INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

10/08/2020 870200099960 15:40

29409161920996655

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 016245 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 63025530000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua da Reitoria, 374 - Butantã

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508220

País: Brasil

Telefone: (11) 3091.4474

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social:	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO - UNESP
Tipo de Pessoa:	Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ:	48031918000124
Nacionalidade:	Brasileira
Qualificação Jurídica:	Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço:	Rua Quirino de Andrade, 215
Cidade:	São Paulo
Estado:	SP
CEP:	01049-010
País:	BRASIL
Telefone:	(11) 309 11580
Fax:	
Email:	pidireto@usp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente:	10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):	USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS
Resumo:	A presente invenção descreve o uso de diterpenoides ent-caurânicos, como a adenantina (Adn), ou seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os ß-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan) e a gentamicina (Gen), e também as polimixinas, como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos. Além disso, o efeito sinérgico da utilização em conjunto dessas substâncias apresenta um elevado potencial de aplicação farmacêutica em tratamentos de diferentes infecções causadas por microrganismos, a fim de sensibilizar bactérias que apresentem resistência a esses últimos e, também, pode reduzir as quantidades administradas de antibióticos em pacientes reduzindo os efeitos colaterais.
Figura a publicar:	4

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social:	Maria Aparecida de Souza
Numero OAB:	
Numero API:	1833
CPF/CNPJ:	12184617806
Endereço:	Av. Torres de Oliveira, 76 - Jaguaré
Cidade:	São Paulo
Estado:	SP
CEP:	05347020
Telefone:	11 30911580
Fax:	
Email:	pidireto@usp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 12

Nome: GISELE MONTEIRO
CPF: 27866400830
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua José Lopes da Silva, 235
Cidade: São Paulo
Estado: SP
CEP: 05376-110
País: BRASIL
Telefone: (11) 309 11580
Fax:
Email: pidireto@usp.br

Inventor 2 de 12

Nome: ADALBERTO PESSOA JÚNIOR
CPF: 03144080888
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua Aibi, 16, Apto 114
Cidade: São Paulo
Estado: SP
CEP: 05054-010
País: BRASIL
Telefone: (11) 309 11580
Fax:
Email: pidireto@usp.br

Inventor 3 de 12

Nome: ANA JÚLIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA

CPF: 09449014841

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua República do Iraque, 1745, Casa 2

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 04611-003

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 4 de 12

Nome: BRUNA DEL BUSSO ZAMPIERI

CPF: 09475807608

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Sylvia Monteiro Franco, 19

Cidade: Poços de Caldas

Estado: MG

CEP: 37718-101

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 5 de 12

Nome: CARLOS ABRUNHOSA TAIRUM JUNIOR

CPF: 32048506844

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Avenida Nossa Senhora da Assunção, 647, Apto 54D

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05359-001

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 6 de 12

Nome: CARLOS ALEXANDRE BREYER

CPF: 00972409904

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Empresário e produtor de espetáculos

Endereço: Rua Aldo Coli, 843, Casa 4

Cidade: Praia Grande

Estado: SP

CEP: 11704-760

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 7 de 12

Nome: LUIS EDUARDO SOARES NETTO

CPF: 09082264897

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Doutor Manole de Paiva Ramos, 265, Apto 51M

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05351-015

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 8 de 12

Nome: MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA

CPF: 11917879822

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Ariovaldo Reis, 253

Cidade: Guarujá

Estado: SP

CEP: 11421-190

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 9 de 12

Nome: MARCOS HIKARI TOYAMA

CPF: 12069390870

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Frei Gaspar, 253, Apto 1009

Cidade: São Vicente

Estado: SP

CEP: 11310-060

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 10 de 12

Nome: MELINA CARDOSO DOS SANTOS

CPF: 33204185800

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Serra da Mantiqueira, 129

Cidade: Barueri

Estado: SP

CEP: 06413-080

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 11 de 12

Nome: ROLANDO IÉ

CPF: 23463366886

Nacionalidade: Guineense

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Rangel Pestana, 273, Apto 11

Cidade: São Vicente

Estado: SP

CEP: 11230-120

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Inventor 12 de 12

Nome: VANESSA DA COSTA ANDRADE

CPF: 39919332844

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Avenida Padre Antonio Jose dos Santos, 78, Apto 78

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 04563-000

País: BRASIL

Telefone: (11) 309 11580

Fax:

Email: pidireto@usp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU depósito Inibição de enzimas.pdf
Procuração	Procuração USP - Prof Vahan Agopyan.pdf
Procuração	Procuração Unesp-USP.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	REIVINDICAÇÕES.pdf
Desenho	FIGURAS.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Autorizações dos inventores	Autorizações dos inventores - Inibição de Enzimas-19.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

