impregnados com EDTA (C).....	75
Figura 22 –	Trajetória da simulação de DM após 3,0 ns entre o tempo (ns) e a distância em Å.....	79
Figura 23 –	Energia de interação do ligante com os principais resíduos catalíticos, pelo método AM1/MM.....	80
Figura 24 –	Energia de interação do ligante com os principais resíduos catalíticos, por DFT.....	81
Figura 25 –	Estrutura da cefoxitina (A). Mapa do Potencial Eletrostático Molecular (MEP) sobre 0,002 u.a. da superfície de densidade eletrônica para a cefoxitina. Esse MEP foi derivado do cálculo com o método B3LYP(6-31G*)/MM com a cefoxitina, no qual o aumento da carga negativa vai do azul (positivo) para o vermelho (negativo) (B).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classes de antibióticos utilizados na pesquisa e seus sítios de ação.....	51
Tabela 2 –	Antimicrobianos e seus respectivos valores dos halos de inibição propostos para as Enterobactérias (CLSI, 2007b; LABORCLIN, 2013).....	53
Tabela 3 –	Leitura dos halos de inibição dos antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade, pelo método de disco-difusão, da cepa de <i>E. coli</i> ATCC 8739 (sem EDTA); do isolado clínico de <i>E. coli</i> (com EDTA); e do isolado clínico de <i>E. coli</i> (sem EDTA).....	74
Tabela 4 –	Suscetibilidade das cepas de <i>Escherichia coli</i> , ATCC 8739 e isolado clínico com e sem EDTA, frente a 5 antimicrobianos.....	76
Tabela 5 –	Energia de interação global média (energia de ligação, $E_{Int.}$) calculada durante os últimos 500 ps de DM AM1/MM e energia global de interação obtida por <i>single point</i> usando o método híbrido B3LYP/MM.....	84
Tabela 6 –	Correlação estatística entre os valores de energia global média e os valores da média dos halos de inibição da cepa de <i>E. coli</i> ATCC 8739 (sem EDTA), do isolado clínico de <i>E. coli</i> (com EDTA), e do isolado clínico de <i>E. coli</i> (sem EDTA); pela cefoxitina e pelas cefalosporinas.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBER	Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia/ <i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de Microorganismos Norte Americana/ <i>American Type Culture Collection</i>
CADD	Desenho de Fármacos Assistido Computacionalmente/ <i>Computer Aided Drug Design</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissional de Nível Superior
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
CIMs	Concentrações Inibitórias Mínimas
CLSI	Instituto de Padrões Clínico e Laboratorial/ <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DFT	Teoria do Funcional de Densidade/ <i>Density Functional Theory</i>
DM	Dinâmica Molecular
DNA	Ácido desoxirribonucléico/ <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	N-acetilglicosamina
GROMOS	Simulação Molecular de Groningen/ <i>Groningen Molecular Simulation</i>
HOMO	Orbital Molecular Mais Alto Ocupado/ <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada/ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LACEN/PA	Laboratório Central do Estado do Pará
LogP	Coeficiente de partição
LUMO	Orbital Molecular Mais Baixo Desocupado/ <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
M	Ácido N-acetilmurâmico
m-DAP	Ácido meso diaminopimélico

MM	Mecânica Molecular
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
OPLS	Potenciais Otimizados para Simulações de Líquidos/ <i>Optimized Potentials for Liquid Simulations</i>
PLPs/PBPs	Proteínas de Ligação à Penicilina/ <i>Penicillin Binding Proteins</i>
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
PBP5	Proteína 5 de Ligação à Penicilina
PDB	Banco de Dados de Proteínas/ <i>Protein Data Bank</i>
QM/MM	Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (<i>Quantum Mechanics/Molecular Mechanics</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio Quadrático Médio/ <i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	Ácido ribonucléico/ <i>Ribonucleic acid</i>
SEP	Superfície de Energia Potencial
TFD	Teoria do Funcional de Densidade/ <i>Density Functional Theory</i>
UFPA	Universidade Federal do Pará
3D	Tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

Å	<i>Angstrom</i>
β	Beta
Ca ⁺²	Íon cálcio
fs	Femtosegundos
θ	Teta
K	Kelvin
M	Molar
Mg ⁺²	Íon magnésio
μm	Micrômetros
nm	Nanômetros
ps	Picosegundo
Ø	Phi
Ψ	Psi

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Célula bacteriana.....	21
2.2 Parede celular bacteriana.....	22
2.3 Bactérias Gram negativas.....	23
2.4 A camada de peptidoglicano.....	25
2.5 Proteínas de Ligação à Penicilina/ <i>Penicillin Binding Proteins</i> (PLPs/ BPs).....	27
2.6 Antibióticos.....	28
2.7 Antibióticos β -lactâmicos.....	29
2.8 Cefalosporinas.....	33
2.9 Cefoxitina.....	36
2.10 Antibiograma.....	38
2.11 Cristalografia.....	39
2.12 Modelagem Molecular.....	43
2.12.1 INTERAÇÕES FÁRMACO-RECEPTOR.....	45
2.12.2 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS <i>in silico</i>	47
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivo geral.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Determinação da suscetibilidade antimicrobiana aos antibióticos	51
4.2 Métodos Computacionais de Modelagem Molecular.....	54
4.2.1 MÉTODOS DE MECÂNICA MOLECULAR (MM).....	54
4.2.2 MÉTODOS DE MECÂNICA QUÂNTICA (QM).....	57
4.2.3 MÉTODOS HÍBRIDOS DE MECÂNICA QUÂNTICA/MECÂNICA MOLECULAR (QM/MM).....	59
4.2.4 ESTRUTURA INICIAL E PREPARAÇÃO DO SISTEMA CEFOXITINA-PBP5 PARA SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR....	64
4.2.5 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR (DM) UTILIZANDO O MÉTODO HÍBRIDO QM/MM.....	66

4.3 Energia de Interação por Resíduo.....	70
4.4 Potencial Eletrostático Molecular Tridimensional (MPE-3D).....	71
4.5 Cálculos de Energia de Interação Global.....	71
4.6 Métodos Estatísticos.....	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana aos antibióticos.....	73
5.2 Cálculo de pKa para PBP5.....	78
5.3 Dinâmica Molecular.....	79
5.4 Cálculo da Energia de Interação por Resíduo.....	80
5.5 Potencial Eletrostático Molecular Tridimensional.....	83
5.6 Energia de Interação Global.....	84
6 CONCLUSÕES.....	87
REFEÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

As Proteínas de Ligação à Penicilina/“*Penicillin Binding Proteins*” (PLPs/PBPs) constituem um grupo de proteínas caracterizado pela sua afinidade de ligação a antibióticos β -lactâmicos. Elas são um constituinte normal de muitas bactérias, o nome reflete apenas a maneira pela qual a proteína foi descoberta. Todos os antibióticos β -lactâmicos (exceto para tabtoxinine- β -lactama, o qual inibe a glutamina-sintetase), ligam-se às PBPs, que são essenciais à formação da parede celular bacteriana (CHAMBERS, 1999).

Essas proteínas estão envolvidas na fase final da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana. A síntese dessa parede é essencial para o crescimento, para a divisão celular (reprodução) e para manter a estrutura celular em bactérias. A inibição das PBPs leva a irregularidades na estrutura da parede celular, tais como o alongamento, a lesões, perda de permeabilidade seletiva, à lise e morte celular. A ligação desses antimicrobianos às PBPs também promovem a liberação de autolisinas letais para as bactérias (BEDNENKO et al. 1998).

Os antibióticos β -lactâmicos ligam-se às PBPs em razão da semelhança estrutural desses antibióticos com o grupo terminal D-alanil-D-alanina das unidades de peptidoglicano da parede celular bacteriana. Os antibióticos β -lactâmicos inibem a transpeptidase mediante uma ligação covalente com o resíduo de serina do o sítio ativo das PBPs. Esta é uma reação irreversível e inativa a enzima. Em consequência, o polímero linear não é transformado em polímero cruzado e não se forma a parede celular bacteriana (LIVERMORE; WILLIAMS, 1996).

As PBPs são bons alvos para fármacos de toxicidade seletiva, como os antibióticos β -lactâmicos, porque as vias metabólicas e enzimáticas são exclusivas das bactérias (SOUSA; PRISTA, 1988). Portanto, essas proteínas são alvos biológicos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos contra infecções bacterianas.

A ideia central envolvida no desenho de novas estruturas está relacionada com a predição do modo de ligação e a afinidade de interação de moléculas no sítio de ligação de uma proteína (VERDONK et al. 2003). Assim sendo, estudos de interação fármaco-receptor utilizando métodos computacionais assumem um papel importante na busca por fármacos com atividade biológica mais efetiva e mais segura.

Expressões como CADD (“*Computer Aided Drug Design*”, desenho de fármacos assistido computacionalmente), entre outras, foram recentemente incorporadas à linguagem da Química Medicinal. Trata-se de uma metodologia que visa determinar distâncias interatômicas e densidades eletrônicas de moléculas de interesse biológico, estudar o equilíbrio conformacional das biomoléculas definindo as conformações potencialmente bioativas, explicar racionalmente as atividades farmacológicas de substâncias e definir, confirmar ou descartar hipóteses para o mecanismo de ação em nível eletrônico e molecular de diversos fármacos e, finalmente, identificar interações específicas entre drogas e receptores, definindo os grupamentos farmacofóricos (GUND et al. 1988; MOTTA NETO et al. 1992).

É possível definir, ainda, hipóteses topográficas para sítios receptores de diversas classes de fármacos, deduzindo tridimensionalmente a interação molecular de uma determinada droga e seu receptor, modelando biomacromoléculas-alvo (sítios ativos de enzimas, de receptores e de ácidos nucleicos; ou enzimas, receptores e ácidos nucléicos íntegros) e a interação destas com moléculas efetoras (substratos e agonistas naturais; fármacos inibidores, agonistas e antagonistas) (PERUN; PROPST, 1989). Deste modo, podem-se planejar, numa base racional, novos fármacos mais específicos e mais potentes, capazes de emprego terapêutico mais seguro.

Tendo em vista que a integração dos métodos experimentais e teóricos é de grande relevância nesta área de conhecimento, neste estudo, objetivou-se, realizar o estudo teórico da interação entre a cefoxitina e a Proteína 5 de Ligação à Penicilina (PBP5) da *Escherichia coli* (depositado no PDB sob o código 3MZE) através de simulação de Dinâmica Molecular (DM) usando a abordagem híbrida de mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM).

Neste trabalho realizaram-se simulações de DM com o intuito de verificar as principais interações que estabilizam o ligante (cefoxitina) no sítio ativo da enzima (PBP5), utilizando o método híbrido de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM), implementado pelo programa Dynamo (FIELD, et al. 2000).

Portanto, os resultados apresentados, além de contribuir para o melhor entendimento das principais interações entre a cefoxitina e a região catalítica da PBP5 da *Escherichia coli*, dará suporte para o planejamento de novos fármacos mais seletivos e eficazes no controle de infecções bacterianas. Podendo dar a perspectiva de desenvolver um protótipo teórico computacional para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Célula Bacteriana

As bactérias estão entre os patógenos que mais afetam de forma significativa a saúde da população mundial (WHO, 2007).

No século XIII, Roger Bacon, sugeriu que as doenças eram produzidas por seres vivos invisíveis. A ideia foi novamente recomendada por Girolamo Fracastoro de Verona (1483-1553), mas a primeira observação descrita e documentada dos organismos bacterianos foi realizada pelo naturalista holandês Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723) por volta dos anos 1670, com a ajuda de um microscópio simples de sua própria construção. Porém, somente no século XIX a possibilidade destes microrganismos serem causadores de processos infecciosos começou a ser aventada. Esta hipótese surgiu após os experimentos de Louis Pasteur, que demonstrou que algumas linhagens de bactérias eram importantes para processos de fermentação e, também, que as bactérias eram de ampla distribuição pelo meio ambiente (PATRICK, 2005).

As bactérias são organismos procarióticos, unicelulares, com organização celular relativamente simples, pertencentes ao Reino Monera. A célula bacteriana, em geral, é formada pela cápsula, parede celular, membrana citoplasmática, citoplasma, nucleóide, plasmídeo, ribossomos, inclusões, fímbrias e flagelos, conforme observado na Figura 1a. O tamanho das bactérias é da ordem de milésimos de milímetro, ou seja, micrômetros (μm) (Figura 1b), podendo, no entanto, serem observadas em microscopia óptica. A maioria das bactérias estudadas nos laboratórios de Microbiologia mede de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro por 2,0 a 5,0 μm de comprimento (TORTORA et al. 2005).

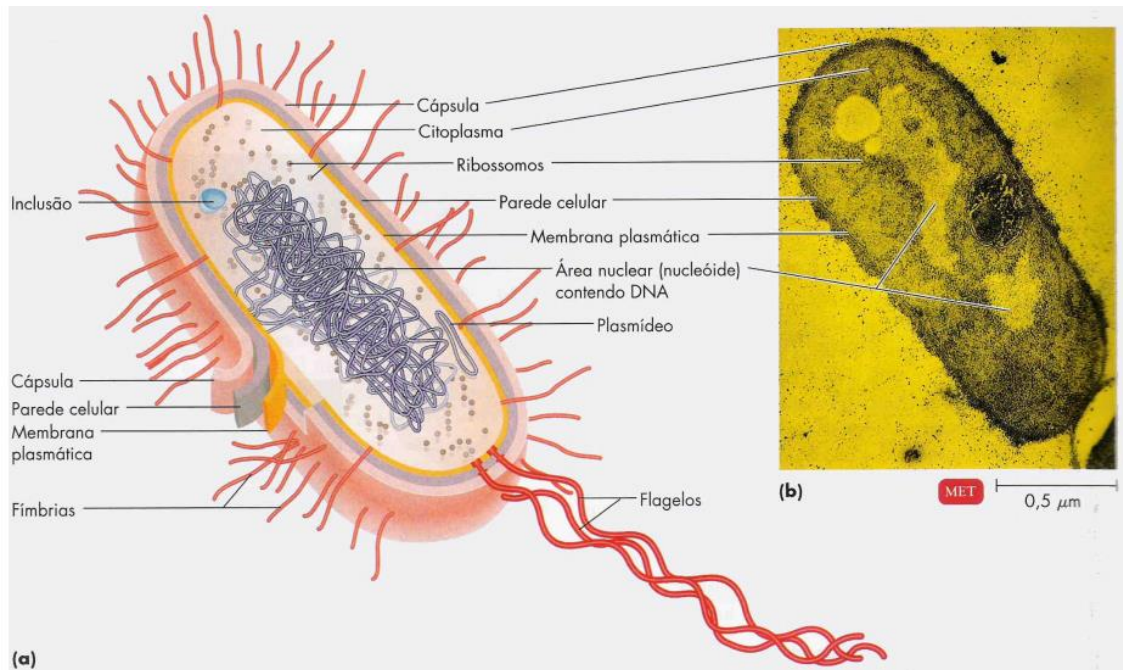


Figura 1: Corte transversal de uma bactéria. (a) Esquema. (b) Micrografia. Fonte: Tortora et al. 2005.

2.2 Parede Celular Bacteriana

A parede da célula bacteriana é uma rede tridimensional de polímeros de açúcares, com ligação cruzada peptídica, de estrutura rígida e complexa presente na maioria das bactérias, consistindo de uma entre as duas formas básicas: parede celular de bactérias Gram positivas com uma grossa camada de peptidoglicano, e parede celular de bactérias Gram negativas com uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa sobreposta. A estrutura, os componentes e as funções da parede celular distinguem as bactérias Gram positivas das Gram negativas (MURRAY, 2010).

A maioria das bactérias é classificada como Gram positiva ou como Gram negativa, de acordo com sua resposta à coloração pelo método de Gram. Este procedimento recebeu tal denominação do histologista Hans Christian Gram que desenvolveu essa técnica de coloração diferencial na tentativa de corar bactérias em tecidos infectados. A coloração de Gram depende da capacidade de certas bactérias (as bactérias Gram positivas) de reter o

complexo cristal de violeta (um corante púrpura) e iodo, após breve lavagem com álcool ou acetona. As bactérias Gram negativas não retêm o complexo corante-iodo e tornam-se translúcidas, podendo, assim, reter a coloração de fundo com safranina (um corante vermelho). Assim, as bactérias Gram positivas aparecem na cor púrpura ao microscópio, e as Gram negativas, em vermelho. A distinção entre esses dois grupos reflete diferenças fundamentais em seus envoltórios celulares (BROOKS, et al. 2012).

A parede celular bacteriana recobre a membrana citoplasmática e, além de promover a manutenção da forma bacteriana, confere às bactérias a resistência necessária para suportar sem romper-se a elevada pressão osmótica de seu interior; ela também participa nos processos de divisão celular, transporte de substâncias e fenômenos patogênicos. Esta parede é formada, essencialmente, por peptidoglicano. A resistência da parede celular bacteriana à tensão reside nas ligações cruzadas peptídicas, tornando a inibição dessas ligações cruzadas um alvo atraente para a terapia antibacteriana, além do fato de a parede celular não ser encontrada em células animais. Com efeito, a classe maior e mais amplamente utilizada de inibidores da síntese bacteriana da parede celular, os antibióticos beta-lactâmicos (β -lactâmicos), atua através da inibição das enzimas transpeptidases, que medeiam a ligação cruzada peptídica (VON NUSSBAUM, et al. 2006).

2.3 Bactérias Gram Negativas

A parede celular das bactérias Gram negativas (por exemplo, *Escherichia coli*) são mais complexas estruturalmente e quimicamente que a parede celular das bactérias Gram positivas. Estruturalmente, a parede celular de bactérias Gram negativas contém duas camadas externas à membrana citoplasmática. Uma fina camada de peptidoglicano está imediatamente externa à membrana citoplasmática, e contribui com apenas 5 a 10% do peso da parede celular dessas bactérias, enquanto na parede celular das bactérias Gram positivas o peptidoglicano corresponde a mais de 60% da composição da parede celular, conforme observado na Figura 2 (MURRAY, 2010).

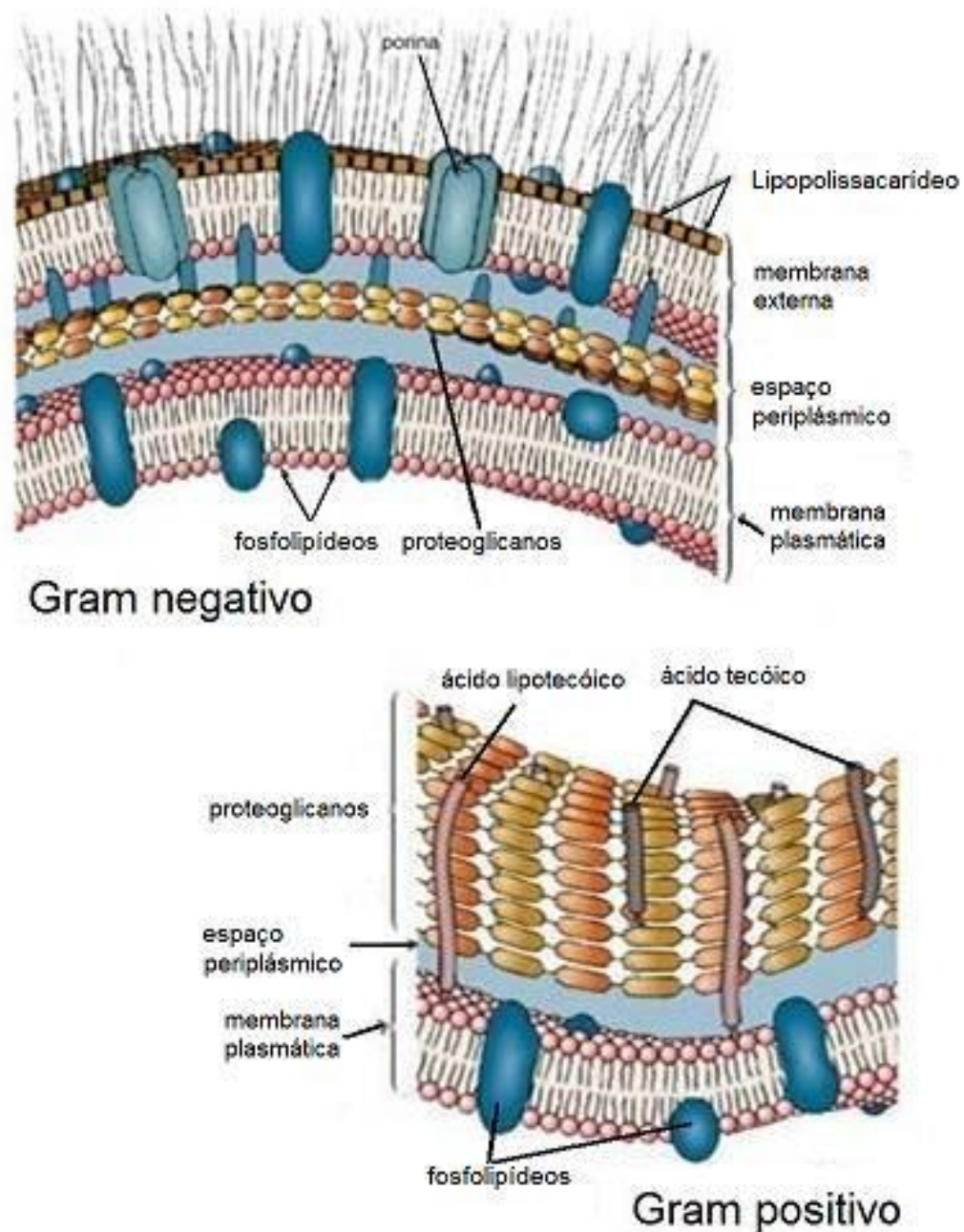


Figura 2: Esquema da constituição da parede celular de bactérias Gram positivas e de bactéria Gram negativas (MIGUEL-JUNIOR, 2008).

Devido à natureza mais complexa da parede celular, as bactérias Gram negativas são mais resistentes à ação de antibióticos. Dessa forma, esses compostos para terem acesso à célula bacteriana, os mesmos devem cruzar a parede celular através de canais proteicos de porina, embebidos na estrutura

lipídica, que apresentam o interior com características hidrofílicas. Assim, os antibióticos com maior atividade frente a bactérias Gram negativas são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas (GUIMARÃES et al. 2010).