☑ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

☑ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.
Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

BANCO DO BRASIL | **001-9** | **00190.00009 02940.916196 20996.655179 4 83380000007000**

Recibo do Pagador

Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço
UNIVERSIDADE DE SAO PAULO USP CPF/CNPJ: 63025530000104
RUA DA REITORIA 374 BUTANTA, SAO PAULO -SP CEP:05508220
Sacador/Avalista

Nosso-Número	Nr. Documento	Data de Vencimento	Valor do Documento	(=) Valor Pago
29409161920996655	29409161920996655	05/08/2020	70,00	

Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37
RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910

Agência/Código do Beneficiário
2234-9 / 333028-1

Autenticação Mecânica

17/07/2020 - BANCO DO BRASIL - 13:01:32
783211358 0098

COMPROVANTE DE PAGAMENTO DE TITULOS

BANCO DO BRASIL S.A.

00190000090294091619620996655179483380000007000
BENEFICIARIO:
INSTITUTO N P I - INPI
NOME FANTASIA:
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE I
CNPJ: 42.521.088/0001-37
PAGADOR:
UNIVERSIDADE DE SAO PAULO USP
CNPJ: 63.025.530/0001-04

NOSSO NUMERO	29409161920996655
CONVENIO	02940916
DATA DE VENCIMENTO	05/08/2020
DATA DO PAGAMENTO	17/07/2020
VALOR DO DOCUMENTO	70,00
VALOR COBRADO	70,00

NR.AUTENTICACAO A.AB9.7F8.B59.F0F.A1C
LEIA NO VERSO COMO CONSERVAR ESTE DOCUMENTO,
ENTRE OUTRAS INFORMACOES.

GABINETE
DO
REITOR

PROCURAÇÃO

A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP, autarquia estadual de regime especial, criada pelo Decreto Estadual nº 6.283, de 25 de janeiro de 1934, modificado pelo Decreto-Lei nº 13.855, de 29 de fevereiro de 1944, regida por seu Estatuto baixado através da Resolução nº 3.461, de 07 de outubro de 1988, com sede à Rua da Reitoria, 374 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo/SP, CEP 05508-220, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 63.025.530/0001-04, neste ato representada por seu Reitor, Prof. Dr. VAHAN AGOPYAN, brasileiro, casado, portador do RG nº 4.810.600-8 SSP/SP e inscrito no CPF/MF sob o nº 839.536.208-00, domiciliado em São Paulo, com endereço funcional à Rua da Reitoria, 374 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo/SP, CEP 05508-220, pelo presente instrumento e na melhor forma de direito, nomeia e constitui seus bastantes Procuradores LUIS GUSTAVO GOMES PRIMOS, brasileiro, solteiro, advogado, portador do RG nº 15.619.942-7 e inscrito no CPF/MF sob o nº 088.524.078-20 e na OAB/SP sob o nº 126.061, domiciliado nesta Capital, com endereço funcional na Rua da Reitoria, 374 – 2º andar – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo/SP, CEP 05508-220; e MARIA APARECIDA DE SOUZA, brasileira, solteira, agente de inovação, portadora do RG nº 20.436.777 SSP/SP, inscrita no CPF/MF sob o nº 121.846.178-06 e API nº 1833, domiciliada nesta Capital, com endereço funcional na Avenida Torres de Oliveira, 76, Jaguaré, São Paulo/SP, CEP 05347-902, a quem confere os mais amplos poderes de representação perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, o Registro Nacional de Cultivares – RNC e o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC, podendo, em nome da mandante, praticar todos os atos que se fizerem necessários ao registro de marcas, patentes, proteção e registro de cultivares, cumprimento de exigências, averbações de contratos de licenciamento ou transferência de tecnologia, oferecimento de oposições, recursos, cancelamentos ou revisões administrativas, bem como sua contestação, pedidos de caducidade, pagamento de anuidade, retirada de certificados, requerimento de prorrogação, alteração de sede, denominação ou titular, requerer buscas, desarquivamento, vistas de processos, promover o registro de direitos autorais, e de programas de computador, nas repartições competentes, autorizar a cópia de documentação técnica de programa de computador, podendo ainda desistir de pedidos, bem como praticar todo e qualquer outro ato que se faça necessário ao bom e fiel cumprimento desta procuração, podendo ainda agir em separado, independentemente da ordem de nomeação, ficando ratificados os atos eventualmente já praticados.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2018.