A membrana citoplasmática bacteriana é uma estrutura de aproximadamente 8 nm de espessura, responsável pela separação do citoplasma (meio interno) com o meio externo. É composta de 60 % de proteínas imersas em uma bicamada fosfolipídica (40 %), variando entre diferentes espécies bacterianas e condições de cultivo. Os ácidos graxos dos lipídios são responsáveis pela condição hidrofóbica da porção interna da membrana enquanto a parte hidrofílica dos mesmos fica exposta ao meio externo aquoso. Além das interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, cátions como Mg^{+2} e Ca^{+2} são responsáveis pela manutenção da integridade da membrana (BARON; FINEGOLD, 1990).

Os agentes antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular e/ou sobre a membrana celular, sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou sínteses de enzimas na célula bacteriana, podendo levar a destruição desses microrganismos (RANG et al. 1997; TRABULSI et al. 1999).

2.4 A Camada de Peptidoglicano

O peptidoglicano maduro (Figura 3), mucopeptídio ou mureína, é uma malha rígida constituída de cadeias de glicano, que consistem em filamentos lineares de dois aminoaçúcares alternados de N-acetilglicosamina (NAG, G) e de ácido N-acetilmurâmico (NAM, M), ligadas transversalmente por cadeias peptídicas, resultando em uma estrutura rígida (Figura 4A e 4B) (GOODMAN; GILMAN, 2010).

A forma precursora do peptídio tem uma D-alanina extra, a qual é liberada durante a etapa de ligação cruzada. Essa ligação cruzada entre os peptídios é feita entre a amina livre do aminoácido diamínico (ácido meso

diaminopimérico, m-DAP), em bactérias Gram negativas, e a D-alanina na quarta posição de uma outra cadeia (Figura 4A e 4B). A reação de entrecruzamento é catalisada por transpeptidases ligadas à membrana. Na *E. coli* a principal transpeptidase responsável por esse processo é a PBP5. Os antibióticos β -lactâmicos inibem essas transpeptidases, pois ao ligarem-se a elas (PBPs) impedem que a última molécula de glicina se ligue ao quarto resíduo (D-alanina) do pentapeptídeo, prejudicando, assim, a formação do peptidoglicano que compõe a parede celular. De modo geral, pode-se dizer que esses antibióticos são inibidores seletivos da síntese da parede celular bacteriana (MURRAY, 2010).

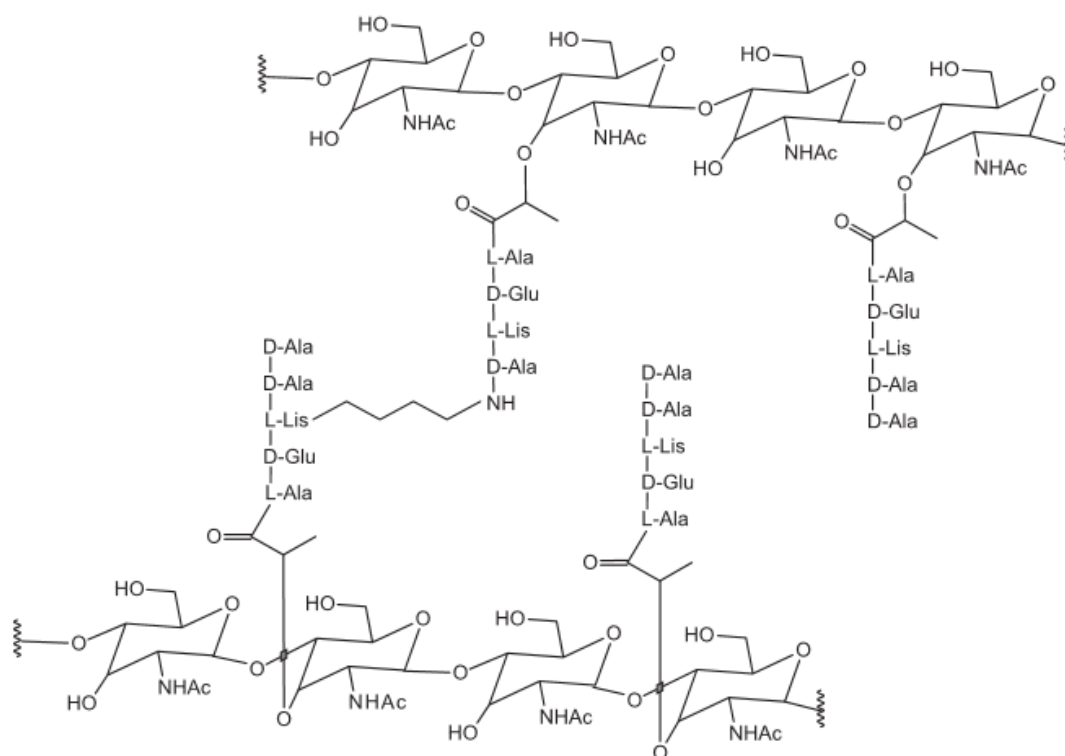


Figura 3: Fórmula estrutural do peptidoglicano maduro (SILVEIRA et al. 2006).

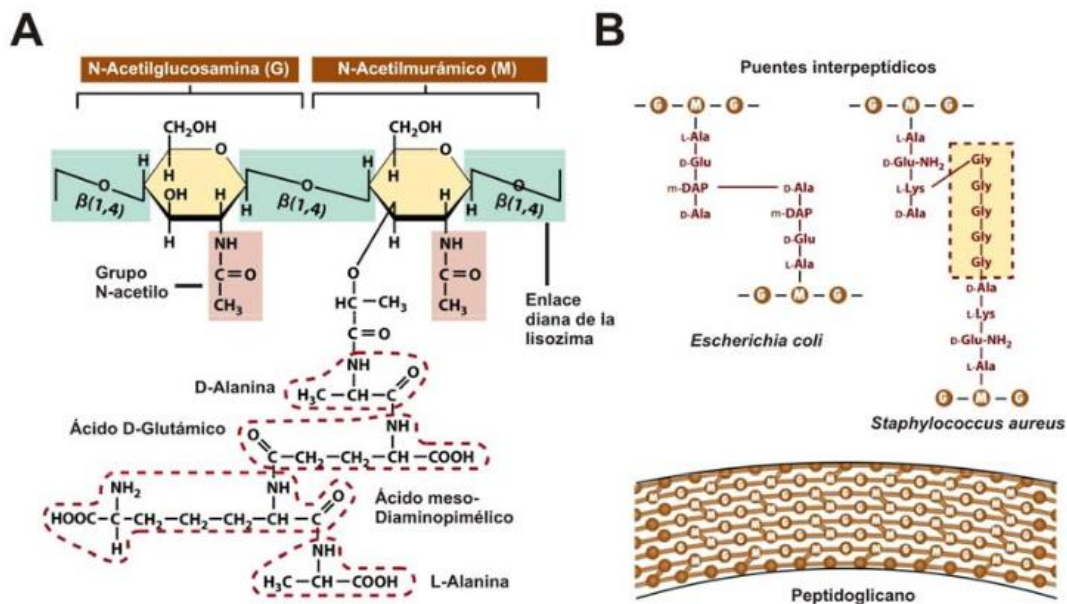


Figura 4: (A) Estrutura básica do peptidoglicano. (B) Precursores da síntese de peptidoglicano em *Escherichia coli* (bactéria Gram negativa) e em *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram positiva). Figuras modificadas de “Brock Biology of Microorganisms” 11ª Edição (MADIGAN; MARTINKO, 2005).

2.5 Proteínas de Ligação à Penicilina/“*Penicillin Binding Proteins*” (PLPs/ PBPs)

As Proteínas de Ligação à Penicilina (PBPs) são uma família de acil-serina transferases bacterianas de origem evolutiva comum especificamente inibida pela ligação covalente de antibióticos β -lactâmicos em seus sítios ativos (SAUVAGE et al. 2008; ZAPUN et al. 2008). Estas enzimas (transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase) localizam-se logo abaixo da parede celular. A habilidade de penetrar na parede celular e o grau de afinidade destas proteínas com os antibióticos β -lactâmicos determinam a sua atividade antibacteriana. As bactérias, por sua vez, diferem na sua composição quanto ao tipo e à concentração de PBPs e, conseqüentemente, quanto à permeabilidade de suas paredes celulares ao antibiótico. Assim, temos diferentes suscetibilidades bacterianas aos diferentes antibióticos (YAN; GILBERT, 2004).

A proteína de ligação à penicilina (PBP) majoritária em *Escherichia coli* é a PBP5 (DE PEDRO et al. 2003). Ela, assim como a maioria das PBPs está ancorada à membrana citoplasmática com o seu sítio ativo no periplasma (GITTINGS, et al. 1994). Para exercerem sua função essas proteínas deslocam-se para a parede celular bacteriana para promover a ligação cruzada entre os peptídeos, o que não ocorre caso um antibiótico β -lactâmico esteja complexado às PBPs. A função proposta da PBP5 é regular a viabilidade de subunidades de pentapeptídeo para a formação das ligações cruzadas através de transpeptidação (DEN BLAAUWEN, et al. 2008; POTLURI, et al. 2010).

2.6 Antibióticos

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia – uso de substâncias químicas contra infecções – foi responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de microrganismos, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro (PATRICK, 2005). Porém, o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928 (NICOLAOU; MONTAGNON, 2008).

As principais classes de substâncias antimicrobianas possuem como alvo de ação: a inibição da síntese proteica bacteriana, a replicação do ácido nucléico e seu reparo e a biossíntese de enzimas essenciais à formação da parede celular (HANCOCK, 2005).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas,

monobactamas, oxapeninas, penens e inibidores de β – Lactamase), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (PATRICK, 2005; PUPO et al. 2006; ABRAHAM, 2003).

O uso dos antimicrobianos revolucionou a abordagem das infecções e o seu sucesso gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, a prescrição nem sempre criteriosa ou racional desses antimicrobianos, rapidamente gerou dificuldades para seu uso, devido à progressiva resistência bacteriana a esses fármacos (MONTELLI; SADATSUNE, 2001).

O aparecimento e a disseminação de microrganismos com múltipla resistência aos antimicrobianos estão ocorrendo tanto nos hospitais quanto nas comunidades. Isto pode ser o resultado da interação de vários fatores, sendo talvez o mais importante, a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos sobre os microrganismos, dificultando assim, a sua sobrevivência na presença de agentes antimicrobianos (MCGOWAN; TENOVER, 1997). Por outro lado, não pode ser esquecida a troca de informações genéticas entre microrganismos, com transferência de genes para novos hospedeiros, e as mutações que podem ocorrer nos genes de resistência ampliando seu espectro de resistência (DEFLAUN; LEVY, 1989; TENOVER; HUGHES, 1996).

2.7 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos constituem a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas. Hoje, várias décadas após a descoberta da penicilina, este grupo ainda contém os agentes mais comumente utilizados. Possuem amplo espectro de atividade antibacteriana, eficácia clínica e excelente perfil de segurança, uma vez que atuam na enzima transpeptidase, única em bactérias

(GUIMARÃES et al. 2010). Por isso, o estudo dessa ampla família de antimicrobianos segue sendo uma área de investigação de grande atividade. Conhecer com o máximo de detalhe possível os processos associados ao efeito antibiótico e à resistência bacteriana permitirá, por um lado, desenvolver novos compostos, e por outro, utilizar de um modo mais racional o arsenal terapêutico disponível (FERNÁNDEZ, 2007).

Os antibióticos β -lactâmicos, antibióticos que têm em comum um anel β -lactâmico, incluem quatro tipos principais: penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas e monobactamas. Quando as bactérias são expostas a antibióticos desta classe, estes se ligam as PBPs na parede celular, dentre as quais se encontram as transpeptidases. Todos os antibióticos β -lactâmicos inibem a etapa final da biossíntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana, impedindo a reação de transpeptidação, responsável pela formação das ligações cruzadas entre as cadeias laterais de polissacarídeos presentes no peptidoglicano da parede celular. Embora a parede celular continue a ser formada, esta se torna progressivamente mais fraca, à medida que o esqueleto de peptidoglicano é incorporado. Além disso, o complexo antibiótico–PBP estimula a liberação de autolisinas, que atuam na parede celular existente. Com uma parede celular fragilizada e degradada, as diferenças de pressões osmóticas entre os meios extracelular e intracelular provocam a lise da célula, resultando na morte da bactéria (SALYERS; WHITT, 1994; MADIGAN et al. 2004).

Todos os antibióticos β -lactâmicos têm um elemento estrutural farmacofórico em comum, o anel azetidina de quatro membros, ou anel β -lactâmico (Figura 5). Este anel é o centro da atividade da molécula. Ele desencadeia uma reação de acilação com as enzimas D-alanil-D-alanina transpeptidases, promovendo uma ligação cruzada (*cross-linking*) entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicana. Essa interligação é o passo final da síntese da parede celular, esse processo é conhecido como transpeptidação, é ele que confere à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio (VON NUSSBAUM et al. 2006; SUARÉZ; GUDIOL, 2009).

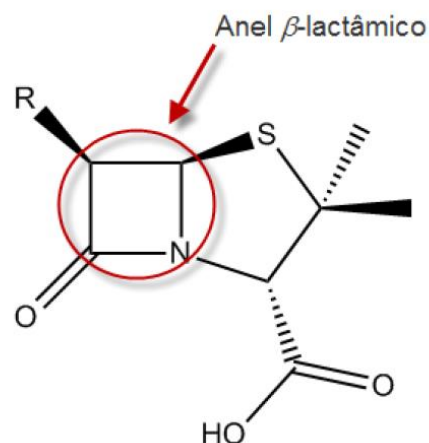
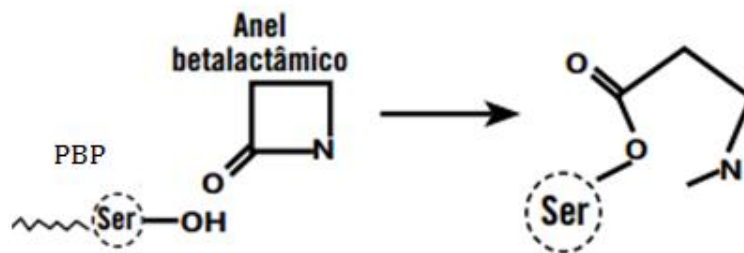


Figura 5: Estrutura química geral dos antibióticos β-lactâmicos. Fonte: AFONSO, 2008.

Na maioria dos antibióticos, o anel β-lactâmico é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou seis (di-hidrotiazínico) membros, formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente (VON NUSSBAUM et al. 2006; SUARÉZ; GUDIOL, 2009). Em geral, o sistema bicíclico é fundamental para a atividade destes antibióticos, por mimetizar o resíduo dipeptídico terminal D-alanil-D-alanina da cadeia peptidoglicana, substrato da enzima transpeptidase. O sistema bicíclico tensionado destes antibióticos contribui para o aumento da instabilidade química do anel β-lactâmico, altamente suscetível ao ataque de nucleófilos que promovem a hidrólise do grupo farmacofórico (GUIMARÃES et al. 2010). O anel β-lactâmico é atacado (Figura 6A e 6B) pelo grupo alcóxi livre do resíduo de serina do sítio ativo das PBPs, resultando na formação de um grupo acil-éster colavente (LIVERMORE, 1995).

A



B

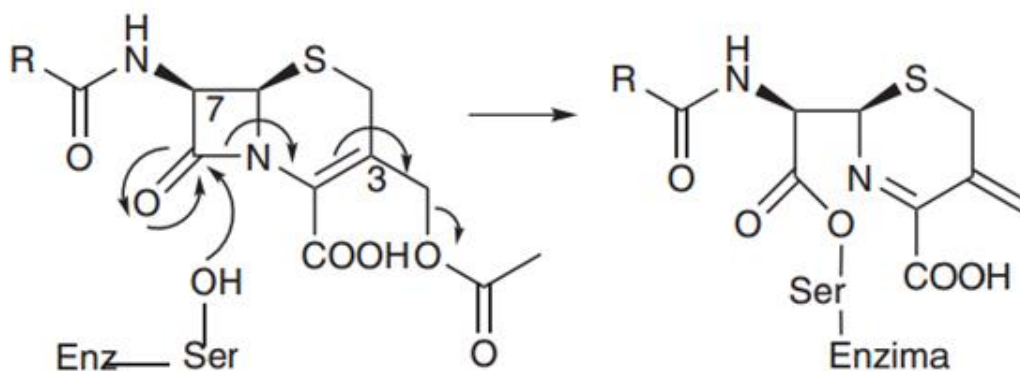


Figura 6: (A) Mecanismo de hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por PBP. PBP: Proteína de Ligação à Penicilina; Ser: serina. (B) Mecanismo de ação das cefalosporinas. Adaptado de Livermore (1995).

As PBPs são receptores dos antibióticos β -lactâmicos presentes na membrana interna bacteriana, que atuam como enzimas reguladoras da transpeptidação. A inibição da última etapa da síntese do peptidoglicano é possível devido à semelhança estrutural entre os compostos β -lactâmicos e a D-alanil-D-alanina terminal presente na estrutura do peptidoglicano (Figura 7) (NICHOLAS; STROMINGER, 1988).



Figura 7: Semelhança estrutural entre o sistema β -lactâmico (direita) e a sequência terminal D-alanil-D-alanina (esquerda). Fonte: NICHOLAS; STROMINGER, 1988.

A resistência a agentes antimicrobianos não é um fenômeno recente. A detecção das β -lactamases, tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, remonta-se aos inícios dos anos 40, antes do uso generalizado da penicilina no mundo todo (ABRAAM; CHAIN, 1940; KIRBY, 1944). A produção de enzimas β -lactamases, tem sido relatada como um importante mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, hidrolisando o anel β -lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999).

A produção dessa enzima por um microrganismo explica o porquê da sua sobrevivência em um foco infeccioso, apesar do uso de um antibiótico β -lactâmico. Além disso, a presença desses microrganismos produtores de β -lactamase pode favorecer a sobrevivência de outros microrganismos sensíveis ao antibiótico em um processo infeccioso (TAVARES, 2001).

2.8 Cefalosporinas

A primeira fonte das cefalosporinas, *Cephalosporium acremonium* (Figura 8), foi isolada em 1948 a partir do microrganismo denominado Brotzu do mar, em uma localidade próxima a uma saída de esgoto na costa da Sardenha, Itália. Foi constatado que os filtrados não tratados de cultura destes microrganismos inibiam *in vitro* o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, verificou-se que os líquidos de culturas nos quais o fungo da

Sardenha era cultivado continham três antibióticos distintos, que foram denominados inicialmente de cefalosporina P, N e C. Com o isolamento do núcleo ativo da cefalosporina C, o ácido 7-aminocefalosporânico, e com o acréscimo de cadeias laterais, foi possível produzir substâncias semissintéticas com uma atividade antibacteriana muito maior do que a substância original. (HARDAMAN et al. 1995).



Figura 8: Colônia do fungo *Cephalosporium acremonium*. Fonte: <http://s683.photobucket.com/user/dmwake/media/MIC425L%201-26-2010/CephalosporiumAcremoniumKillense2.jpg.html>.

Assim como as penicilinas, as cefalosporinas são classificadas como antibióticos β -lactâmicos e podem ser de origem natural (fungo *Cephalosporium*) ou de origem semissintética (BARCENILLA et al. 2001). Existem vários tipos de cefalosporinas que apresentam modificações nos radicais R1 e R2 (Figura 9A). O sistema bicíclico das cefalosporinas é menos tensionado em comparação ao das penicilinas (Figura 9B), o que contribui para a maior estabilidade frente à reação de abertura intramolecular do anel β -lactâmico pela cadeia lateral (PATRICK, 2005; SUARÉZ; GUDIOL, 2009).

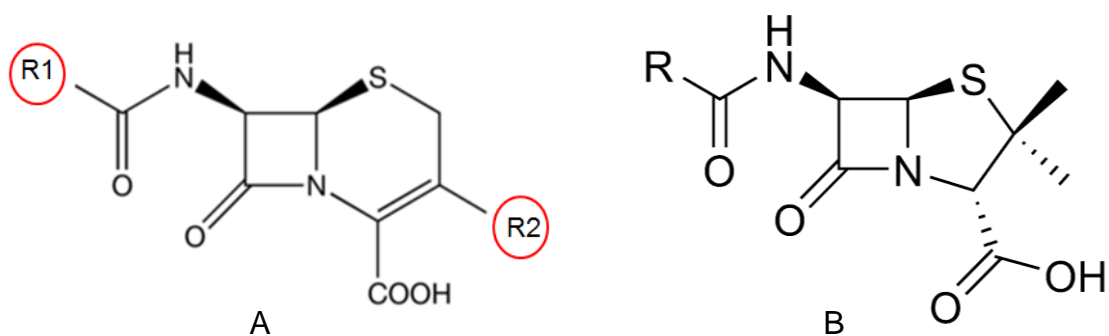


Figura 9: Estrutura química geral das cefalosporinas (A) e estrutura química geral das penicilinas (B).

O maior número de antibióticos β -lactâmicos em uso clínico pertence à classe das cefalosporinas, que, atualmente, estão subdivididas em 4 grupos: cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações.

Cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefadroxil e cefradina), sendo indicadas para infecções estafilocócicas com cepas sensíveis a oxacilina, infecções respiratórias por *Haemophilus influenzae* e pneumococos sensíveis à penicilina, dentre outras (HOOPER, 2005; BOMONO; SZABO, 2006).

Cefalosporina de 2ª geração (cefexetina, cefamandol, cefaclor e cefuroxima), resistentes a β -lactamase, produzida por Gram negativos e que apresentam uma boa atividade frente às cepas anaeróbias estritas e algumas enterobactérias (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae*) (HOOPER, 2005; BOMONO; SZABO, 2006).

Cefalosporinas de 3ª geração (ceftriaxona, cefotaxima, cefoperazona, ceftazidima, cefpodoxima e cefixima), são ainda mais resistentes a inativação pela β -lactamase, sendo indicadas no caso de infecções por Gram negativos resistentes como as cepas intra-hospitalares e no caso de meningite causada por *Haemophilus influenzae*, dentre outras (BOMONO; SZABO, 2006).

Cefalosporina de 4ª geração (cefepima e cefipiroma) são resistentes a β -lactamase de enterobactérias e podem agir sobre alguns cocos Gram positivos e bactérias anaeróbias (BOMONO; SZABO, 2006).

Nos últimos anos tem sido observada maior incidência de bacilos Gram negativos resistentes a cefalosporinas de espectro ampliado no ambiente hospitalar, ocasionando, assim, maior uso de β -lactâmicos mais potentes, como os carbapenens (QUINTEIRA et al. 2005).

2.9 Cefoxitina

A cefoxitina é um antibiótico semissintético pertence ao subgrupo cefamicina das cefalosporinas de segunda geração (PATRICK, 2005; SUARÉZ; GUDIOL, 2009). As cefamicinas são extraídas de culturas de amostras de diversas espécies de *Streptomyces* (Figura 10) (*S. clavuligenus*, *S. griseus*, *S. lactamdurans*), conhecendo-se as cefamicinas A, B e C. A cefoxitina é um derivado da cefamicina C e apresenta estrutura química (Figura 11) parecida à cefalotina, diferenciando-se pela presença do grupo metóxi no carbono 7 do anel β -lactâmico, o que caracteriza as cefamicinas (TAVARES, 1982).



Figura 10: Colônia do fungo *Streptomyces*. Fotografado por Ramón Santamaría. IMB/CSIS-USAL. Salamanca. Fonte: www.flickr.com/photos/canalbiologia/3586958274.

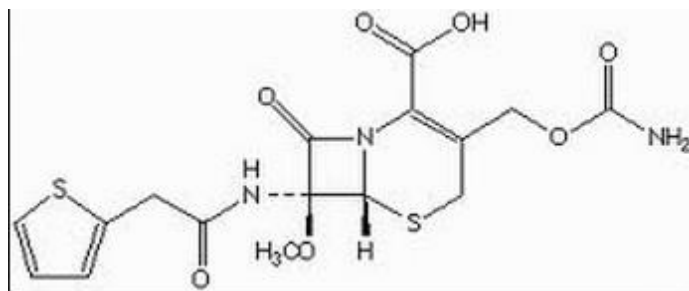


Figura 11: Estrutura química da cefoxitina.

A cefoxitina tem por característica principal a sua notável eficiência por apresentar um amplo espectro de ação, devido à resistência à inativação por β -lactamases de bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas (CHAMBERS, 2005). A cefoxitina apresenta atividade variada frente a bactérias Gram positivas, e atividade superior frente a bactérias Gram negativas (PATRICK, 2005; SUARÉZ; GUDIOL, 2009); porém a principal característica é a excelente atividade sobre anaeróbios, principalmente Bacteróides (*Bacteroides fragilis*), além de possuir atividade sobre as bactérias do gênero *Serratia* (anaeróbias facultativas) (TAVARES, 1982).

A cefoxitina é indicada para o tratamento de infecções graves, particularmente nas septicemias por bacilos Gram negativos, peritonites e infecções pós-operatórias de cirurgias intestinal e ginecológica, no qual as bactérias mais implicadas são o *B. fragilis* e as enterobactérias. Também é utilizada para a profilaxia de infecções mistas por aeróbios e anaeróbios, principalmente infecções abdominais e pélvicas, abscessos pulmonares, e profilaxia de cirurgias colorretais (CHAMBERS, 2005).

A cefoxitina foi introduzida por Karady e colaboradores em 1972 resultante de pesquisas desenvolvidas nos Laboratórios de Pesquisa Merck Sharp & Dohme, Estados Unidos. O medicamento é estável no organismo humano, possui biotransformação muito pequena, não sofrendo metabolização por esterasas teciduais; é eliminado principalmente na urina (via renal), como droga inalterada. É apresentado sob a forma de sal sódico. Em experimento animal, a cefoxitina não tem mostrado toxicidade, porém ela pode potencializar a toxicidade renal dos aminoglicosídeos (TAVARES, 1982).

2.10 Antibiograma

Antibiograma é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) (LABORCLIN, 2013).

A metodologia de Kirby e Bauer para antibiograma é a mais difundida e utilizada até hoje na rotina de análises clínicas, devido a sua praticidade de execução, baixo custo e confiabilidade de seus resultados. Apesar de sua relativa simplicidade de execução, a técnica de Kirby e Bauer exige que as instruções sejam seguidas rigorosamente de forma que os resultados obtidos correspondam à realidade e possam ser comparados com as tabelas internacionais (LABORCLIN, 2013).

O procedimento consiste no preparo de uma suspensão de bactérias de cultivo recente, inoculação desta suspensão na superfície de uma placa de Ágar Müller-Hinton, e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. Após a incubação em estufa, é analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo então medido o tamanho de cada halo e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise (LABORCLIN, 2013).

De acordo com o documento M2-A8 do Instituto de Padrões Clínico e Laboratorial/“*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI), a categoria de interpretação do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana é baseada na resposta *in vitro* de um organismo a um agente antimicrobiano nas concentrações séricas ou teciduais que este agente pode alcançar quando as doses habitualmente prescritas deste agente são utilizadas. A categoria “sensível” significa que uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose do agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e patógeno, exceto quando contraindicado. A categoria “intermediária” inclui isolados com Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do agente antimicrobiano que se aproximam de níveis sanguíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas apresentadas por isolados sensíveis. A categoria “intermediária” implica

eficácia clínica nos sítios corpóreos, onde as drogas se concentram fisiologicamente (ex., quinolonas e β -lactâmicos na urina) ou quando for possível utilizar uma dose maior do fármaco que a normal (ex., β -lactâmicos). Essa categoria também inclui uma zona-tampão, a qual deverá impedir que pequenos fatores técnicos não sujeitos a controle causem discrepâncias importantes na interpretação, especialmente no caso de drogas com pequenas margens de farmacotoxicidade. As cepas “resistentes” não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos geralmente atingíveis nos regimes terapêuticos habituais; e/ou podem ter os diâmetros do halo de inibição dentro de uma faixa de maior probabilidade de ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (ex., β -lactamases), além de a eficácia clínica não ter sido confiável nos estudos terapêuticos. Para a maioria dos agentes antimicrobianos, essas categorias foram desenvolvidas comparando, inicialmente, os diâmetros dos halos às CIMs de um grande número de isolados, incluindo aqueles com mecanismos de resistência conhecidos e relevantes para a classe específica de droga antimicrobiana. Os diâmetros dos halos de inibição nos testes de disco-difusão estão inversamente correlacionados às CIMs dos testes de diluição padronizados.

2.11 Cristalografia

Para entender um pouco mais sobre as doenças e os efeitos dos medicamentos, o conhecimento estrutural dos fármacos se torna extremamente importante, porque no mundo das moléculas bioativas, função e estrutura estão inter-relacionadas. Em Farmacologia, a ação da maioria dos fármacos envolve interações fármaco-receptor, e a maneira como isto acontece é determinada pela estrutura de ambos os componentes. Para entender como ocorrem essas interações faz-se necessário compreender a distribuição espacial relativa dos átomos constituintes de um dado sistema (DRENTH, 1994).

Uma variedade de métodos encontra-se disponível hoje, com os quais se podem determinar a estrutura dos receptores e seus complexos com os respectivos ligantes (sejam eles agonistas totais, parciais ou antagonistas). Entre eles pode-se citar a Cristalografia de Raios-X de Alta Resolução, que mostra quais subunidades do ligante estão interagindo com quais regiões do receptor e onde as interações por ligação hidrogênio e hidrofóbicas estão ocorrendo. Similarmente, as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) bi e tridimensionais podem fornecer detalhes das interações que há pouco tempo ainda não eram conhecidas (MORRIS, 1999; BECKMAN, 2003).

A cristalografia é a ciência experimental que tem como objetivo o conhecimento da estrutura dos materiais em nível atômico e das relações entre essa estrutura e suas propriedades físico-químicas, portanto, estuda a disposição dos átomos em sólidos, o que inclui os cristais. Os cristais são sólidos cujos átomos, moléculas ou íons que os constituem estão dispostos conforme um padrão tridimensional bem definido (estrutura interna ordenada), que se repete no espaço e adquire uma estrutura geométrica específica. (NAPOLITANO et al. 2007).

A cristalografia de raios-X é uma metodologia de determinação da estrutura molecular baseada no fenômeno da difração que ocorre devido à interação da radiação eletromagnética com a matéria cristalina, não necessitando conhecimento algum a respeito do composto a priori (DRENTH, 1994). Essa metodologia permite o conhecimento da disposição tridimensional dos átomos da estrutura molecular para compostos no estado cristalino. Nesse sentido, o trabalho de caracterização estrutural da amostra cristalina é a construção da densidade eletrônica dos átomos a partir das amplitudes e fases dos fatores de estrutura. Precisamente conhecidas as posições dos átomos, são calculadas as distâncias interatômicas, os ângulos de ligação, os ângulos conformacionais e são determinadas as interações intermoleculares envolvidas no empacotamento molecular (DESCHAMPS, 2010).

Em nível experimental, o conhecimento da estrutura molecular de uma substância não é tarefa simples. Não são muitos os métodos capazes de caracterizar completamente uma dada estrutura, permitindo sua descrição precisa em termos de distâncias e ângulos de ligação, além de ângulos de

torção (ou ângulos diedro) que definem sua conformação. A cristalografia de raios-X (ABRAHAM, 1989; MARTIN et al. 1990) é, ainda, a técnica experimental mais eficiente para a obtenção destes dados. Limita-se, todavia, a substâncias em fase cristalinas. Além disso, não há garantia de que a conformação no estado cristalino seja a mesma das moléculas em solução (ABRAHAM, 1989; PROPST et al. 1989), ou ainda a geometria assumida no complexo fármaco-receptor na biofase.

A difração de raios-X aplicada à análise de cristais de macromoléculas biológicas é a técnica que mais tem influenciado a bioquímica estrutural, tendo contribuído para o conhecimento da estrutura tridimensional de proteínas, ácidos nucleicos, vírus e outras macromoléculas (KENDREW, 1958). Estes estudos têm permitido compreender melhor os princípios básicos da arquitetura das proteínas, bem como estudar, num detalhe em nível atômico, os centros catalíticos de enzimas e compreender a especificidade das reações que estas catalisam. O conhecimento da estrutura tridimensional permite investigar as relações entre sequência primária, estrutura e função, com uma indiscutível importância no desenvolvimento específico de fármacos (“*drug design*”) (ROMÃO, 1996).

O trabalho de determinação da estrutura tridimensional através da cristalografia de raios-X envolve as seguintes etapas: síntese, cristalização, coleta de dados, processamento dos dados, resolução da estrutura, refinamento, validação e análise do modelo cristalográfico e ainda depósito da estrutura no banco de dados apropriado. Essa última etapa é, às vezes, suprimida quando há algum valor econômico agregado à estrutura resolvida. (NAPOLITANO et al. 2004). A coleta de dados é o procedimento de medida das intensidades difratadas e o processamento é a preparação desses dados para as etapas seguintes (NAPOLITANO et al. 2007).

O primeiro passo envolvido na resolução da estrutura de proteínas por análise cristalográfica envolve o isolamento e a purificação da proteína de um determinado organismo, e a sua cristalização numa forma adequada à recolha dos dados de difração de raios-X. Uma vez obtidos monocristais da proteína purificada, medem-se as direções e as intensidades dos raios-X difratados por esses cristais. Os dados são, então, trabalhados e, por meio de métodos de

cálculo automático, produz-se uma “imagem do conteúdo do cristal” em termos de um mapa de densidade eletrônica. Esta “imagem” tem, então, que ser interpretada com a ajuda de variados métodos de cálculos e o uso de estações gráficas, que, permitindo uma visualização tridimensional, facilitam a construção de um modelo molecular consistente com a imagem inicialmente obtida (Figura 12). O modelo resultante é, portanto, a consequência de todo um processo de análise cristalográfica, não se devendo, no entanto, encará-lo como a entidade real que foi “de fato” observada (ROMÃO, 1996). Na figura 13 tem-se um exemplo de imagem obtida por cristalografia de difração de raios-X.

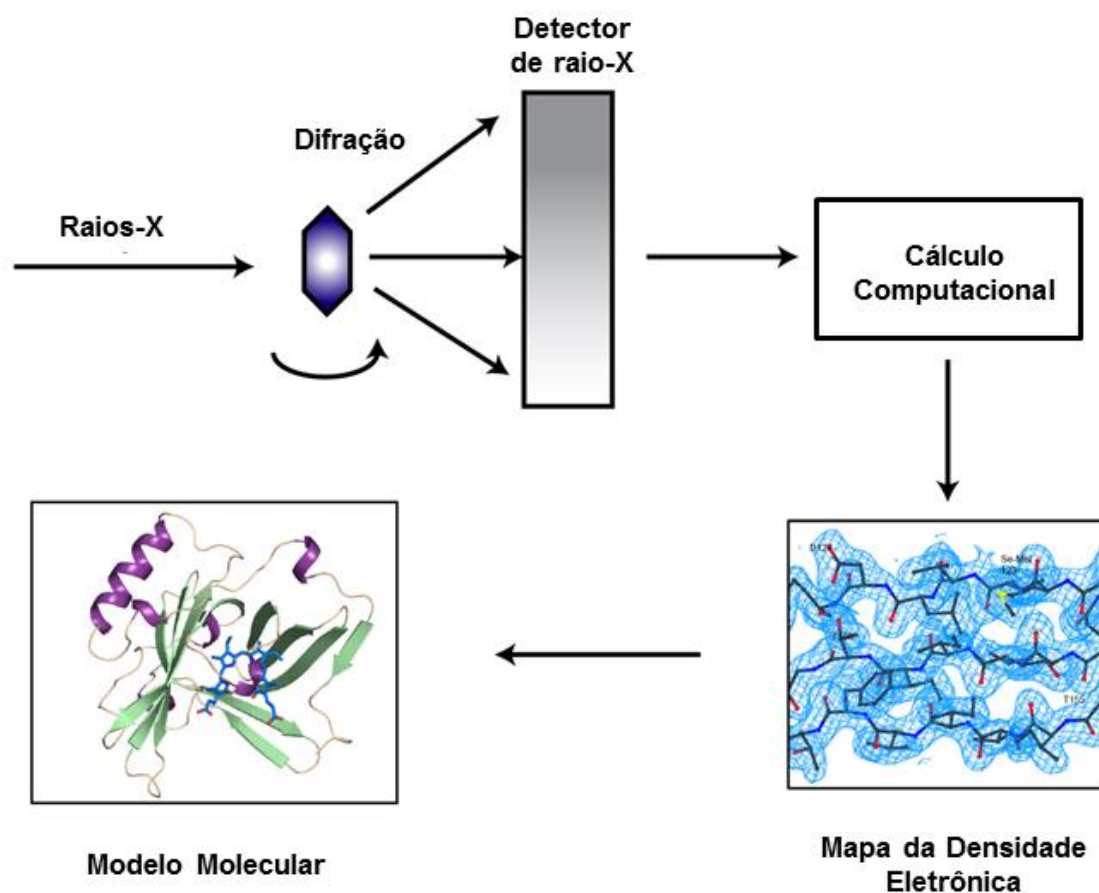


Figura 12: Resumo esquemático do método de cristalografia por difração de raios-X. Adaptado de Project crystal, 2013.

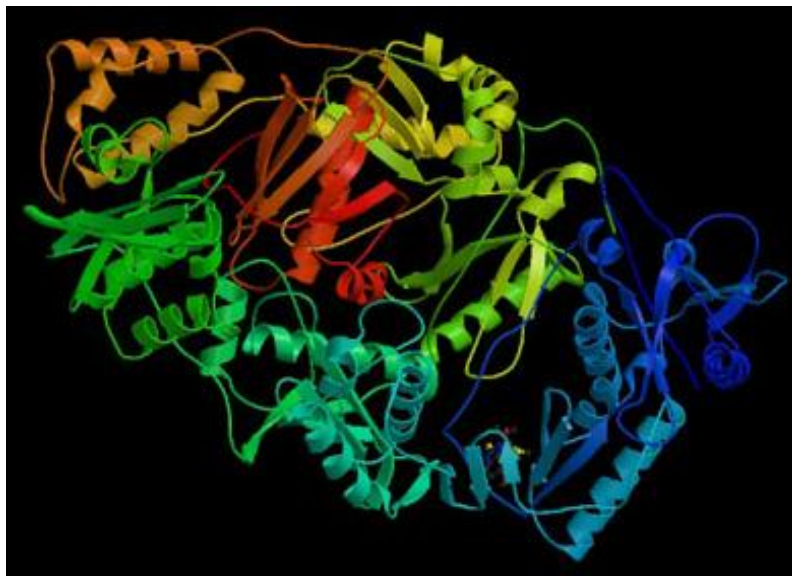


Figura 13: Imagem de uma proteína obtida por cristalografia de difração de raios-X. Fonte: PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Desta forma, através dessa metodologia pode-se determinar as posições relativas de todos os átomos que constituem a molécula (estrutura molecular) e a posição relativa de todas as moléculas que constituem a cela unitária (estrutura cristalina). Pode-se, portanto estabelecer os ângulos e as distâncias interatômicas da estrutura cristalina, bem como as interações intermoleculares (Van der Waals, dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, entre outras interações não covalentes) (NAPOLITANO et al. 2007).

2.12 Modelagem Molecular

Modelos são representações simplificadas de objetos e fenômenos físicos reais. A modelagem consiste na construção e manipulação de modelos com o objetivo de compreender mais profundamente os elementos por eles representados (ANDREI, 2012).

A Modelagem Molecular, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada/“*International Union of Pure and Applied Chemistry*” (IUPAC), é

a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional (CARVALHO et al. 2003). Ela compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais, sendo usada para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras (SANTOS et al. 2007). Esses métodos abrangem estudos de minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular, entre outros, sendo aplicáveis desde átomos isolados a biomacromoléculas (KITCHEN et al. 2004; VERLI; BARREIRO, 2005).

A Modelagem Molecular fornece informações importantes para o processo de planejamento de fármacos, pois permite a obtenção de propriedades específicas de um composto que podem influenciar na interação com seu receptor, como o logP, a refatividade molar, o mapa de potencial eletrostático, o contorno da densidade eletrônica e as energias dos orbitais de fronteira HOMO (Orbital Molecular Mais Alto Ocupado/“*Highest Occupied Molecular Orbital*”) e LUMO (Orbital Molecular Mais Baixo Desocupado/“*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*”) (SANTOS, 2007). Assim, ela tem se tornado uma ferramenta indispensável não somente no processo de planejamento, mas também na otimização de protótipos já existentes (BARREIRO et al. 1997).

Atualmente, os sistemas de Modelagem Molecular estão munidos de poderosas ferramentas para construção, visualização, análise e armazenamento de modelos de sistemas moleculares complexos que auxiliam na interpretação das relações entre a estrutura e a atividade biológica. A Modelagem Molecular pode ser aplicada ao planejamento de fármacos de modo direto ou indireto. Indiretamente, quando não se dispõe da estrutura do receptor, na tentativa de se obter parâmetros eletrônicos e estéricos que elucidem as relações estrutura-atividade biológica. Diretamente, quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico, na tentativa de compreender as interações dos complexos ligante-receptor. Ambos os modos tentam otimizar o encaixe da molécula com o receptor. A Modelagem Molecular e suas representações gráficas permitem explorar aspectos tridimensionais de

reconhecimento molecular e gerar hipóteses que levam ao planejamento e síntese de novos ligantes (SILVA, 2006).

A modelagem molecular aplicada ao planejamento de fármacos tem como um dos seus objetivos a descoberta do farmacóforo, que é definido como a coleção mínima de átomos espacialmente dispostos de maneira a levar a uma resposta biológica. Esta definição tem sido refinada para incluir restrições topográficas e tridimensionais. O conhecimento que os sítios ativos de enzimas e certos sítios receptores são estereosseletivos e estereoespecíficos justifica o estudo das conformações das moléculas de fármacos que podem interagir com estes sítios. A interação da molécula do fármaco com o receptor leva a uma mudança conformacional que é ultimamente observada como a resposta farmacológica. Um sítio receptor pode ligar-se a apenas uma das várias conformações de uma molécula flexível. Esta conformação farmacofórica tem o arranjo espacial correto de todos os grupos ligantes da molécula do fármaco para o alinhamento com os sítios de ligação do receptor. Aquelas moléculas que podem adotar uma conformação que é capaz de se ligar ao receptor podem agir como agonistas ou como antagonistas. Os antagonistas ligam-se ao receptor, mas não são capazes de promover a resposta biológica (SILVA, 2006).

Os métodos de cálculo usados na modelagem molecular podem ser clássicos, como a mecânica molecular (MM), ou quânticos, como os métodos *ab initio* e semiempíricos. Em geral, a escolha do método a ser utilizado está fortemente relacionada com o conjunto de propriedades que se deseja obter e com o número de partícula que compõem o modelo utilizado para representar o sistema a ser estudado.

2.12.1 INTERAÇÕES FÁRMACO-RECEPTOR

As interações de um fármaco com seu receptor biológico são determinadas por forças intermoleculares, ou seja, forças eletrostáticas, forças de Van der Waals e ligações covalentes. Assim sendo, substâncias que

apresentam propriedades terapêuticas, ao interagirem com um alvo específico (uma enzima, um receptor, um canal de íons, um ácido nucleico ou qualquer outra macromolécula biológica), devem possuir uma estrutura tridimensional de forma que as disposições de seus grupos funcionais favoreçam uma maior complementaridade ao sítio de ligação. Ou seja, quanto melhor o “encaixe” e a complementaridade das propriedades superficiais de um fármaco, maior será sua afinidade e maior poderá ser sua atividade biológica (KUBINYI, 1993; BARREIRO; FRAGA, 2001).

Para descrever os tipos de interações entre um ligante e o seu receptor biológico pode-se utilizar um conjunto extenso de propriedades moleculares, uma vez que estas propriedades estão diretamente relacionadas às forças intermoleculares envolvidas na interação ligante-receptor, assim como estão relacionadas às propriedades de transporte e de distribuição dos fármacos. Descritores moleculares representam uma importante ferramenta para prever as propriedades das substâncias, classificar estruturas químicas ou procurar similaridades entre elas (SUFFREDINI, 2005; TOLEDO et al. 2005; TOLEDO et al. 2006).

Estudos das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica, ou entre a estrutura química e algum tipo de propriedade físico-química, são de grande importância na química e na bioquímica modernas. O objetivo central desses estudos é racionalizar a procura por compostos com propriedades desejadas utilizando cálculos computacionais. Uma vez que a correlação entre estrutura/propriedade e atividade é encontrada, um grande número de compostos, incluindo aqueles que ainda não foram sintetizados, pode ser facilmente examinado no computador com o objetivo de selecionar estruturas com as propriedades desejadas. Desta forma, é possível selecionar os compostos mais promissores para síntese e testes em laboratórios. Pode-se dizer que esses estudos são considerados ótimas ferramentas para acelerar e obter êxito no processo de desenvolvimento de novas moléculas a serem utilizadas como fármacos, materiais, aditivos e outras finalidades (PASHA, et al. 2005; PADMANABHAN et al. 2006; HONÓRIO, et al. 2007; GHASEMI et al. 2007; WEBER et al. 2008; TOROPOV et al. 2008). Muitos descritores refletem propriedades moleculares simples, e importantes, e

podem fornecer subsídios sobre a natureza físico-química da atividade/propriedade em estudo (KARELSON; LOBANOV, 1996).

2.12.2 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS *in silico*

A sobrevivência e crescimento da indústria farmacêutica requerem investimentos significativos em pesquisa e desenvolvimento de novas entidades químicas, que possam atuar como fármacos com maior eficácia e seletividade. Entretanto, esse processo é custoso, demanda tempo, além de ser altamente arriscado, visto que a probabilidade de sucesso é inferior a 20 % (YU YU; GITTINS, 2008).

Assim, para minimizar tempo e custos, inovações científicas e tecnológicas que combinam conhecimentos multidisciplinares de informática, biotecnologia, química e biologia surgem como ferramentas que auxiliam no planejamento de novos fármacos. O planejamento de fármacos auxiliado por computador ("*Computer Aided Drug Design*" - CADD) é uma dessas evoluções tecnológicas promissoras (TANG et al. 2006), visto que a modelagem molecular possibilita a construção, visualização, manipulação e estocagem de modelos moleculares tridimensionais, incluindo também análise conformacional, cálculos de propriedades estéricas, eletrônicas, físicas entre outras (PASSAMANI, 2009).

Como todo processo de desenvolvimento de um novo fármaco inicia com um grande número de candidatos, o CADD permite a elaboração precoce de moléculas com perfil adequado e direciona a pesquisa para moléculas mais ativas, minimizando o universo de compostos a serem analisados, com isso os gastos na pesquisa de novos fármacos podem reduzir em até 50% (GELDENHUYS et al. 2006).

Além de fornecer dados estruturais, os cálculos teóricos são usados também na computação de índices de interesse químico e farmacológico, tais como: calores de formação, energias eletrônicas, energias do HOMO e do LUMO, energias de ionização, densidades eletrônicas atômicas, cargas

atômicas líquidas, densidades eletrônicas dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), ordens de ligação e momentos de dipolo, entre outros (COHEN, et al. 1990; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1976). Dentre estes parâmetros, a energia do HOMO mede o caráter elétron-doador de um composto e a energia do LUMO mede o caráter elétron-aceitador. Uma maior energia do HOMO está correlacionada com uma maior capacidade de doar elétrons, enquanto uma menor energia do LUMO está relacionada a uma maior facilidade em aceitar elétrons (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1976; FLEMING, 1978). As energias do HOMO e do LUMO têm sido usadas há algumas décadas como índices de reatividade química (HEATON et al. 2001).

As teorias desenvolvidas para explicar a atividade farmacológica das drogas sustentam-se, numa primeira aproximação, no paradigma da "chave-fechadura" (SILVERMANN, 1992). Neste modelo, as "fechaduras" ou receptores celulares são biomacromoléculas de extrema sensibilidade, responsáveis pelo reconhecimento molecular de espécies endógenas e exógenas capazes de apresentar atividade biológica. Estes receptores interagem reversivelmente, em geral, com as moléculas bioativas (mediadores celulares endógenos e fármacos), consideradas neste modelo como as "chaves" (BARREIRO et al. 1997).

Os complexos formados entre as moléculas bioativas e os receptores provocam as respostas biológicas e dependem de um mecanismo de reconhecimento molecular que determina a seletividade dos biorreceptores. O padrão de seletividade é a expressão do reconhecimento em nível molecular de apenas uma substância dentre os inúmeros compostos estruturalmente relacionados disponíveis na biofase (BARREIRO et al. 1997).

Atualmente, o planejamento racional baseado em estrutura e no mecanismo de ação é a estratégia mais eficiente no desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos (também conhecidos como "compostos de partida" ou "*lead compounds*"), sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, eficácia e toxicidade), até a elaboração de compostos candidatos a testes clínicos. Esta estratégia é baseada no bloqueio ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos (DNA ou

RNA), associadas a diferentes processos patológicos. A informação estrutural do bioreceptor e/ou ligantes permite a descoberta e síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem vir a se tornar fármacos. Essa abordagem, em sua essência, caracteriza o planejamento racional de fármacos baseado em estrutura. O que ainda a torna mais atrativa, quando utilizada em proteínas, pois a maioria dos fármacos tem como alvo receptor esse tipo de biomacromoléculas (MARSHALL, 2004).

Desde a concepção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco a bioinformática, juntamente com a química computacional, vem oferecendo um excelente direcionamento no planejamento racional de fármacos, já com inúmeros casos de sucesso envolvendo o emprego de simulações computacionais (MARSHALL, 2004). Atualmente, o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é totalmente dependente da utilização de métodos computacionais (PEITSCH, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Fazer um estudo teórico, através de simulação computacional, do complexo cefoxitina-Proteína 5 de Ligação à Penicilina da *Escherichia coli* por dinâmica molecular e pelo método híbrido de mecânica quântica/mecânica molecular.

3.2 Objetivos específicos

- Através do antibiograma, avaliar a suscetibilidade da *E. coli* frente à cefoxitina;
- Através do antibiograma, avaliar a suscetibilidade da *E. coli* frente às cefalosporinas;
- Estudar a dinâmica molecular do complexo cefoxitina-PBP5 da *E. coli* através do método híbrido de QM/MM;
- Fazer um estudo teórico das interações intermoleculares específicas entre a cefoxitina e os resíduos de aminoácidos da PBP5 da *E. coli* (PDB:3MZE) através de modelagem molecular;
- Estudar o potencial eletrostático entre a cefoxitina e a PBP5 da *E. coli*;
- Correlacionar estatisticamente os resultados obtidos por simulação computacional com os resultados experimentais obtidos no antibiograma;
- Com os resultados das correlações, avaliar a possibilidade do desenvolvimento de um protótipo teórico computacional de suscetibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação da suscetibilidade antimicrobiana aos antibióticos

As cepas confirmadas e identificadas como *Escherichia coli*, foram testadas quanto à suscetibilidade a 5 (cinco) antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação (Tabela 1): Cefoxitina – CFO (30 µg), Cefepime – CPM (30 µg), Ceftazidima – CAZ (30 µg), Ciprofloxacina – CIP (5 µg) e Gentamicina – GEN (10 µg), por meio do antibiograma, pelo método de difusão em discos, conforme as normas do documento M2–A8, do CLSI (2003b).

Tabela 1: Classes de antibióticos utilizados na pesquisa e seus sítios de ação.

Classes	Antimicrobianos	Sítio de Ação
Cefalosporinas	Cefoxitina 30 µg (CFO)	Biossíntese da parede bacteriana
Cefalosporinas	Cefepime 30 µg (CPM)	Biossíntese da parede bacteriana
Cefalosporinas	Ceftazidima 30 µg (CAZ)	Biossíntese da parede bacteriana
Quinolonas	Ciprofloxacina 5 µg (CIP)	Biossíntese de ácidos nucleicos
Aminoglicosídeos	Gentamicina 10 µg (GEN)	Biossíntese de proteínas

Os inóculos para realização do antibiograma foram preparados a partir do crescimento bacteriano, em placas de petri contendo meio Ágar MacConkey (acumedia), Ágar Nutriente (HIMEDIA) ou Ágar Müller-Hinton (HIMEDIA), de uma cepa de *E. coli* ATCC 8739 (cedida pelo Instituto Evandro Chagas - IEC) e de um isolado clínico de *E. coli* proveniente de amostra clínica (urina) de paciente do Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN/PA) que apresentava infecção urinária. Essas placas contendo o crescimento bacteriano

foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 35-36 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi transferida uma alçada, contendo colônias, para solução salina esterilizada (NaCl) a 0,85% até que, depois de homogeneizado em agitador tipo Vortex, se alcançasse uma suspensão comparável à turbidez padrão correspondente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para essa comparação foi utilizado um turbidímetro (Densimat-Biomerieux), no comprimento de onda de 625 nm. Quando o inóculo inicial não ficou dentro do limite aceitável, a turbidez foi ajustada com mais bactéria ou mais salina estéril conforme a necessidade.

Em placa de petri, com 150 mm de diâmetro, contendo Ágar Müller-Hinton (HIMEDIA) numa espessura de aproximadamente 4 mm (60-70 mL de meio), o inóculo foi espalhado uniformemente com o auxílio de um swab estéril, de modo a cobrir homogeneamente toda a superfície da placa. Foram utilizados discos de papel (6 mm de diâmetro) impregnados com os antibióticos escolhidos, todos fabricados pela Laborclin® e adquiridos comercialmente da empresa Interlab. Após a secagem do esfregaço, os discos contendo concentrações dos antimicrobianos (Tabela 2) foram aplicados no meio inoculado com o auxílio de uma pinça estéril, e pressionados, levemente, sob a superfície do meio (Figura 14).

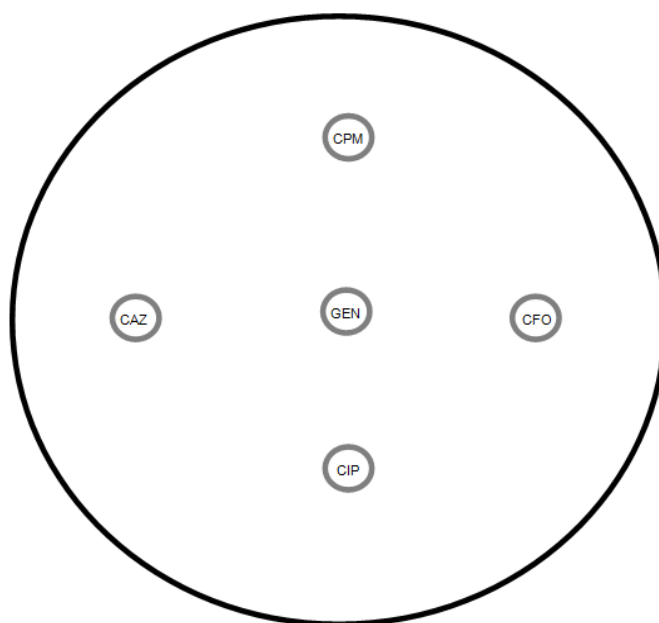


Figura 14: Esquema para aplicação de discos de antimicrobianos.
CFO – Cefoxitina 30 µg, CPM – Cefepime 30 µg, CAZ – Ceftazidima 30 µg, CIP – Ciprofloxacina 5 µg e GEN – Gentamicina 10 µg.

Em seguida, as placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 35-36 °C por 24h. Após esse período, a leitura do antibiograma foi realizada com auxílio de uma régua, a partir da medição em milímetros, do diâmetro dos halos de inibição do crescimento das colônias, frente ao antibiótico impregnado em cada disco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que, para a cepa proveniente de isolado clínico, os testes foram feitos com a adição de 10 µL de solução de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 0,1 M, e sem a adição de EDTA (LEE et al. 2001). O EDTA foi adicionado a fim de detectar a presença de metalo-β-lactamases, pois essas enzimas são inibidas pelo EDTA, que é um agente quelante (BUSH et al. 1995). A produção dessas enzimas, que hidrolisam os β-lactâmicos, tem sido comumente responsável pelo fenótipo de resistência a esses antimicrobianos (TOLEMAN et al. 2002).

Os isolados com diferença ≥ 5 mm entre o diâmetro do halo de inibição com disco com antimicrobianos adicionado de EDTA e diâmetro do halo de inibição do disco sem EDTA foram considerados potenciais produtores de β-lactamases.

Os resultados obtidos foram comparados com os da tabela padrão, que contém os parâmetros da Tabela 2A, do documento M100-S17 (CLSI, 2007b). Esses resultados também foram interpretados pela tabela fornecida pelo fabricante (Laborclin)®, de 2013. Ambas as tabelas apresentam os mesmos valores, o que permitiu a classificação das cepas em sensíveis, intermediárias ou resistentes para cada antibiótico testado (Tabela 2).

Tabela 2: Antimicrobianos e seus respectivos valores dos halos de inibição propostos para as Enterobactérias (CLSI, 2007b; LABORCLIN, 2013).

Antimicrobiano	Tamanho do halo de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Cefoxitina 30 µg	≤14	15-17	≥18
Cefepime 30 µg	≤14	15-17	≥18
Ceftazidima 30 µg	≤14	15-17	≥18
Ciprofloxacina 5 µg	≤15	16-20	≥21
Gentamicina 10 µg	≤12	13-14	≥15

4.2 Métodos Computacionais de Modelagem Molecular

4.2.1 MÉTODOS DE MECÂNICA MOLECULAR (MM)

Os métodos de mecânica molecular (MM) estão baseados nas equações de movimento, estabelecidas segundo as Leis de Isaac Newton e, principalmente, baseados na aproximação de Born-Oppenheimer, a qual sugere que pelo fato de a massa nuclear ser maior que a massa do elétron, os dois problemas podem ser tratados separadamente (COELHO et al. 1999). Assim, nesta aproximação os núcleos assumem posição fixa, enquanto os elétrons se movem pelo campo produzido pelos núcleos em cada instante de tempo. Este campo é também chamado de superfície de Born-Oppenheimer, conhecida como Superfície de Energia Potencial (SEP), é multidimensional e descreve a energia de uma molécula em termos das posições nucleares. Esta superfície possui mínimos locais em relação a uma ou algumas conformações moleculares estáveis e, em uma primeira aproximação, a molécula é descrita pela estrutura correspondente ao mínimo global da superfície potencial (CRAMER, 2004).

Os cálculos de MM, também chamado de cálculos de campo de força, utilizam uma série de equações derivadas empiricamente para a superfície de Born-Oppenheimer, cujo formalismo matemático está baseado num modelo de mecânica clássica de estrutura molecular (CRAMER, 2004).

Neste método, os elétrons e o núcleo dos átomos não são explicitamente incluídos nos cálculos, pois a mecânica clássica não descreve o comportamento de partículas muito pequenas, como é o caso dos elétrons e núcleos de átomos e de moléculas (LEACH, 2001; HÖLTJE et al. 2003).

A MM considera as moléculas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas, na qual os átomos são tratados como “esferas rígidas” unidos por forças harmônicas ou elásticas. A descrição dos movimentos destas moléculas é dada por um conjunto de parâmetros pré-determinados experimentalmente chamados de campo de força.

Os “Campos de Força” são potenciais de interação que descrevem o movimento das partículas. Essas forças são descritas em função dos comprimentos de ligação (r), ângulos de ligação (θ), ângulos de torção (ϕ), e interações entre átomos não ligados (d), a qual inclui as interações eletrostáticas e de Van der Waals (KUKOL, 2009), como mostrado na Figura 15.

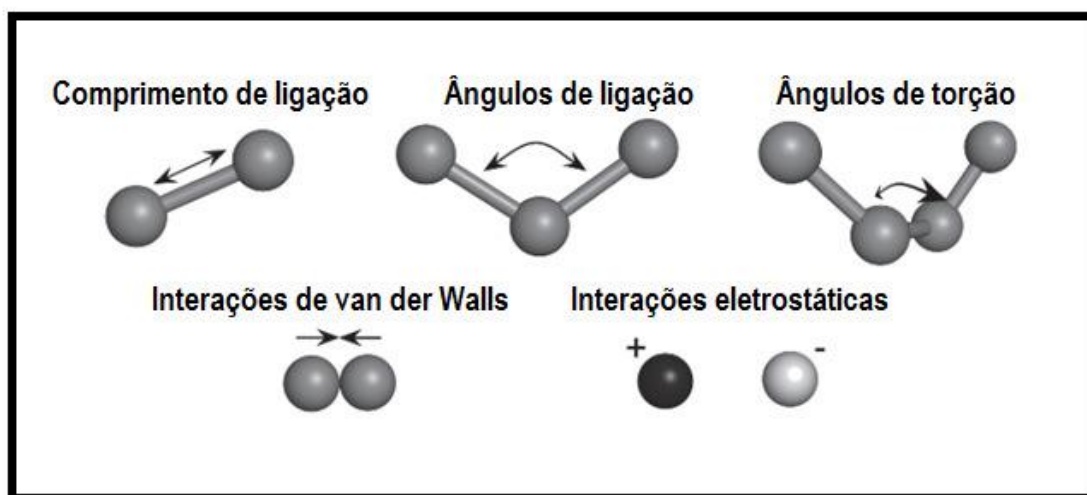


Figura 15: Potenciais vibracionais e tipos de interações de uma determinada molécula. Fonte: Kukol, 2009.

O conjunto destas funções é conhecido como campo de força empírico, e representa a somatória da energia potencial molecular de todas as forças atuantes no sistema. A energia espacial da molécula, U , é considerada como a diferença entre a energia real e a energia hipotética de uma determinada molécula. Representada pela expressão da Equação 1 (CLARK, 1985). A energia potencial total, ou energia estérica da molécula é representada na forma mais simples pela Equação de Westheimer (ANDREI, 2003; SANT'ANNA, 2002).

$$U = \sum U_{(r)} + \sum U_{(\theta)} + \sum U_{(\phi)} + \sum U_{(d)} \quad (1)$$

Onde, a energia potencial (U) do sistema é dada pela somatória das energias potenciais dos comprimentos de ligação (r), ângulos de ligação (θ), ângulos de torção (ϕ), e interações entre átomos não ligados (d).

Outras interações intramoleculares que afetam a energia, como as interações eletrostáticas ou ligações hidrogênio, também podem ser adicionadas ao campo de força, assim como as interações cruzadas, representadas pelos chamados termos cruzados, as quais consideram certo número de interações entre comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos de torção, interações carga-carga e interações dipolo-dipolo (CLARK, 1985).

Em sistemas biomoleculares, os campos de força mais utilizados são: CHARMM (BROOKS et al. 1983), GROMOS (GUNSTEREN et al. 1987), AMBER (WEINER et al. 1984), OPLS, (JORGENSEN & TIRADO-RIVES, 1988), entre outros. Atualmente, existem diversos códigos computacionais usando campo de força clássico. Cada um deles usa um campo de força apropriado para descrever diferentes propriedades moleculares, ajustadas a algum resultado experimental.

Algumas das vantagens da mecânica molecular são a rapidez e a economia de tempo de computação, ser aplicável a moléculas pequenas e grandes e até mesmo sistemas oligomoleculares, a facilidade de compreensão em relação aos métodos de mecânica quântica e a disponibilidade de vários algoritmos disponíveis nos softwares HyperChem, Quanta, Sybyl, Alchemy, BioMedCache, Pcmol, Spartan, Titan, Gaussian etc, podendo destacar-se o MMX, MM2, AMBER, MM3, SYBYL, MMFF94, UFF. Sendo cada um desses programas possuidor de um campo de força específico à geometria de uma molécula especificada em termos de suas coordenadas atômicas (FORESMAN; FRISCH, 1996).

Para calcular a energia e posterior otimização da geometria foram realizados cálculos de MM, base matemática que trata as moléculas como uma coleção de átomos unidos por forças harmônicas ou elásticas (forças newtonianas). Essas forças podem ser descritas como funções de energia potencial de características estruturais, como comprimento de ligação, ângulos

de ligação, interações não-ligantes e outras. Devido a isto, estes são conhecidos como cálculos de campo de força (SILVA, 2003).

4.2.2 MÉTODOS DE MECÂNICA QUÂNTICA (QM)

Os métodos quânticos (com base na teoria de orbital molecular), considerados como uma das maiores realizações intelectuais do século XX, estão baseados em um conjunto de leis chamado de mecânica quântica, que fornece uma descrição matemática da estrutura molecular em termos dos núcleos atômicos e da distribuição eletrônica em torno deles (HEHRE et al. 1986, FORESMAN; FRISCH, 1996). Os núcleos são considerados como partículas fixas e os elétrons como partículas com comportamento ondulatório, podendo obter a partir de cálculos de propriedades associadas à estrutura eletrônica de uma determinada molécula (HOUSE, 2004). Assim, no intuito de visualizar processos reativos ou calcular propriedades eletrônicas, é necessário tratar o sistema quanticamente.

A aproximação de BORN-OPPENHEIMER separa o movimento nuclear do movimento eletrônico, visto que a massa nuclear é muitas vezes maior que a massa dos elétrons. Isso é feito mantendo-se os núcleos fixos durante cada ciclo do movimento eletrônico. Desse modo os elétrons são tratados como se estivessem em movimento em um campo de núcleos estacionários, o que permite separar o problema de calcular a energia de um sistema molecular em dois problemas separados, um eletrônico e outro nuclear (BORN; OPPENHEIMER, 1927).

Os métodos que empregam o formalismo quântico apresentam custo computacional muito elevado, por esse motivo são limitados a sistemas moleculares não muito extensos (CRAMER, 2004).

Para descrever o estado de um sistema, em mecânica quântica, foi postulada a existência de uma função de coordenadas chamada função de onda molecular ou função de estado, Ψ , que é a solução da equação de Schrödinger, (Equação 2) (HEHRE et al. 1986, FORESMAN; FRISCH, 1996).

Essa função contém todas as informações sobre a molécula, e a partir dela podem ser calculadas todas as suas propriedades eletrônicas. Tal função de onda proporciona ou descreve a densidade eletrônica da região quântica submetidas às interações correspondentes ao entorno.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2)$$

Onde, o H é o hamiltoniano, uma expressão matemática dos termos energéticos da molécula englobando a energia cinética dos elétrons e potencial das partículas do sistema, e Ψ é uma função de onda molecular descrita em termos das coordenadas espaciais das partículas que constituem o sistema em um determinado estado (HEHRE et al. 1986, FORESMAN; FRISCH, 1996).

O primeiro passo para um estudo de modelagem em QM é resolver a equação de Schrödinger, para tal, é necessário que se leve em consideração que o interesse é descrever um sistema em estado estacionário, independente do tempo (LEVINE, 2001).

Vários métodos baseados na mecânica quântica surgiram para explicar o movimento dos elétrons, dentre eles estão os métodos *ab initio*, semi-empíricos, a Teoria do Funcional de Densidade (TFD)/“*Density Functional Theory*” (DFT) e os métodos comparativos.

O método *ab initio* é útil na determinação de estruturas complexas em termos das interações entre os núcleos e os elétrons e a geometria molecular em termos da energia mínima do arranjo dos núcleos. Entretanto, apesar de ser amplamente usado, é inviável a realização de cálculos precisos para moléculas contendo mais de 100 átomos. (COUTINHO; MORGON, 2007).

No método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT), desenvolvido por Kohn e colaboradores (1965), as propriedades de um sistema podem ser determinadas usando-se funcionais, ou seja, funções de outra função, as quais neste caso são dependentes da densidade eletrônica. Os custos computacionais do método DFT são relativamente baixos quando comparados a outros métodos quânticos tradicionais. Entretanto, existem dificuldades em

usar a teoria do funcional de densidade para descrever interações intermoleculares adequadamente, especialmente nas forças de dispersão de Van der Waals, excitações de transferência de cargas, estados de transição e energia potencial global de superfícies (BURKE et al. 2005).

Devido às dificuldades encontradas na aplicação de métodos *ab initio*, vários métodos semiempíricos foram desenvolvidos. Os métodos semiempíricos são mais rápidos e permitem aplicações rotineiras em sistemas moleculares médios e grandes. O alvo fundamental dos métodos semiempíricos é o desenvolvimento de um tratamento quantitativo de propriedades moleculares com precisão, confiabilidade e custo computacional satisfatório (SILVA, 2006).

Devido aos recentes progressos na área computacional e no desenvolvimento de eficientes algoritmos de cálculos, um grande avanço também foi verificado no desenvolvimento dos cálculos químico-quânticos (WEBER et al. 2006; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2007). Os métodos DFT e *ab initio* fornecem uma descrição mais acurada e detalhada dos efeitos eletrônicos quando comparada aos métodos empíricos (ARROIO et al. 2010).

4.2.3 MÉTODOS HÍBRIDOS DE MECÂNICA QUÂNTICA E MECÂNICA MOLECULAR (QM/MM)

O desenvolvimento tecnológico possibilitou construção de computadores com maior capacidade de armazenamento de dados e processamento, permitindo a análise de cálculos teóricos em sistemas químicos maiores. Porém, quando as propriedades de interesse dependem de técnicas que permitam analisar correlações eletrônicas, o custo e o tempo computacional podem tornar o processo inviável. A melhor alternativa para contornar essas limitações é a utilização de métodos híbridos (SVENSSON et al. 1996; DAPPRICH, 1999).

Uma das estratégias da química computacional para análise de macromoléculas baseia-se no emprego do método híbrido. O método híbrido é

uma ferramenta computacional que utiliza a combinação de duas ou mais técnicas computacionais em uma simulação para investigar processos químicos de sistemas grandes, como proteínas. Este método representa uma nova estratégia de cálculos, em decorrência do entrelaçamento entre métodos de Química Quântica (estrutura eletrônica) e Mecânica/Dinâmica Molecular, conhecida por: “*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*” - QM/MM (DAPPRICH et al. 1999; VREVEN, 2006).

A ideia de combinar os métodos de mecânica quântica e mecânica molecular em potenciais de um potencial híbrido QM/M foi realizada pela primeira vez por Warshel e Levitt (1976), no seu trabalho sobre o mecanismo catalítico da lisozima (WARSHEL; LEVITT, 1976).

O início dos métodos híbridos é estudar a molécula “real” aplicando-se o cálculo de maior nível possível para o sistema modelo (parte ativa), enquanto cálculos menos sofisticados são aplicados no restante da molécula (MASERAS, 1995; WOO, 1998; ATAUALPA, 2006; VREVEN, 2006). De acordo com esses métodos, a parte do sistema molecular com maior interesse é tratada com mecânica quântica, enquanto o sistema restante é tratado por mecânica molecular.

Em uma abordagem QM/MM somente os resíduos de aminoácidos (ou parte deles) da proteína que estão diretamente envolvidos na reação enzimática e o(s) substrato(s) são descritos e calculados com uma função potencial QM, e os átomos remanescentes no sistema são descritos e tratados com um potencial clássico MM. Este método evita uma grande deficiência dos cálculos realizados somente com mecânica clássica (MM), em que as ligações químicas não podem ser feitas ou quebradas durante a simulação (ANDRÉS; BELTRÁN, 2000).

Esta metodologia mescla métodos clássicos com métodos quânticos para obter melhores resultados em menor tempo computacional. Neste sentido, para realizar um estudo QM/MM, inicialmente, deve-se dividir o sistema estudado em quatro regiões (Figura 16).

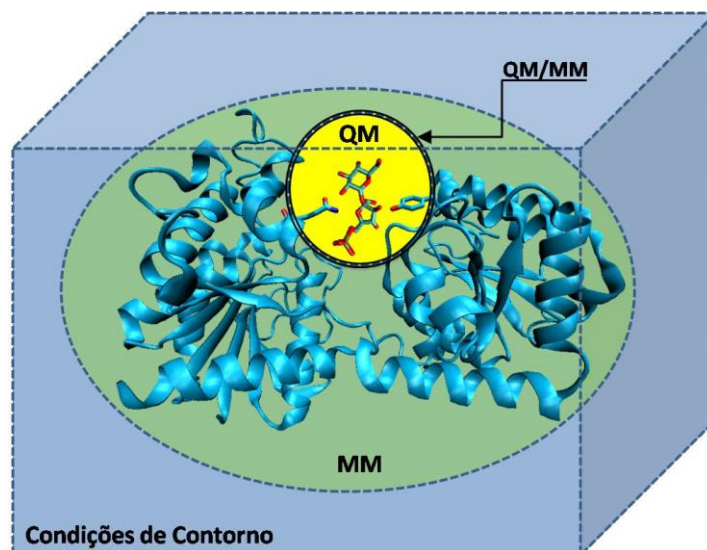


Figura 16: Representação esquemática da divisão de um sistema na região QM, região MM e região de contorno.

A primeira é a região de Mecânica Quântica (QM), onde são incluídos todos os átomos envolvidos diretamente na reação química, como o ligante e os resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio de ligação da proteína. Nessa região são feitos cálculos através de métodos quânticos. Os átomos dessa região são representados como elétrons e núcleos, e as superfícies de potencial associadas a eles são determinadas pela aproximação de Born-Oppenheimer (BORN, OPPENHEIMER, 1927).

A segunda é a região de Mecânica Molecular (MM), nela são inclusos os outros átomos pertencentes ao sistema, que são os resíduos de aminoácidos da enzima, descritos classicamente, e suas interações são determinadas mediante as funções de energia potencial empírica, de modo que esses átomos não podem estar envolvidos no processo de formações ou rupturas de ligações. Nos cálculos são utilizados os campos de força da mecânica molecular clássica (WARSHEL; LEVITT, 1976). Um bom campo de força pode descrever muito bem as interações intra-proteína, porém, não é eficiente para estudos onde envolvem transferências de elétrons.

A terceira é a de QM/MM, ocorre exatamente, quando os átomos da região MM interagem com os átomos da região QM, envolvidos na reação, de

modo que os movimentos e as interações, entre eles, influenciam seus cálculos.

A quarta região é a região de contorno, localizada ao redor do sistema que corresponde a um conjunto de restrições a serem aplicadas ao sistema. Essa região tem a finalidade de restringir a simulação para que ele não expanda a um sistema infinito. Normalmente, são utilizadas caixas cúbicas cheias de moléculas de água, na intenção de simular o meio enzimático (WARSHEL; LEVITT, 1976).

O Hamiltoniano híbrido QM/MM para o sistema total \hat{H}_{ef} pode ser apresentado pela soma das quatro regiões, conforme a expressão de Equação 3.

$$\hat{H}_{ef} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM/MM} + \hat{H}_{cc} \quad (3)$$

No qual o \hat{H}_{QM} corresponde ao Hamiltoniano da região quântica, cuja expressão é equivalente ao subsistema em condições de vácuo. Este descreve as interações entre os elétrons e os núcleos dos átomos QM, tratando-se de um Hamiltoniano eletrônico não relativista. O \hat{H}_{MM} corresponde às interações entre as moléculas que formam o entorno. O $\hat{H}_{QM/MM}$ descreve as interações dos átomos da região QM com os átomos da região MM e se decompõe em três termos, cada um deles com seu hamiltoniano correspondente: eletrostático, Van der Waals e de polarização (Equação 4). O \hat{H}_{cc} corresponde ao Hamiltoniano das condições de contorno.

$$\hat{H}_{QM/MM} = \hat{H}_{QM/MM}^{Elec} + \hat{H}_{QM/MM}^{VdW} + \hat{H}_{QM/MM}^{Pol} \quad (4)$$

O termo de polarização, $H_{QM/MM}^{\wedge Pol}$, estabelece um acoplamento entre a função de onda do sistema QM e as cargas do entorno.

Nos casos em que não se pode desprezar o efeito polarizante provocado pelas moléculas do entorno, que estão próximas às moléculas dos reagentes, deve-se tratar quanticamente essas moléculas incluindo-as no subsistema quântico. Os resíduos próximos ao entorno atuam ativamente na reação impossibilitando uma partição nítida dos distintos subsistemas QM e MM, por isso deve-se recorrer a algum tipo de aproximação que permita satisfazer as valências dos átomos quânticos que definem a ligação entre a região quântica e a região clássica, que é a ligação de fronteira (LUQUE et al. 2000).

Um método bastante empregado para resolução desse tipo de problema baseia-se nos métodos que empregam átomos adicionais de união (“*link atom*”) (FIELD et al. 1990). Neste método, a valência dos átomos quânticos afetados pela partição dos subsistemas, é completada empregando átomos de união (“*link atom*”) que serão incluídos no subsistema quântico. As características que os átomos de união devem apresentar não estão completamente esclarecidas, entretanto, no que diz respeito ao tipo de átomo, o substituto deverá reproduzir as propriedades eletrônicas e espaciais do grupo que substitui. O mais comum é o emprego do átomo de hidrogênio como substituto (SILVA; LAMEIRA; ALVES, 2011).

As condições de contorno introduzidas nos cálculos têm por finalidade tentar descrever o sistema imerso num solvente e compensar a ruptura do mesmo, e para as interações mais distantes, como eletrostáticas que decrescem com a distância, sejam representadas adequadamente (LAMEIRA et al. 2008).

4.2.4 ESTRUTURA INICIAL E PREPARAÇÃO DO SISTEMA CEFOXITINA-PBP5 PARA SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

A estrutura cristalográfica resolvida disponível para a PBP5 complexada com a cefoxitina foi obtida pelo método de difração de raios-X e está disponível no Banco de Dados de Proteínas/“*Protein Data Bank*” (www.rcsb.org) sob o código 3MZE com resolução de 2,10 Å (Figura 17).

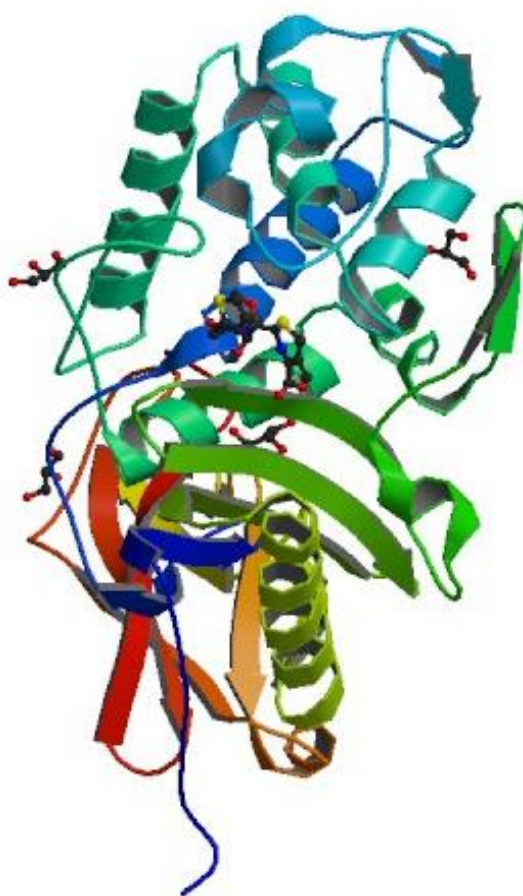


Figura 17: Estrutura cristalográfica da cefoxitina complexada com a PBP5 de *E. coli*. Código PDB: 3MZE. Fonte: PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3mze>).

O estado de protonação da PBP5 foi analisado utilizando o servidor PROPKA (LI; ROBERTSON; JESEN, 2005), o qual realiza cálculos de valores de pKa para resíduos de aminoácidos.

Os átomos de hidrogênio foram adicionados ao ligante através do programa Molden 4.8 (SCHAFTENAAR, 1993). Para preparar o sistema para a simulação de DM, o primeiro passo foi adicionar hidrogênios à estrutura, os quais foram adicionados na proteína de acordo com cálculos eletrostáticos de pKa (GILSON, 1993; ANTOSIEWICZ et al. 1994), como implementado por (FIELD et al. 1990). Os átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína utilizando o programa Dynamo (FIELD et al. 2000). O segundo passo foi relaxar a proteína utilizando sucessivos passos de otimização.

A habilidade de incorporar moléculas de solvente nas simulações de sistemas receptor-ligante é muito importante para o entendimento do papel da água e seus efeitos sobre a estabilidade de complexos proteína-inibidor/ligante (ALONSO et al. 2006). Neste contexto, colocou-se o sistema dentro de uma caixa cúbica, com dimensão de 80 Å, com moléculas de águas pré-otimizadas do tipo TIP3, previamente relaxadas, tendo como centro de massa o ligante (Figura 18). As moléculas de água situadas em um raio de 2,8 Å de distância de um átomo pesado da proteína foram excluídas para evitar choque entre os átomos (ALLNÉR, et al. 2012). Em seguida, as moléculas de água restante na estrutura final foram relaxadas para minimização da energia. Para reduzir o tempo de cálculo todos os resíduos que estavam a uma distância maior que 20 Å do centro de massa foram congelados.

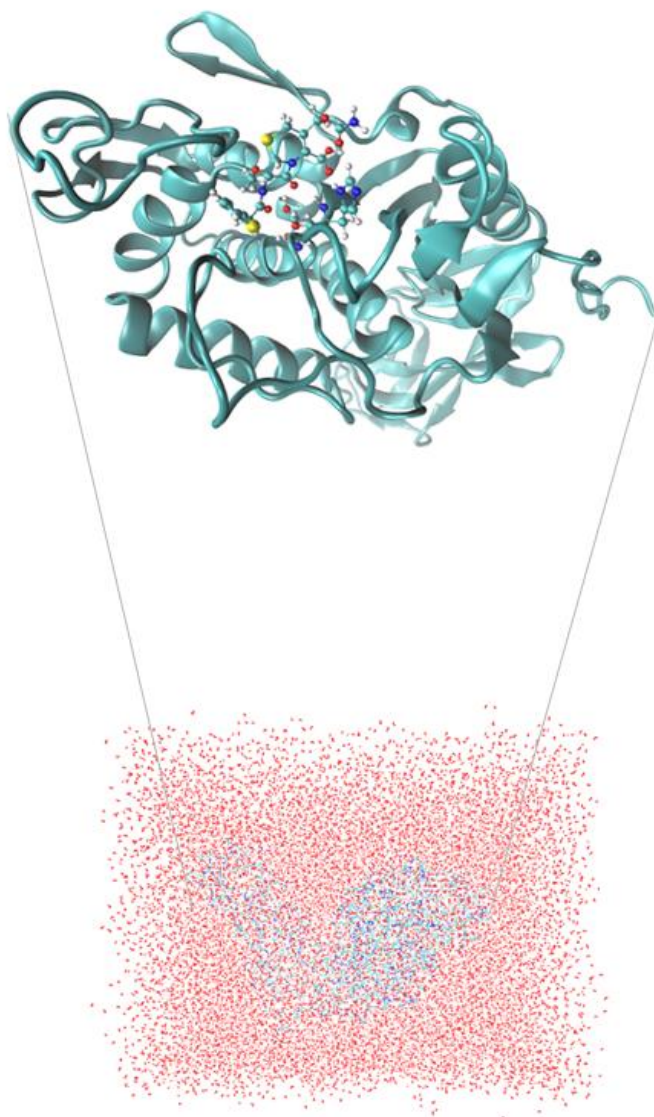


Figura 18: Visão global do complexo cefoxitina-PBP5 e o sistema molecular completo solvatado em uma caixa cúbica de 80 Å de lado (parte inferior).

4.2.5 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR (DM) UTILIZANDO O MÉTODO HÍBRIDO QM/MM

Um método eficiente para otimizar geometria são os cálculos de dinâmica molecular (DM). Eles simulam o movimento baseado em cálculos de energia potencial, utilizando o campo de força e as equações de Newton para

movimentos, considerando cada átomo uma partícula, assim como na mecânica molecular. O método consiste em simular a colocação da molécula em um banho com temperatura e viscosidade definidas. É dado um intervalo de tempo em que ocorre a transferência de calor entre o banho e a molécula e outro intervalo de tempo em que a molécula equilibra a sua energia. O processo é repetido até a obtenção de uma conformação de menor energia, que é a de maior estabilidade (SILVA, 2003).

A estabilidade do complexo cefoxitina-PBP5 foi avaliada utilizando o programa Dynamo (FIELD et al. 2000), através de simulações de DM empregando o método híbrido de QM/MM. Este método foi escolhido para avaliar o comportamento do sistema, pois combina a precisão dos métodos QM com o baixo custo computacional dos métodos MM. Nessa simulação foram avaliadas, detalhadamente, as interações do complexo proteína-ligante a fim de elucidar o potencial de inibição da cefoxitina para a PBP5. Os cálculos de DM foram simulados por 3,0 ns em um banho de 300 K, cuja transferência de calor ocorre durante 10 ps (picosegundos), até adquirir estabilidade, usou-se um intervalo de tempo de 1,0 fs para resolver a equação de movimento.

A parte do sistema onde ocorre a interação do fármaco com o sítio de ligação foi tratada quanticamente por meio de métodos quânticos como semiempírico ou DFT, e o restante da enzima juntamente com as moléculas de água do solvente foram tratados mediante um campo de força MM. Para isso, inicialmente, foram delimitadas as regiões QM e MM. A região QM abrangeu a cefoxitina e os resíduos de serina (Ser44), de histidina (His216) e de arginina (Arg248), do sítio ativo da PBP5; e a região MM incluiu todo o resto do sistema (proteína e moléculas de água de cristalização e solvatação). Essa divisão teve como base os dados experimentais obtidos pelo PDBsum (Figura 19) que mostram as principais interações da cefoxitina com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da PBP5. Esse fármaco liga-se de forma irreversível ao resíduo de Ser44 através de uma ligação covalente, também interage diretamente com os resíduos His216 e Arg248.

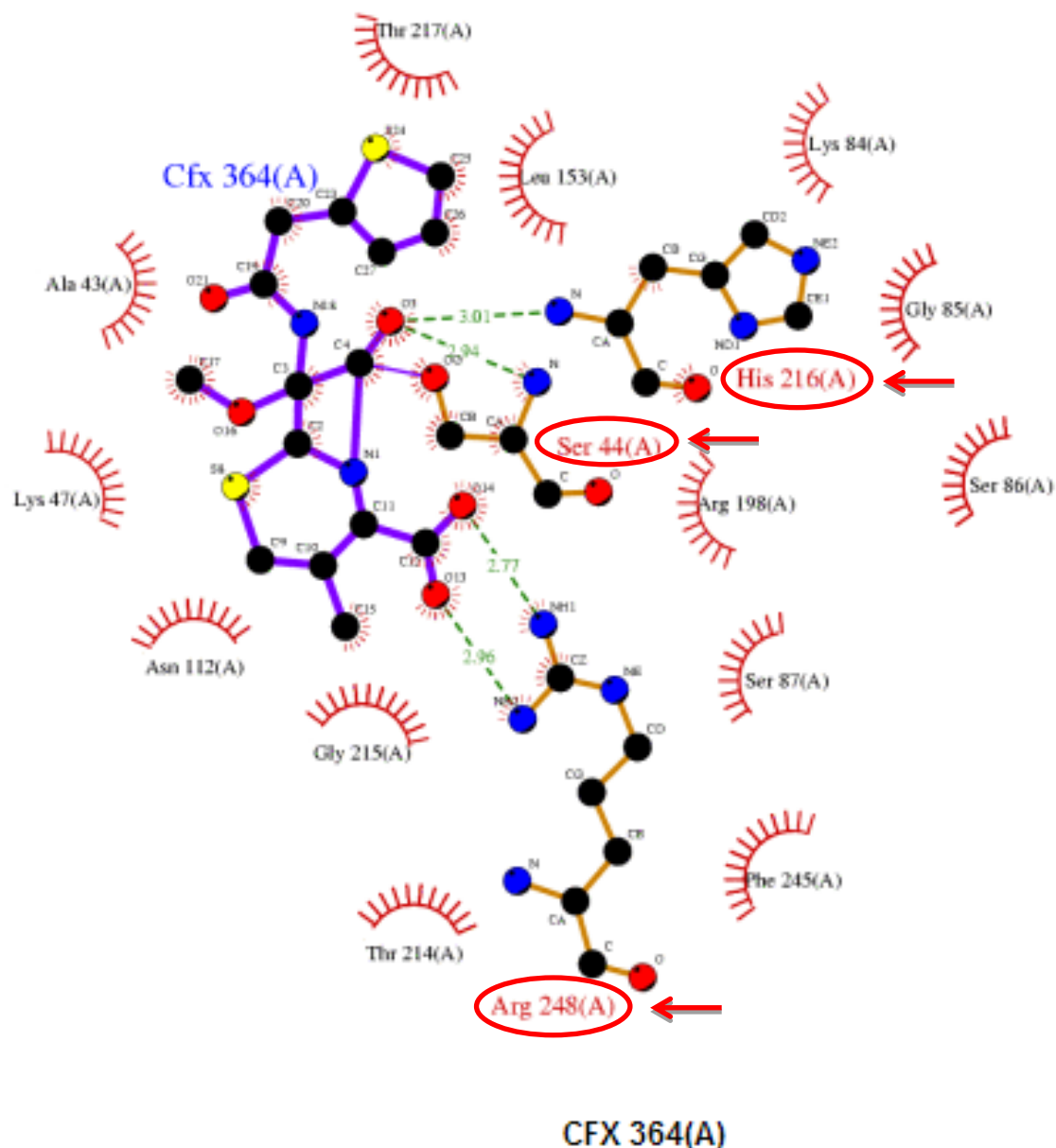


Figura 19: Principais interações da cefoxitina com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da PBP5. Fonte: PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgibin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=3mze&template=ligands.html&l=1.1>).

A simulação de DM do sistema, usando o método híbrido QM/MM, foi realizada utilizando o algoritmo de Langevin-Verlet (VERLET, 1967), a 300 K. Essa simulação foi realizada observando as trajetórias a cada 500 ps. O sistema final foi equilibrado com DM de 3,0 ns. Todos os cálculos de DM foram realizados no programa Dynamo (FIELD et al. 2000).

Os ligantes e os principais resíduos do sítio ativo foram descritos pelo método semiempírico AM1 (DEWAR et al. 1985), estando portanto, dentro da região QM. Enquanto, o restante da proteína e as moléculas TIP3 foram tratadas mediante o campo de força OPLS-AA/TIP3 (JORGENSEN; TIRADORIVES, 1988).

O sistema estudado apresenta um total de 63560 átomos, com apenas 71 átomos na região QM, e contém 351 resíduos de aminoácidos.

A Figura 20 ilustra o sistema real de partida para realização da dinâmica molecular com o complexo cefoxitina-PBP5. A caixa cúbica de água foi cortada, bem como todos os resíduos que estavam a 40 Å do ligante, resultando num sistema esférico que abrange todas as interações que o ligante pode fazer com os resíduos do sítio ativo da proteína. A simulação de DM foi realizada utilizando o programa Dynamo (FIELD et al. 2000).

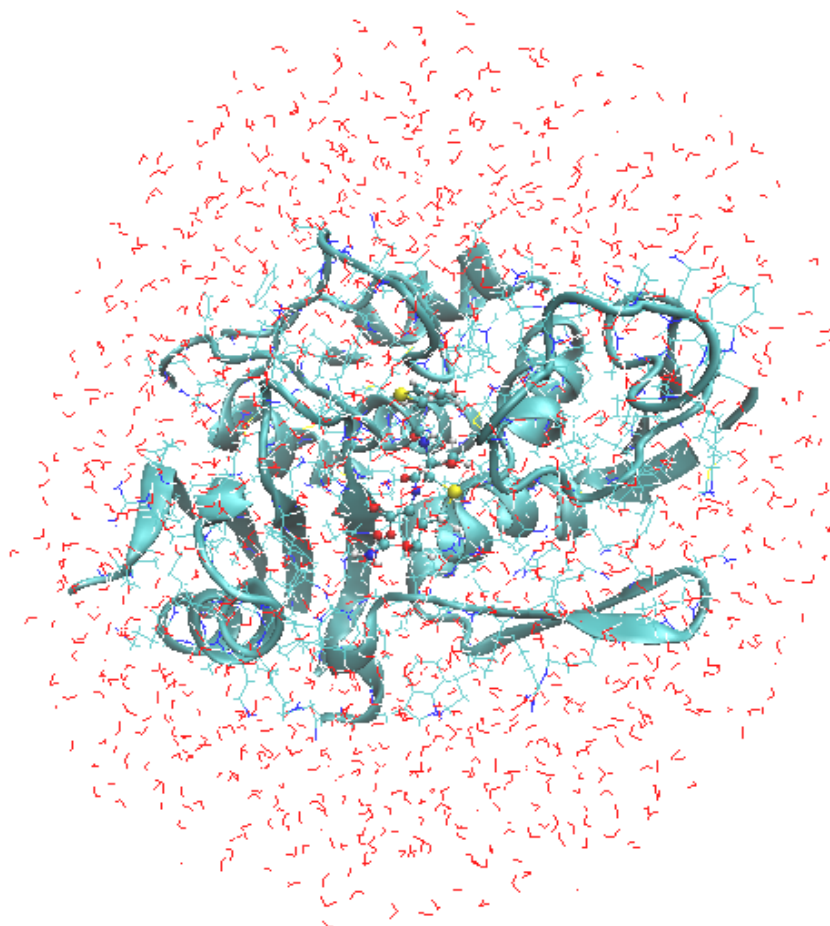


Figura 20: Sistema de partida para realização das Simulações de Dinâmica Molecular.

A estabilidade do sistema na simulação foi avaliada através do gráfico de RMSD (Desvio Quadrático Médio/*Root Mean Square Deviation*), no qual a distância média entre os átomos responsáveis pelas interações na região catalítica mantiveram-se constante.

4.3 Energia de Interação por Resíduo

A energia de interação por resíduo é definida a partir do hamiltoniano híbrido, e pode ser descrita de modo semelhante ao hamiltoniano do estudo de QM/MM (WARSHEL; LEVITT, 1976), sendo a somatória das energias de QM do subsistema no vácuo, de interação QM/MM e MM, dado pela Equação 5:

$$E = E_{QM} + E_{QM/MM} + E_{MM} \quad (5)$$

A energia de interação entre o inibidor e o ambiente, para cada resíduo, é calculada como a diferença entre a energia QM/MM e as energias dos subsistemas QM e MM separadas, com a mesma geometria.

Esse tipo de interação foi abordado neste estudo para verificar quais resíduos interagem de forma significativa no sítio ativo da enzima. Os cálculos de energia de interação por resíduo foram realizados após 3,0 ns de simulação de dinâmica molecular. A energia de interação entre o ligante e o ambiente foi calculada utilizando os últimos 500 ps de simulação de DM e QM/MM, usando o hamiltoniano AM1 e o funcional B3LYP (BECKE, 1988; LEE; YANG; PARR, 1988), com um conjunto de base 6-31G*.

4.4 Potencial Eletrostático Molecular Tridimensional (MEP-3D)

O potencial eletrostático de um determinado sistema está diretamente associado à distribuição de carga do sistema (DAVIS; MCCAMMON, 1990). De acordo com a descrição clássica, um potencial eletrostático (ϕ) se relaciona com a densidade de carga (ρ) na posição (r) de um determinado soluto, representado pela equação de Poisson (Equação 6)

$$\frac{d^2(r\phi)}{dr^2} = r \frac{\rho}{\epsilon} \quad (6)$$

sendo ϵ a constante dielétrica do meio.

O potencial eletrostático de um ponto (x,y,z) é dado em termos da energia do potencial eletrostático entre uma carga imaginária (+1) e a molécula. Se esta carga é atraída pela molécula o potencial é negativo, se a carga é repelida pela molécula, o potencial é positivo, dessa forma, regiões ricas em elétrons são negativas, enquanto regiões pobres em elétrons são positivas (SCROCCO et al. 1973).

O MEP tridimensional foi gerado através dos cálculos B3LYP/6-31G* utilizando o programa Gaussian 03 (FRISCH et al. 2003) e visualizado no programa Molekel 5.4 (VARETTO, 2009).

4.5 Cálculos de Energia de Interação Global

Para obter a energia de interação entre o ligante e o sistema enzimático solvatado, utilizaram-se os métodos AM1/MM e B3LYP/MM nos cálculos de energia de interação, para descrever a afinidade proteína-ligante.

4.6 Métodos Estatísticos

Os resultados foram analisados pelo Teste do Qui-quadrado LXC, com Tabela de Contingência 2X2, utilizando o programa BioEstat 5.0 de Ayres et al. (2007), segundo os objetivos propostos no trabalho, considerando como estatisticamente significativo $p \leq 0,05$, e admitindo a correção de Yates.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana aos antibióticos

A Tabela 3 apresenta os valores do tamanho dos halos de inibição da cepa de *E. coli* ATCC 8739, da cepa de *E. coli*, proveniente de isolado clínico de paciente do LACEN/PA, com e sem a adição de 10 µL de solução de EDTA a 0,1 M nos discos, frente aos 5 antimicrobianos testados. As placas que ilustram esses halos estão na Figura 21.

Tabela 3: Leitura dos halos de inibição dos antimicrobianos utilizados no teste de suscetibilidade, pelo método de disco-difusão, da cepa de *E. coli* ATCC 8739 (sem EDTA); do isolado clínico de *E. coli* (com EDTA); e do isolado clínico de *E. coli* (sem EDTA).

Antimicrobiano	Tamanho do halo de inibição (mm)														
	Cepa de <i>E. coli</i> ATCC 8739				Isolado clínico de <i>E. coli</i> (com EDTA)			Isolado clínico de <i>E. coli</i> (sem EDTA)							
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	média	D. P.	Placa 1	Placa 2	Placa 3	média	D. P.	Placa 1	Placa 2	Placa 3	média	D. P.
Cefoxitina 30 µg	24,00	25,00	24,00	24,33	0,58	26,00	24,00	25,00	25,00	1,00	26,00	26,00	27,00	26,33	0,58
Cefepime 30 µg	34,00	34,00	34,00	34,00	0,00	15,00	14,00	14,00	14,33	0,58	15,00	15,00	15,00	15,00	0,00
Ceftazidima 30 µg	30,00	30,00	30,00	30,00	0,00	17,00	15,00	15,00	15,67	1,15	17,00	17,00	17,00	17,00	0,00
Ciprofloxacina 5 µg	33,00	33,00	33,00	33,00	0,00	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00
Gentamicina 10 µg	22,00	21,00	25,00	22,67	2,08	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00	8,00	10,00	9,00	9,00	1,00

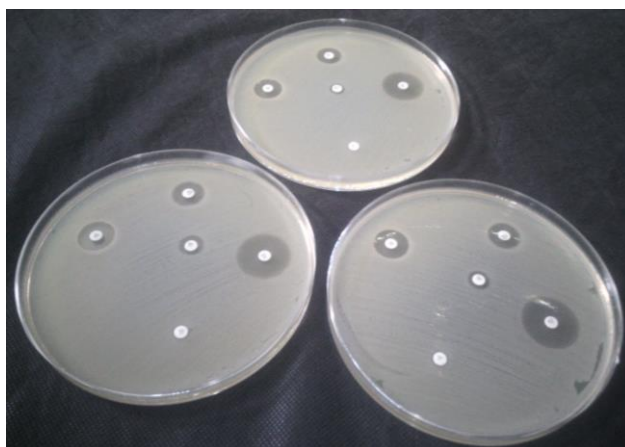
D.P. – Desvio Padrão



A



B



C

Figura 21: Placas de Ágar Müller-Hinton com formação dos halos de inibição após 24 horas de incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ frente à cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739, discos de antibiograma não impregnados com EDTA (A); à cepa de *Escherichia coli* oriunda de isolado clínico, discos de antibiograma impregnados com EDTA (B); e à cepa de *Escherichia coli* oriunda de isolado clínico, discos de antibiograma não impregnados com EDTA (C).

O perfil de suscetibilidade das cepas de *E. coli*, ATCC 8739 e isolado clínico com e sem EDTA, frente aos 5 antimicrobianos testados está representado na Tabela 4.

Tabela 4: Suscetibilidade das cepas de *E. coli*, ATCC 8739 e isolado clínico com e sem EDTA, frente a 5 antimicrobianos.

Antimicrobiano	<i>Escherichia coli</i>		
	ATCC 8739	IC com EDTA (URINA)	IC sem EDTA (URINA)
Cefoxitina 30 µg	S	S	S
Cefepime 30 µg	S	I	I
Ceftazidima 30 µg	S	I	I
Ciprofloxacina 5 µg	S	R	R
Gentamicina 10 µg	S	R	R

R – Resistente; S – Sensível; I – Sensibilidade Intermediária.
IC – Isolado Clínico.

Os resultados do antibiograma revelam que a cepa de *E. coli* ATCC 8739 foi sensível aos 5 antimicrobianos estudados, já a cepa de *E. coli* proveniente do isolado clínico apresentaram resistência à ciprofloxacina 5 µg e à gentamicina 10 µg, sensibilidade intermediária à cefepime 30 µg e à ceftazidima 30 µg, e sensibilidade à cefoxitina 30 µg. Essa diferença na suscetibilidade entre a cepa ATCC 8739 e a cepa proveniente de isolado clínico pode estar relacionada ao fato da cepa isolada de paciente já ter entrado em contato com esses antibióticos anteriormente, evidenciando uma memória imunológica molecular da bactéria.

A diferença entre o tamanho dos halos de inibição da cepa de *E. coli* proveniente de isolado clínico, testada com e sem EDTA, frente aos antimicrobianos analisados não foi igual ou superior a 5 mm, indicando que não houve diferença de suscetibilidade antimicrobiana com relação à presença ou à

ausência de EDTA nos discos contendo os antimicrobianos, o que sugere ausência de produção de metalo- β -lactamases na cepa de *E. coli* analisada, oriunda de isolado clínico.

As metalo- β -lactamases representam séria ameaça devido à sua capacidade de hidrolisar todos os antimicrobianos β -lactâmicos, com exceção do monobactâmico aztreonam, e não ser inibida pelos inibidores de serina- β -lactamases disponíveis para o uso clínico. Além disso, os genes que codificam essas enzimas também codificam resistência para outras classes de antimicrobianos, reduzindo ainda mais as opções terapêuticas. Em adição, estes genes estão localizados em elementos genéticos móveis, o facilita grandemente a sua disseminação (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

Com o aumento do número de relatos de cepas produtoras de metalo- β -lactamases em diferentes regiões geográficas e a expansão da disseminação desses genes de resistência para ampla variedade de microrganismos, a detecção das metalo- β -lactamases torna-se importante para que medidas de controle de infecção hospitalar possam ser implementadas com o intuito de prevenir a disseminação desse tipo de resistência e para a orientação da terapia antimicrobiana. A inexistência de terapia antimicrobiana adequada, a ausência de inibidor metalo- β -lactamases efetivo clinicamente e as poucas perspectivas de novos antimicrobianos ressaltam ainda mais a importância da detecção destas β -lactamases (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

Entre as enterobactérias, *E. coli* é a espécie mais frequentemente encontrada tanto nas infecções adquiridas na comunidade como nas hospitalares. Cerca de 40-50% das *E. coli*, particularmente aqueles isolados de infecções do trato urinário produzem penicilinases (HENQUELL et al. 1995).

Várias β -lactamases de origem plasmidial são produzidas por patógenos Gram negativos, porém a enzima mais comum é a TEM-1. A β -lactamase TEM-1 tem sido considerada uma enzima totalmente eficiente (BUSH et al. 1995). Hidrolisa a penicilina e os derivados de penicilina, tais como ampicilina, carbenicilina e piperacilina. É também bastante ativa contra a cefalotina e a cefuroxima, porém apresenta atividade insignificante contra cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona ou aztreonam, e não possui nenhuma ação contra as cefamicinas (cefexitina ou cefotetan). (LEUNG et al. 1997).

As enzimas ESBL foram observadas inicialmente em bacilos Gram-negativos isolados em pacientes da Europa e foram logo em seguida encontrados nos Estados Unidos (QUINN et al. 1989). Atualmente, essas enzimas são descritas em nível mundial (PHILIPPON et al. 1994). Este tipo de resistência é comum, principalmente em *K. pneumoniae* e, em menor grau, em *E. coli*. Porém, as ESBLs também são encontradas em *Citrobacter diversus*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *S. marcescens* e *Salmonella* spp. (JACOBY, 2000).

A incidência crescente da produção de β -lactamases por patógenos presentes na comunidade como em hospitais, tem exercido um impacto considerável na maneira de prescrever os antimicrobianos. No tratamento de infecções comuns adquiridas pela comunidade tais como infecções do trato urinário, otite média ou broncopneumonia, o uso de penicilinas tem diminuído, aumentando assim, o uso de associações de penicilinas ou cefalosporinas de segunda e terceira geração com algum inibidor de β -lactamase (NICOLAS-CHANOINE, 1996).

5.2 Cálculo de pKa para a PBP5

As coordenadas iniciais foram tomadas a partir da estrutura cristalográfica obtida por difração de raio-X (PDB código 3MZE com resolução de 2,10 Å). Os átomos de hidrogênio da proteína foram adicionados de acordo com os cálculos teóricos de pKa realizados pelo programa PROPKA (LI; ROBERTSON; JESEN, 2005). Com base no cálculo do pKa para cada resíduo de aminoácido da PBP5, foram desprotonados os seguintes resíduos de histidina (His146, His151, His216 e His320), pois eles apresentaram valores de pKa abaixo dos valores de referência. Desses resíduos, o de maior importância é a His216, pois ele está no sítio ativo da PBP5.

Nas proteínas, a cadeia lateral da histidina pode estar protonada ou desprotonada, já que ela é um aminoácido que apresenta grupos funcionais ionizáveis. Os efeitos de solvatação dentro da proteína podem causar

variações nos valores de pKa dos grupos ionizáveis. O servidor PROPKA faz a predição dos valores de pKa, baseando-se na localização espacial e entorno químico dos grupos ionizáveis (SARMIENTO, 2011).

5.3 Dinâmica Molecular

As simulações de DM são ferramentas úteis para avaliar a estabilidade de complexos proteína-ligante (FAN; MARK, 2004; ALENCAR et al. 2012). Após 3,0 ns de DM os resíduos do sítio ativo da proteína mostraram uma orientação conservada (Figura 22). Esta observação é confirmada pela estabilidade do complexo que mostrou um baixo desvio com valor de RMSD de 0,65 Å.

Durante os 3,0 ns de simulação através de dinâmica molecular observou-se que não ocorreu nenhuma modificação conformacional considerável na estrutura do ligante.

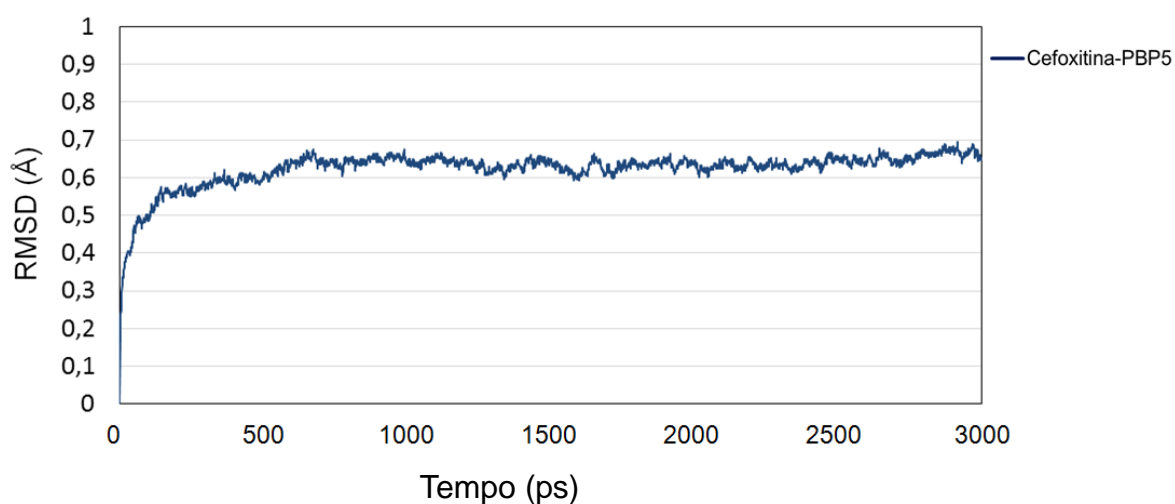


Figura 22: Trajetória da simulação de DM após 3,0 ns entre o tempo (ns) e a distância em Å.

A flutuação do desvio (RMSD) descreve uma trajetória que alcançou um platô em torno de 0,6 ns (600 ps) de simulação de DM (Figura 22). Esta estabilidade estrutural é indicativa que o ligante mantém-se no sítio ativo com fortes interações, o que está de acordo com os dados experimentais.

5.4 Cálculo da Energia de Interação por Resíduo

A fim de verificar a contribuição individual de cada resíduo de aminoácido da PBP5 na interação com o ligante, a trajetória do complexo cefoxitina-PBP5 derivada dos últimos 500 ps de DM foram submetidas à análise de decomposição por resíduo utilizando o método AM1/MM e o método DFT. Os resultados estão ilustrados na Figura 23 e na Figura 24, respectivamente. Nestas figuras os valores negativos correspondem a valores de estabilização, enquanto os valores positivos representam repulsões.

O estudo das interações dos principais resíduos do sítio catalítico com o ligante pelo método AM1/MM mostrou que embora a cefoxitina apresente interações desfavoráveis com os resíduos Lis243, Asp38 e Thr214, observou-se interações atrativas consideráveis com os resíduos Lis44, Glu246, Gli212, Lis210 e Ser41, e a água (W), provavelmente, essas interações são determinantes na estabilização do ligante no sítio ativo da proteína (Figura 23).

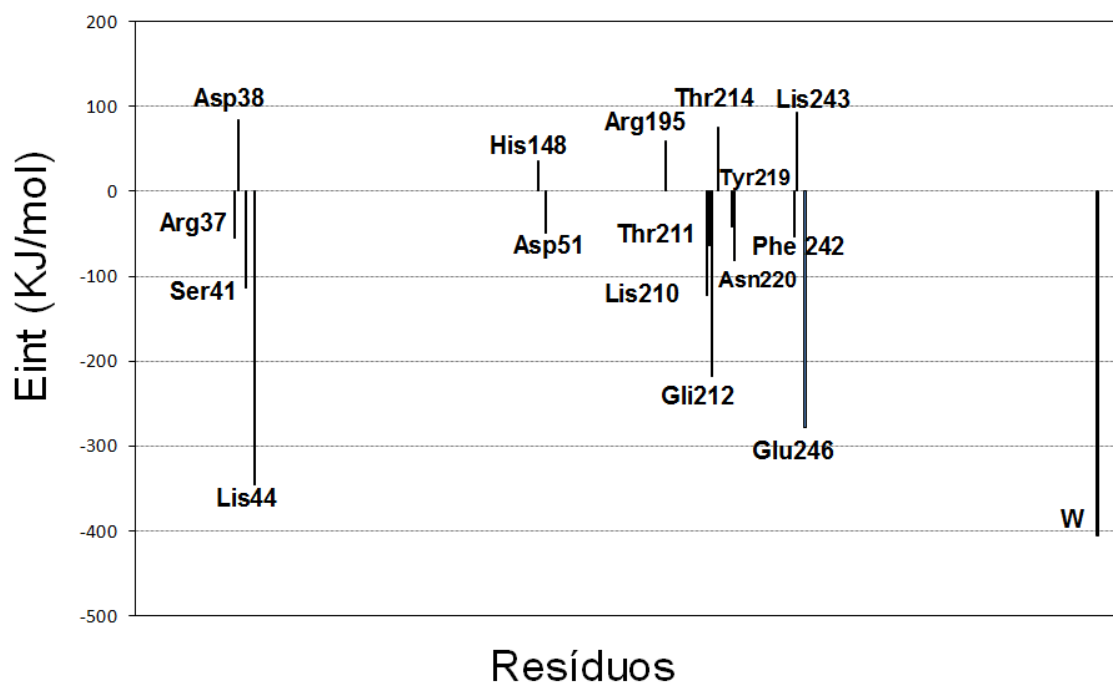


Figura 23: Energia de interação do ligante com os principais resíduos catalíticos, pelo método AM1/MM.

O estudo das interações dos principais resíduos do sítio catalítico com o ligante pelo método DFT mostrou fortes interações atrativas com os resíduos Lis44, Lis210, His213, Gli212 e Ser41, e a água (W), provavelmente, essas interações promovem a estabilização do ligante no sítio ativo da proteína (Figura 24).

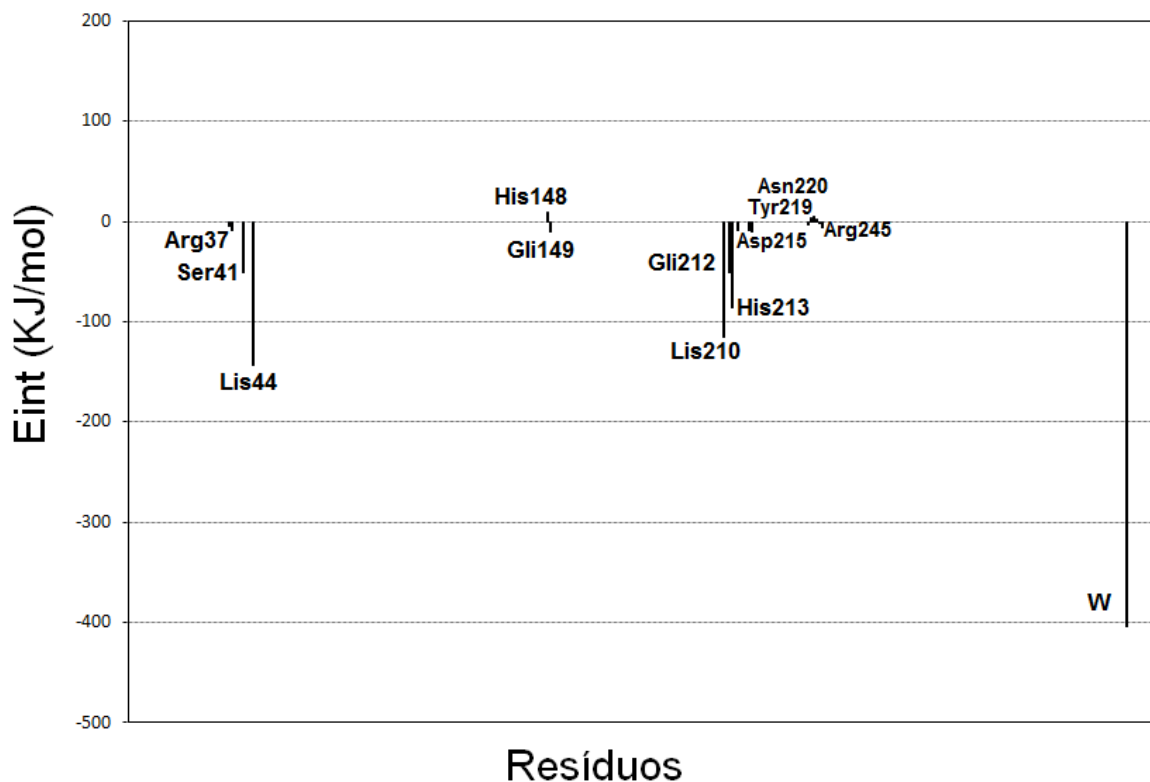


Figura 24: Energia de interação do ligante com os principais resíduos catalíticos, pelo método DFT.

Esses resultados, que demonstraram a contribuição individual dos resíduos de aminoácidos para a ligação com a cefoxitina, confirmam que o resíduo de Ser41 é um resíduo vital para o mecanismo de inibição da proteína PBP5. E ressaltam a importância dos resíduos Lis44 e Lis210 para a estabilização desse resíduo. Esses resultados estão de acordo com os dados experimentais.

Desta forma, os resultados teóricos demonstram que estas interações são significativas para a atividade enzimática, o que poderá ser usado como referência para o desenho de novos fármacos.

Nesses resultados pode-se observar, também, pequena divergência entre as interações realizadas pelo método AM1 e pelo método DFT. Isso é devido ao método AM1, ao contrário do método DFT, descrever as interações sem descrever bem as cargas do sistema. Portanto, a maior discrepância ter sido entre os resíduos Glu e Gli, que são resíduos carregados.

5.5 Potencial Eletrostático Molecular Tridimensional

Na Figura 25A a cefoxitina está representada no modelo de bolas e varetas. E a Figura 25B mostra o mapa do potencial eletrostático (MEP) para esse antimicrobiano. O MEP foi gerado usando o programa Molekel 5.4 (VARETTO, 2009). Esta superfície corresponde a um valor de isodensidade igual a 0,002 a.u. (unidade atômica). As regiões mais nucleofílicas (potencial eletrostático negativo) são mostradas em vermelho, e as regiões mais eletrofílicas (potencial eletrostático positivo) são mostradas em azul.

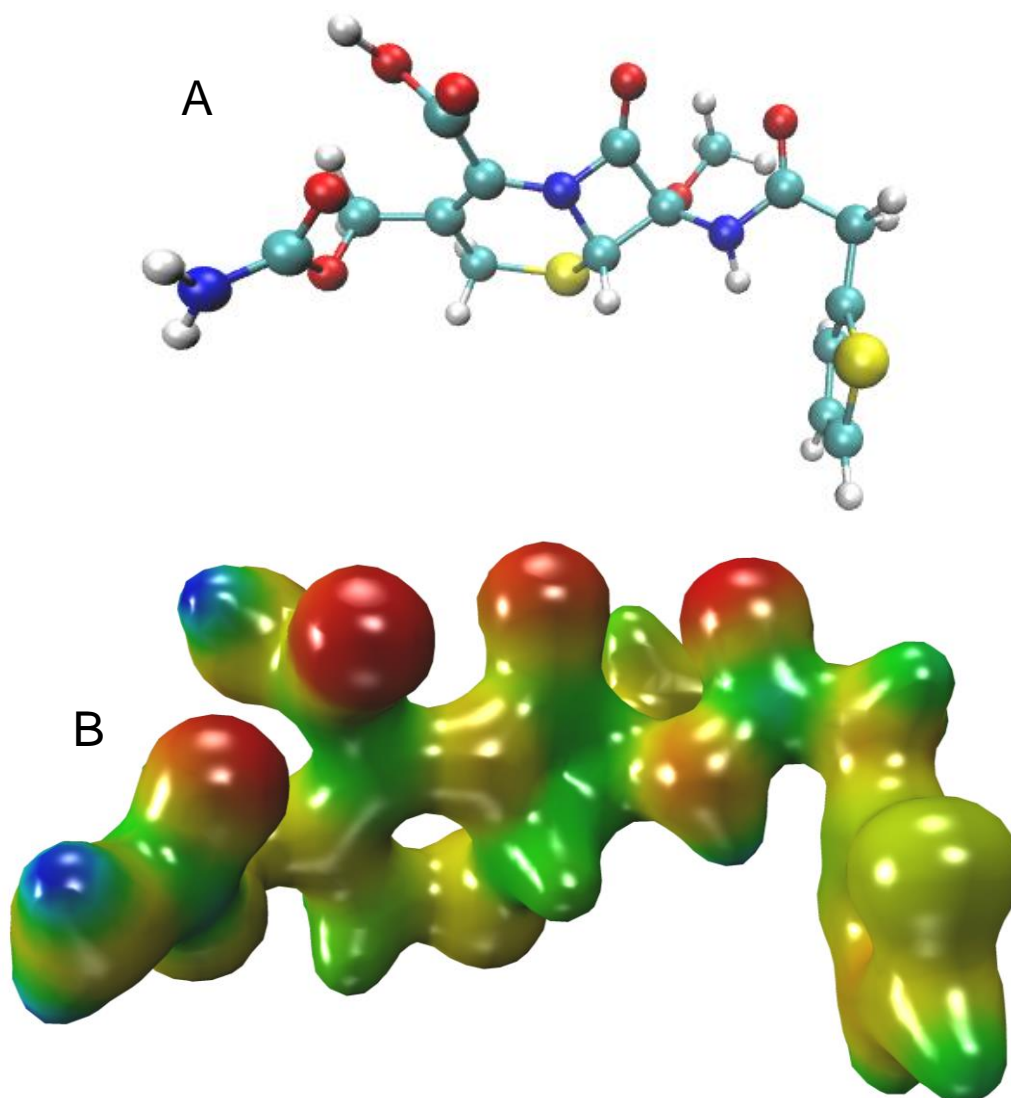


Figura 25: Estrutura da cefoxitina (A). Mapa do Potencial Eletrostático Molecular (MEP) sobre 0,002 u.a. da superfície de densidade eletrônica para a cefoxitina. Esse MEP foi derivado do cálculo com o método B3LYP(6-31G^{*})/MM com a cefoxitina, no qual o aumento da carga negativa vai do azul (positivo) para o vermelho (negativo) (B).

A partir da Figura 25B pode-se observar uma região com potencial eletrostático negativo muito mais intenso em torno do grupo carboxílico e uma região com potencial eletrostático positivo em torno dos átomos de hidrogênio do ligante.

A ligação peptídica inclusa no anel β -lactâmico caracteriza-se como um centro altamente eletrofílico, como ilustra o mapa de densidade eletrônica descrito na Figura 25B. Desta forma, o ataque nucleofílico do grupo alcóxi do resíduo serina da tríade catalítica da proteína ao centro eletrofílico promove a abertura do anel de quatro membros e a formação de uma ligação covalente, responsável pela inibição irreversível da enzima.

5.6 Energia de Interação Global

Utilizando os métodos AM1/MM e B3LYP/MM, cálculos de energia de interação foram realizados para descrever a afinidade proteína-ligante. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Energia de interação global média (energia de ligação, E_{Int} ,) calculada durante os últimos 500 ps de DM AM1/MM e energia global de interação obtida por *single point* usando o método híbrido B3LYP/MM.

E_{Int} AM1/MM (KJ/mol)	E_{Int} B3LYP/MM (KJ/mol)
-1825,30 (\pm 59,52)	-2877,09 (\pm 663,44)

Os valores de energia de interação global média, apresentados na Tabela 5, foram correlacionados estatisticamente com o valor da média dos halos de inibição da cepa de *E. coli* ATCC 8739 (24,33 mm) pela cefoxitina, no qual se obteve valor de p igual a 0,1487 (Tabela 6); e com o valor da média dos halos de inibição da cepa de *E. coli* ATCC 8739 (29,44 mm) pelas

Tabela 6: Correlação estatística entre os valores de energia global média e os valores da média dos halos de inibição da cepa de *E. coli* ATCC 8739 (sem EDTA), do isolado clínico de *E. coli* (com EDTA), e do isolado clínico de *E. coli* (sem EDTA); pela cefoxitina e pelas cefalosporinas.

Método	Correlação estatística												
	Cepa de <i>E. coli</i> ATCC 8739				Isolado clínico de <i>E. coli</i> (com EDTA)				Isolado clínico de <i>E. coli</i> (sem EDTA)				
	Energia de Interação Global Média (KJ/mol)	Média dos halos Cefoxitina (mm)	Valor de p	Média dos halos Cefalosporinas (mm)	Valor de p	Média dos halos Cefoxitina (mm)	Valor de p	Média dos halos Cefalosporinas (mm)	Valor de p	Média dos halos Cefoxitina (mm)	Valor de p	Média dos halos Cefalosporinas (mm)	Valor de p
AM1	1825,30	24,33	0,1487	29,44	0,1064	25,00	0,1422	18,33	0,2249	26,33	0,1302	19,44	0,2079
DFT	2877,09	24,33		29,44		25,00		18,33		26,33		19,44	

cefalosporinas utilizadas no estudo, no qual se obteve valor de p igual a 0,1064.

Os valores de energia de interação global média também foram correlacionados estatisticamente com o valor da média dos halos de inibição da cepa proveniente de isolado clínico de *E. coli* com a adição de EDTA (25,00 mm) pela cefoxitina, no qual se obteve valor de p igual a 0,1422; e com o valor da média dos halos de inibição da cepa proveniente de isolado clínico de *E. coli* com a adição de EDTA (18,33 mm) pelas cefalosporinas utilizadas no estudo, no qual se obteve valor de p igual a 0,2249.

Esses valores de energia de interação global média ainda foram correlacionados estatisticamente com o valor da média dos halos de inibição da cepa proveniente de isolado clínico de *E. coli* sem a adição de EDTA (26,33 mm) pela cefoxitina, no qual se obteve valor de p igual a 0,1302; e com o valor da média dos halos de inibição da cepa proveniente de isolado clínico de *E. coli* sem a adição de EDTA (19,44 mm) pelas cefalosporinas utilizadas no estudo, no qual se obteve valor de p igual a 0,2079.

Essa análise estatística forneceu valores de $p > 0,05$, indicando que a diferença entre a metodologia computacional e a experimental não é significativa, portanto, os resultados experimentais foram equivalentes aos resultados teóricos computacionais, admitindo que o trabalho pode ser utilizado como um protótipo teórico computacional via modelagem molecular para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias Gram negativas.

6 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados encontrados pode-se concluir:

- A cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 foi sensível aos 5 antimicrobianos do estudo.
- A cepa de *E. coli* proveniente do isolado clínico apresentou resistência à ciprofloxacina 5 µg e à gentamicina 10 µg, sensibilidade intermediária à cefepime 30 µg e à ceftazidima 30 µg, e sensibilidade à cefoxitina 30 µg.
- A diferença na suscetibilidade entre a cepa de *E. coli* ATCC 8739 e a cepa de *E. coli* proveniente de isolado clínico pode evidenciar uma memória imunológica molecular da bactéria.
- Ausência de produção de metalo-β-lactamases pela cepa de *E. coli* oriunda de isolado clínico, sugerida por não se ter observado diferença de suscetibilidade antimicrobiana com relação à presença ou à ausência de EDTA nos discos contendo os antimicrobianos.
- A estabilização do complexo estudado ocorreu após 0,6 ns de simulação de dinâmica molecular, portanto, o tempo computacional empregado foi satisfatório para os resultados encontrados.
- A análise da interação individual entre o ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da PBP5 de *E. coli* revelaram que a cefoxitina apresenta forte interação com os resíduos Lis44, Lis210, Ser41, Gli212, His213, Glu246, além da água, os quais são importantes para estabilizar o complexo cefoxitina-PBP5.
- O Mapa do Potencial Eletrostático Molecular da cefoxitina revelou um centro altamente eletrofílico na região correspondente ao anel β-lactâmico, o que favorece o ataque nucleofílico do grupo alcóxi do resíduo de serina do sítio ativo da PBP5 de *E. coli*.
- Os resultados experimentais são estatisticamente condizentes com os resultados teóricos.
- O trabalho pode ser utilizado como um protótipo teórico computacional para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativas.

- Este estudo poderá encontrar aplicações futuras no planejamento e desenvolvimento de novos e potentes compostos com atividade antimicrobiana. Principalmente, nas tentativas de modificar um inibidor, em particular da classe das cefalosporinas, a fim de melhorar a sua seletividade e a sua atividade.

REFERÊNCIAS

ABRAAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146: 837, 1940.

ABRAHAM, D.J. *Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. Chemotherapeutic Agents*, John Wiley & Sons: San Francisco, 2003, Volume 5.

ABRAHAM, D.J. X-ray crystallography and drug design. In: PERUN, T.J.; PROPST, C.L. (eds) *Computer-aided drug design: methods and applications*. Marcel Dekker, New York, 1989.

AFONSO, I.F. Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos *in silico* de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana. 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2008.

ALENCAR, N.A.N.; SOUSA, P.R.M.; SILVA, J.R.A.; LAMEIRA, J.; ALVES, C.N.; MARTI, S.; MOLINER, V. Computational analysis of human OGA structure in complex with PUGNAc and NAG-thiazoline derivatives. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52:2775-2783, 2012.

ALLEN, M.P.; TILDESLEY, D.J. *Computer Simulation of Liquids*, Oxford University Press, 1987.

ALLNÉR, O.; NILSON, L.; VILLA, A. Magnesium íon-water coordination and exchange in biomolecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v.8, p.1493-1502, 2012.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.; GREASY, J.E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews*, 26:531-586, 2006.

ANDREI C.C. Da química medicinal à química combinatória e Modelagem molecular: Um curso pratico. 1ª Ed. Brasileira .- Barueri, SP: Manole, 2003.

ANDREI, C.C.; FERREIRA, D.T.; FACCIONE, M.; FARIA, T.J. Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular: um curso prático. Barueri: Editora Manole, 2ª ed. 2012. 168 p.

ANDRÉS, J.; BELTRAN, J. Química Teórica y Computacional, Universitat Jaume I. Castellón de la Plana, España, 2000.

ANTOSIEWICZ, J.; MCCAMMON, J. A.; GILSON, M.K. Prediction of Ph-Dependent Properties of Proteins. *Journal of Molecular Biology*, v.238, n.3, May 6, p. 415-436. 1994.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K.M.; SILVA, A.B.F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química Nova*, Vol.33, Nº 3, p. 694-699, 2010.

ATAUALPA, A.C.; BRAGA H.M.; MORGON, N.H. Cálculos teóricos de afinidades por próton de n-alquilaminas usando o método ONIOM. *Química Nova*, vol. 29, n. 2, p. 187-193, 2006.

AYRES, M.; JÚNIOR, M.A.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. dos. BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém, 2007, 334 p.

BARCENILLA, F.; GASCO, E.; RELLO, J.; ALVAREZ-ROCHA, L. Antibacterial treatment of invasive mechanical ventilation-associated pneumonia. *Drugs Aging*; 18: 189-200, 2001.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. Bailey & Scott's – Diagnostic microbiology, 8 ed. The C.V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, Artmed Ed. Ltda: Porto Alegre, 2001.

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R.; ALBUQUERQUE, M.G.; SANT'ANNA, C.M.R.; ALENCASTRO, R.B. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. *Quim Nova*, v.20, n.3, p. 300-310, São Paulo, 1997.

BECKE, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation With Correct Asymptotic Behavior. *Physical Review A.*, v. 38, p. 3098-3100, 1988.

BECKMAN, W. Crystallization of Pharmaceutical Compounds-Polymorphs, PseudoPolymorphs and Particle Formation. *Eng. Life. Sci.* 3, p. 113-120, 2003.

BEDNENKO, E.; MERCIER, C.; TREMBLAY, J.; TAILLIEZ, P.; KULAKAUSKAS, S. Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescente situ hibridization. *Applcad Enviroment Microbiology*, Volume 8, p. 3059-3062, 1998.

BERTONCHELI, C.M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Volume 44, n. 4. São Paulo, 2008.

BOMONO, R.A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species, *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*; 43: 49-56, 2006.

BORN, M.; OPPENHEIMER, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annu. Phys.* (Leipzig). 84: 457-484, 1927.

BROOKS, B.R.; BRUCCOLERI, R.E.; OLAFSON, B.D.; STATES, D.J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry*. Volume 4, p. 187-217, 1983.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. Editora Mcgraw Hill. 25. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

BURKE, K.; WERSCHNIK J.; GROSS, E.K.U. Time-dependent density functional theory: Past, present, and future. *The Journal of Chemical Physics*. American Institute of Physics. p. 1236, 2005.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, Volume 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. *Química Nova*, v.26(3), p. 428-438, 2003.

CHAMBERS, H.F. Evaluation of Cefbiprole. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 49:884-88. 2005.

CHAMBERS, H.F. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *Journal of Infectious Diseases*. 179 Suppl 2: S353–9. 1999. DOI: 10.1086/513854. PMID 10081507.

CLARK, T.; *A Handbook of Computational Chemistry*; Wiley; New York, 1985.

COELHO, L.W.; JUNQUEIRA, G.M.A.; HERRERA, J.O.M.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Aplicações de mecânica molecular em química inorgânica. *Química Nova*, v.22(3), p.396-404, 1999.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard*. 8. ed. CLSI document M2-A8 Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: <<http://www.clsi.org/source/orders/free/m7-a7f.pdf>>. Acesso em: 02.04.2014 às 22:58 h. 2003b.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S17 (ISBN 1-56238-625-5). Vol. 27, Nº 1. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007. Disponível em: <<http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>>. Acesso em: 06.04.2014 às 19:24 h.

COHEN, N.C.; BLANEY, J.M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D.C. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 33, 883, 1990.

Colônia do fungo *Cephalosporium acremonium*. Disponível em: <http://s683.photobucket.com/user/dmwake/media/MIC425L%201-26-2010/CephalosporiumAcremoniumKillense2.jpg.html>. Acesso em: 13.06.2013 às 21:46 h.

Colônia do fungo *Streptomyces*. Fotografado por Ramón Santamaría. IMB/CSIS-USAL. Salamanca. Disponível em: www.flickr.com/photos/canalbiologia/3586958274. Acesso em: 16.06.2013 às 10:33 h.

COUTINHO, K.; MORGON, N. H. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. 1ª ed. São Paulo: Da Física. p.423-450, 2007.

CRAMER, C.J. *Essential Computational Chemistry Theories and Models*. UK, British Library, 2004.

DAPPRICH, S.; KOMÁROMI, I.; BYUN, K.S.; MOROKUMA, K.; FRISCH, M.J.; *Journal Molecular Structure: THEOCHEM*, vol. 1, n. 461/462, 121, 1999.

DAVIS, M. E.; MCCAMMON, J. A. Calculating Electrostatic Forces From Grid-Calculated Potentials. *Journal of Computational Chemistry*, Volume 11, p. 401-408, 1990.

DeFLAUN, M.F.; LEVY, S.B. Genes and their varied hosts. In: Levy S.B., Miller, R.V. Eds. *Gene transfer in the environment*. New York, *McGraw Hill Publishing*, p. 1-32, 1989.

DEN BLAAUWEN, T.; DE PEDRO, M.A.; NGUYEN-DISTÈCHE, M.; AYALA, J.A. Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiology Reviews*. 32:321–344, 2008.

DE PEDRO, M.A.; YOUNG, K.D.; HOLTJE, J.V.; SCHWARZ, H. Branching of *Escherichia coli* cells arises from multiple sites of inert peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* 185, p. 1147-1152, 2003.

DESCHAMPS, J. R.; "X-ray crystallography of chemical compounds". *Life Sciences*, v. 86, p. 585-589, 2010.

DEWAR, M.J.S.; ZOEBISCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P. The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models. 76. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, Volume 107,n.13, p. 3902-3909, 1985.

DRENTH, J. *Principles of Proteins X-Ray Crystallography*. New York: Springer Verlag, 1994.

FAN, H.; MARK, A.E. Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. *Protein Sc.*, 13:211-220, 2004.

FERNÁNDEZ, M.; CABALLERO, J. QSAR models for predicting the activity of non-peptide luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonists derived from erythromycin A using quantum chemical properties. *Journal of Molecular Modeling*, 13, p. 465-476, 2007.

FERNÁNDEZ, N.D. Modelización molecular de β -lactamasas y PBPs. Real Sociedad Española de Química. Departamento de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo, Asturias. *Anales de Química*, 2007, 103(1), 38-45.

FIELD, M.J.; ALBE, M.; BRET, C.; PROUST-DE MARTIN, F.; THOMAS, A. The dynamo library for molecular simulations using hybrid quantum mechanical and molecular mechanical potentials. *Journal of Computational Chemistry*, Volume 21, p. 1088-1100, 2000.

FIELD, M.J.; BASH, P.A.; KARPLUS, M. A Combined Quantum-Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular-Dynamics Simulations. *Journal of Computation Chemistry*, Volume 11, n.6, Jul, p. 700-733, 1990.

FLEMING, I. Frontier orbitals and organic chemical reactions. Wiley & Sons, London, 1978.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R. Gaussian 03, Revision C.02. Gaussian 03, *Revision C. 02*, 2003.

FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; MONTGOMERY, JR. J.A.; VREVEN, T.; KUDIN, K.N.; BURANT, J.C.; MILLAM, J.M.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M. EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J.E.; HRATCHIAN, H.P.; CROSS, J.B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A.J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J.W.; AYALA, P.Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G.A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; ZAKRZEWSKI, V.G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A.D.; STRAIN, M.C.; FARKAS, O.; MALICK, D.K.; RABUCK, A.D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J.B.; ORTIZ, J.V.; CUI, Q.; BABOUL, A.G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B.B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R.L.; FOX, D.J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M.A.; PENG, C.Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P.M.W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M.W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J.A. Gaussian 03, Inc., Wallingford CT, 2004.

FORESMAN, J.B.; FRISCH, Æ. Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods 2. Ed. Pittsburgh, Gaussian, Inc. 1996.

GARCÍA-VILOCA, M.; GAO, J.; KARPLUS, M.; TRUHLAR, D. G. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science*, 303 (5655), p. 186-195, 2004.

GELDENHUYS, W.J.; GAASCH, K.E.; WATSON, M.; ALLEN, D.D.; VAN DER SCHYF, C.J. - Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. *www.drugdiscoverytoday.com - DDT* .11 (3/4): p. 126 – 132, 2006.

GHASEMI, J.; SAAIDPOUR, S.; BROWN, S.D. QSPR study for estimation of acidity constants of some aromatic acids derivatives using multiple linear regression (MLR) analysis. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 805, p. 27-32, 2007.

GILSON, M.K. Multiple-Site Titration and Molecular Modeling – 2 Rapid Methods for Computing Energies and Forces for Ionizable Groups in Proteins. *Proteins-Structure Function and Genetics*, v.15, n.3, Mar, p. 266-282, 1993.

GITTINS, J.R.; PHOENIX, D.A.; PRATT, J.M. Multiple mechanisms of membrane anchoring of Escherichia coli penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: p. 1–12, 1994.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brasil. *Química Nova*, Vol. 33, No. 3, p. 667-679, 2010.

GUND, P., BARRY, D.C., BLANEY, J.M.; COHEN, C. Guidelines for publications in molecular modeling related to medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 31, p. 2230-4, 1988.

GUNSTEREN, W.F.; VAN, H.J. C.; BERENDSEN, G. *Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, Biomos, Groningen, The Netherlands, 1987.

HANCOCK, R.E.W. Mechanisms of Action of Newer Antibiotics for Gram-positive Pathogens. *Lancet Infectious Diseases*, 5, p. 209-218, 2005.

HARDAMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G.; *Goodman and Gilman's - The Pharmacological basic of therapeutics*, 9^a ed., McGraw-Hill: New York, 1995.

HEATON, C.A.; MILLER, A.K.; POWELL, R.L. Predicting the reactivity of fluorinated compounds with copper using semi-empirical calculations. *Journal of Fluorine Chemistry*, Volume 107, p. 1-3, 2001.

HEHRE, W. J.; RADOM, L.; SCHLEYER, P.V.R.; POPLE, J. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. New York: Wiley, 1986.

HENQUELL, C.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; SIROT, J. Molecular characterization of 9 different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM (IRT) from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39: p. 427-430, 1995.

HÖLTJE, H.D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. - *Molecular Modeling – Basic Principles and Applications*. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co*, II ed, 2003.

HONÓRIO, K.M.; GARRATT, R.C.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A.D. 3D QSAR comparative molecular field analysis on nonsteroidal farnesoid X receptor activators. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, Volume 25, p. 921-927, 2007.

HOOPER, D.C. Pumps, nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*; 40: p. 1811-17, 2005.

HOUSE, J.E. *Fundamentals of quantum chemistry*, Elsevier, San Diego, 291p, 2004.

JACOBY, G.A. Desenvolvimento da resistência em patógenos Gram-negativos. Relatório especial de Hospital Practice “Patógenos emergentes nas doenças infecciosas”, *McGraw-Hill Company*, p. 14-19, 2000.

JORGENSEN, W.L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.D.; IMPEY, R.W.; KLEIN, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 79: p. 926-935, 1983.

JORGENSEN, W.L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *Journal of the American Chemical Society*, v.110, p. 1657-1666, 1988.

KARELSON, M.; LOBANOV, V.S.; KATRITZKY, A.R. Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. *Chemical Reviews*, 96, p. 1027-1043, 1996.

KENDREW, J.C.; BODO, G.; DINTZIS, H.M.; PARRISH, H.; WYCKOFF, H.; PHILLIP, D.C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, 181, p. 662-666, 1958.

KIRBY, W.M.M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*, 99: p. 452-453, 1944.

KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J.R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, Volume 3, p. 935-949, 2004.

KOHN, W.; SHAM, L.J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*. Volume 140, p. 1133, 1965.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. *Essential of medicinal chemistry*. New York, Wiley-Interscience, 1976.

KUBINYI, H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*, VCH: New York, 1993.

KUKOL, A. *Molecular Modeling of Proteins (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, Totowa, NJ. 443, 2009.

LABORCLIN. *Manual de Antibiograma*. Rev.: 07, 2013.

LAMEIRA, J.; ALVES, C.N.; MOLINER, V.; MARTÍ, S.; KANAAN, N.; TUÑÓN, I.A. Quantum mechanics/molecular mechanics study of the protein-ligand interaction of two potent inhibitors of human O-GlcNAcase: PUGNAc and NAG-Thiazoline, *The Journal of Physical Chemistry B.*, 112: p. 14260-14266, 2008.

LEACH, A. - Molecular Modelling – Principles and Applications. *Pearson Education Limited*, II ed., 2001.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula Into a Functional of the Electron Density. *Physical Review B*, Volume 37, p. 785-789, 1988.

LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H.B.; KIM, Y.A.; YONG, D.; YUM, J.H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen Metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection Diseases*. Volume 7, Number 2, p. 88-91, 2001.

LEUNG, M.; SHANNON, K.; FNENCH, G. Rarity of transferable β -lactamase production by *Klebsiella* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39: p. 737-745, 1997.

LEVINE, I.N. Quantum Chemistry. Prentice Hall, 5^a Ed. 739p, 2001.

LI, H.; ROBERTSON, A.D.; JENSEN, J.H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK(a) values. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, Volume 61, n.4, Dec 1, p. 704-724, 2005.

LIVERMORE, D.M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Volume 8, n. 4, p. 557-84, 1995.

LIVERMORE, D.M.; WILLIAMS, J.D. β -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance, p. 502-578, 1996. In V. Lorian (eds.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4 th. ed. Williams & Wilkins Baltimore, Maryland.

LUQUE, F.; REUTER, N.; CARTIER, A.; RUIZ-LOPEZ. Calibration of the quantum/classical hamiltonian in semi-empirical QM/MM AM1 and PM3 methods. *The Journal of Physical Chemistry*, 104: p. 10923-10931, 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms, 10^a Edition, *Pearson Education*, 2004.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. Brock Biology of Microorganisms, 11^a Edition, *Pearson Education*, 2005.

MARSHALL, G.R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In: OPREA, T. I. Chemoinformatics in drug discovery. Weinheim: WILEY-VHC, p. 1-22, 2004.

MARTÍ, S.; ROCA, M.; ANDRES, J.; MOLINER, V.; SILLA, E.; TUÑÓN, I.; BERTRÁN, J. Theoretical insights in enzyme catalysis. *Chemical Society Reviews*, 33: p. 98–107, 2004.

MARTIN, Y.C.; BURES, M.G.; WILLETT, P. Searching Databases of Three-Dimensional Structures. In: LIPKOWITZ, K.B.; BOYD, D.B. (eds) *Reviews in computational chemistry*. VCH Pub, New York, 1990.

MASERAS, F.; MOROKUMA, K.; On the application of the IMOMO (integrated molecular orbital + molecular orbital) method. *Journal of Computational Chemistry*, Volume 16, p, 1170, 1995.

McGOWAN, J.E.; TENOVER, F.C. Control of antimicrobial resistance in the health care system. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11: p. 297-311, 1997.

MIGUEL-JUNIOR, A. Bactérias Gram positivas e Gram negativas, 2008. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/07/06/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas/> Acesso em: 25.05.2013 às 14:44 h.

MOLDEN. SCHAFTENAAR, G. A pre- and post-processing program of molecular and electronic structure. Origem: Center for Molecular and Biomolecular Informatics (CMBI), Radboud University Nijmegen, the Netherlands, 1993.

MONTELLI, A.C.; SADATSUNE, T. Antibioticoterapia para o clínico. Sociedade Brasileira de Microbiologia. Rio de Janeiro, p. 7, 2001.

MORRIS, K. R. In: BRITTAİN, H. G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. Structural Aspects of Hydrates and Solvates. New York: Marcel Dekker, Inc., Volume 95, n. 4, p.125-181, 1999.

MOTTA NETO, J.D., ZERNER, M.C.; ALENCASTRO, R.B. A possible mechanism of molecular recognition for the reverse transcriptase of HIV-1. *International Journal of Quantum Chemistry. Quantum Biology Symposium: Proceedings of the International Symposium on Quantum Biology and Quantum Pharmacology*. 1992, 19, 225.

MURRAY, P.R. Microbiologia médica. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

NAPOLITANO, H.B.; CAMARGO, A.J.; MASCARENHAS, Y.P.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C. Análise da difração dos raios X. *Revista Processos Químicos*. v.I, p. 35 - 45, 2007.

NAPOLITANO, H.B.; MASCARENHAS, Y.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C. Difração de raios-X e a lei de Bragg, Monografia de Ensino da Sociedade Brasileira de Cristalografia, 2004.

NICHOLAS, R.A.; STROMINGER, J. L. Site-directed mutants of a soluble form of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli* and their catalytic properties. *Journal of Biological Chemistry*. 263: p. 2034–2040, 1988.

NICOLAOU, K.C.; MONTAGNON, T. *Molecules that Changed the World*, Wiley-VCH: Weinheim, cap. 13, 2008.

NICOLAS-CHANOINE, M.H. Impact of β -lactamases on the clinical use of β -lactam antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 7: p. 21-26, 1996.

PADMANABHAN, J.; PARTHASARATHI, R.; SUBRAMANIAN, V.; CHATTARAJ, P.K. QSPR models for polychlorinated biphenyls: n-Octanol/water partition coefficient. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, p. 1021-8, 2006.

PASHA, F.A.; SRIVASTAVA, H.K.; SINGH, P.P. Comparative QSAR study of phenol derivatives with the help of density functional theory. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, p. 6823-9, 2005.

PASSAMANI, F. Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-químico e Toxicológicos *In Silico* de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antiviral. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 103, 2009.

PATRICK, G.L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press: New York, cap. 16, 2005.

PDBsum. Principais interações da cefoxitina com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da PBP5. Disponível em: PDBsum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=3mze&template=ligands.html&l=1.1>). Acesso em: 27.03.2013 às 16:12 h.

PEITSCH, M.C. Manuel Peitsch discusses knowledge management and informatics in drug discovery. *Drug Discovery Today: BIOSILICO*, Volume 02. p. 94-96, 2004.

PERUN, T.J.; PROPST, C.L. (eds) *Computer-aided drug design: methods and applications*. Marcel Dekker, New York, 1989.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; LAGRANGE, P.H. Origin and impact of plasmid-mediated extend-spectrum β -lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13: p. 517-529, 1994.

POTLURI, L.; KARCZMAREK, A.; VERHEUL, J.; PIETTE, A.; WILKIN, J.M.; WERTH, N.; BANZHAF, M.; VOLLMER, W.; YOUNG, K.D.; NGUYEN-DISTÈCHE, M.; DEN BLAAUWEN, T. Septal and lateral wall localization of PBP5, the major D,D-carboxypeptidase of *Escherichia coli*, requires substrate recognition and membrane attachment. *Molecular Microbiology*. 77: p. 300–323, 2010.

Project crystal. University of Wisconsin System, 2013.

Disponível em: <http://www.projectcrystal.org/hl-xray-crystallography.html>. Acesso em: 25/05/2013 às 14:05 h.

PROPST, C.L.; PERUN, T.J. Introduction to computeraided drug design. In: PERUN, T.J.; PROPST, C.L. (eds) *Computer-aided drug design: methods and applications*. Marcel Dekker, New York, 1989.

PUPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO, N.A.J.C.; BORGES, W.S. Em *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*; TAFT, C. A., ed.; Research Signpost: Kerala, cap. 4, 2006.

QUINN, J. P.; MIYASHIRO, D.; SAHM, D.; FLAMM, R.; BUSH, K. Novel plasmid-mediate β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(9): p. 1451-1456, 1989.

QUINTEIRA, S.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L. Characterization of In100, a new integrin carrying a metallo- β -lactamase and a carbenicillinase, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volume 49, n. 1, p. 451-3, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 3 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 692p., 1997.

RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb>. Acesso em: 28.04.2013 às 19:43 h.

RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3mze>. Acesso em: 27.03.2013 às 15:21 h.

ROMÃO, M.J. Cristalografia de Proteínas: Metodologias e Aplicações em Bioquímica” *Boletim de Biotecnologia*, nº 53, p. 18-36, 1996.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1994.

SANT'ANNA C.M.R. - Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos. *Química Nova* 25(3): p. 505-512, 2002.

SANTOS, J.L.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; OLIVEIRA, H.P.; BUELONI, R.H.; BOFFO, E.; MACHADO, R.G.P.; LONGO, M.C.; CHUNG, M.C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Volume 28, n.2, p. 235-240, 2007.

SARMIENTO, D.Y.R. Estudio teórico de la conformación de dímeros a partir de (50-56) β -2-microglobulina. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Bucaramanga, 2011.

SAUVAGE, E.; KERFF, F.; TERRAK, M.; AYALA, J.A.; CHARLIER, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: p. 234–258, 2008.

SCROCCO, E.; TOMASI, J. In *Topics in Current Chemistry*, Springer-Verlag. Berlin, Volume 42, 1973.

SILVA, N.F.; LAMEIRA, J.; ALVES, C.N. Computational analysis of aspartic protease plasmepsin II complexed with EH58 inhibitor: a QM/MM MD study. *Journal of Molecular Modeling*. DOI: 10.1007/s00984-011-0963-1, 2011.

SILVA, T.H.A. Modelagem molecular com auxílio de computador. Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006.

SILVA, T.H.A. Modelagem molecular. In: ANDREI, C.C.; FERREIRA, D.T.; FACCIONE, M.; FARIA, T.J. (ed) *Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular: um curso prático*. Barueri: Manole, Cap. 6, p. 111-39, 2003.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. e TERENZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Química Nova*, Volume 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SILVERMANN, R.B. *The organic chemistry of drug design and drug action*. Academic Press, San Diego, California, 1992.

SOUSA, J.C.F.; PRISTA, L.V.N. Antibióticos inibidores da biossíntese do peptidoglicano. Edição Ordem dos Farmacêuticos, 1988.

SUARÉZ, C.; GUDIOL, F.; Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SUFFREDINI, H.B.; SANTOS, M.C.; SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; HOMEM-DE-MELLO, P.; HONÓRIO, K.M.; DA SILVA, A.B.F.; MACHADO, S.A.S.;

AVACA, L.A. Electrochemical behavior of nicotine studies by voltammetric techniques at boron-doped diamond electrodes. *Analytical Letters*, 38, p. 1587-1599, 2005.

SVENSSON, M.; HUMBEL, S.; FROESE, R.D.J.; MATSUBARA, T.; SIEBER, S.; MOROKUMA, K.; J. ONIOM: a multilayered integrated MO + MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-Alder reactions and $\text{Pt}(\text{P}(\text{t-Bu})_3)_2 + \text{H}_2$ oxidative addition. *Chemical Physics*. Volume 100, n. 50, p. 19357-63, 1996.

TANG, Y.; ZHU, W.; CHEN, K.; JIANG, H. New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery. *Drug Discovery Today: Technologies | Medicinal chemistry* 3 (3): p. 307-313, 2006.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos: para o estudante de medicina. 3ª edição. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro. São Paulo, 1982.

TAVARES, W. Resistência bacteriana. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos 3ª ed. Atheneu, São Paulo. p. 79, 2001.

TENOVER, F.C.; HUGHES, J.M. The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA: Journal of the American Medical Association*, 275: p. 300-304, 1996.

TOLEDO, R.A.; SANTOS, M.C.; HONÓRIO, K.M.; DA SILVA, A.B.F.; CAVALHEIRO, E.T.G.; MAZO, L.H. Use of Graphite Polyurethane Composite Electrode for Imipramine Oxidation: Mechanism Proposal and Electroanalytical Determination. *Analytical Letters*, Volume 39, p. 507-520, 2006.

TOLEDO, R.A.; SANTOS, M.C.; HONÓRIO, K.M.; DA SILVA, A.B.F.; CAVALHEIRO, E.T.G.; MAZO, L.H. Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. *Química Nova*, Volume 28, p. 456-462, 2005.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.H. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 50, n. 5, p. 673-9, 2002.

TOROPOV, A.A.; TOROPOVA, A.P.; BENFENATI, E. QSPR modeling for enthalpies of formation of organometallic compounds by means of SMILES-based optimal descriptors. *Chemical Physics Letters*, 461, p. 343-347, 2008.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R., CASE, C.L. *Microbiologia*.: Porto Alegre: Ed. Artmed, 8 ed., Volume 28, p. 792-812, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia* 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

VARETTO, U. MOLEKEL Version 5.4, Swiss National Supercomputing Center: Lugano, Switzerland, 2009.

VERDONK, M.L.; COLE, J.C.; HARTSHORN, M.J.; MURRAY, C.W.; TAYLOR, R.D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Functions and Bioinformatics*, 52: 609, 2003.

VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. *Physical Review*, 165: p. 201-214, 1967.

VERLI, H.; BARREIRO, E.J. Um Paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, Volume 28, p. 95-102, 2005.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival? *Angewandte Chemie International Edition in English*, 45, p. 5072-5129, 2006.

VREVEN, D. 3D shape discrimination using relative disparity derivatives. *Vision Research*, Volume 46, n. 25, p. 4181-92, 2006.

WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 103, p. 227-249, 1976.

WEBER, K.C.; HONÓRIO, K.M.; ANDRICOPULO, A.D.; DA SILVA, A.B.F. Two-dimensional QSAR Studies on Arylpiperazines as High-Affinity 5-HT_{1A} Receptor Ligands. *Medicinal Chemistry*, Volume 4, p. 328-335, 2008.

WEBER, K.C.; HONÓRIO, K.M.; BRUNI, A.T.; ANDRICOPULO, A.D.; DA SILVA, A.B.F. A Partial Least Squares Regression Study with Antioxidant Flavonoid. *Structural Chemistry*, Volume 17, p. 307-313, 2006.

WEINER, S. J.; KOLLMAN, K.A.; CASE, D.A.; SINGH, U.C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; JR. PROFETA, S.; WEINER, P.K. A New Force for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, Volume 106, p. 765-784, 1984.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12: p. 3-7, 1999.

WOO, T.K.; CAVALLO, L.; ZIEGLER, T.; Tool of the trade in modeling inorganic reactions from balls and sticks to HOMO's and LUMO's. *Theoretical Chemistry*. n. 100, p. 307, 1998.

World Health Organization, WHO, Department of Communicable Disease Surveillance, World Health Organization, Department of essential drugs and medicines policy. <http://www.who.int/en/> [10 January 2007]. Acesso em: 27.04.2013 às 19:34 h.

YAN, S.S.; GILBERT, J.M. Antimicrobial drug delivery in food animals and microbial food safety concerns: an overview of in vitro and in vivo factors potentially affecting the animal gut microflora. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(10): p. 1497-521, 2004.

YU YU, J.; GITTINS, J. Models and software for improving the profitability of pharmaceutical research. *European Journal of Operational Research* 189: p. 459-475, 2008.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: p. 361-385, 2008.