13º BUTANTÃ

Vahan Agopyan
Reitor

Rua da Reitoria, 374 – Cidade Universitária – 05508-220 – São Paulo – SP – Brasil
Tel.: (55-11) 3091-3500 / 3091-3501

OFICIAL DO REGISTRO CIVIL DAS PESSOAS NATURAIS DO 13º SUBDISTRITO BUTANTÃ
Oficial: Evandro da Cunha
Rua Pirajussara, 432 - Butantã - São Paulo - SP - Cep 05501-020 - Tel.: (11) 3819-1188
Reconheço por semelhança c/valor econ à firma de: VANDA ASUNTAN.
São Paulo, 20 de fevereiro de 2019.
Em Testemunho da verdade. Cód. [202683911555330002230]
Válido somente com selo de autenticidade. Cód 1:Total R$ 9,25
Selos: Selo(s): 1 Ato:1021102AB0258409

Claudelino da Silva Moreira
Escrevente Autorizado

"VÁLIDO SOMENTE COM O SELO DE AUTENTICIDADE SEM EMENDAS E/OU RASURAS"

Cartório 13º Subdistrito Butantã SP – Oficial de Registro Civil das Pessoas Naturais

1021AB0258409 VALOR ECONÔMICO 1 EMOLUMENTOS 1,16 / 92

PROCURAÇÃO

Por este instrumento particular de Procuração, a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei n° 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. SANDRO ROBERTO VALENTINI, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui sua bastante procuradora, a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, denominada USP, autarquia estadual de regime especial, regida por seu Estatuto, aprovado pela Resolução n.º 3.461, de 07 de outubro de 1988 e pelo Regimento Geral, aprovado pela Resolução n.º 3.745, de 19 de outubro de 1990, com sede na Rua da Reitoria, 374, São Paulo – SP, inscrita no CNPJ/MF sob n.º 63.025.530/0001-04, neste ato representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. VAHAN AGOPYAN, inscrito no CPF sob o n.º 839.536.208-000, outorgando-lhes poderes para representá-los perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço; coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, direitos do autor, de software e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições e documentos, pagar taxas, anotar transferências, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, e praticar para os fins mencionados todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil, em benefício da Outorgante, ratificando os atos já praticados, especialmente para o pedido de privilégio de invenção: "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**".

São Paulo, 15 de julho de 2020.

_____

UNESP

Prof. Dr. SANDRO ROBERTO VALENTINI

Reitor

USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo da Microbiologia, mais precisamente na área da Bacteriologia, e descreve o uso de diterpenoides *ent*-caurânicos, como a adenantina (Adn), ou seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan) e a gentamicina (Gen), e também as polimixinas, como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos. Além disso, o efeito sinérgico da utilização em conjunto dessas substâncias apresenta um elevado potencial de aplicação farmacêutica em tratamentos de diferentes infecções causadas por microrganismos, a fim de sensibilizar bactérias que apresentem resistência a esses últimos e também pode reduzir as quantidades administradas de antibióticos em pacientes reduzindo os efeitos colaterais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Antibióticos revolucionaram as medicinas humana e veterinária e são considerados um dos maiores, senão o maior, avanço médico no século XX. A era dos antibióticos normalmente remete a nomes como Paul Ehrlich, Sahachiro Hata e Alexander Fleming (Strebhardt e Ullrich, 2008). Na busca de compostos químicos que fossem eficientes no tratamento da sífilis, uma doença sexualmente transmissível cujo agente etiológico é representado pela bactéria *Treponema pallidium*, o químico Paul Ehrlich sintetizou centenas de moléculas orgânicas derivadas do arsênio, as quais foram testadas pelo bacteriologista

Sahachiro Hata e levou à descoberta da molécula 606 (Aminov, 2010; Strebhardt e Ullrich, 2008). Esta molécula se mostrou eficaz no tratamento de infecções causadas por *T. pallidium* e foi lançada no mercado pela Hoechst sob o nome Salvarsan. Entretanto, a molécula era extremamente suscetível à oxidação pelo O_2 atmosférico, exibia baixa solubilidade e diversos efeitos colaterais, incluindo erupções cutâneas, danos ao fígado, náuseas e vômitos. Posteriormente, ela foi substituída pela Neosalvarsan o qual não era suscetível à oxidação e apresentava maior solubilidade e menor toxicidade, entretanto, efeitos colaterais como náuseas e vômitos continuavam comuns (Aminov, 2010).

[003] Finalmente nos anos 1940, como consequência da segunda guerra mundial, ocorreu a colaboração entre governos de países distintos e diferentes laboratórios como Merck, Pfizer e Squibb, o que viabilizou a produção e distribuição de um novo medicamento que apresentava maior eficiência/estabilidade e reduzidos efeitos colaterais que substituiu o Neosalvarsan, a Penicilina. A penicilina é uma substância com ação bactericida produzida pelo fungo *Penicillium notatum* identificada e caracterizada por Alexander Fleming (Alexander Fleming, 1929). Esta molécula é denominada de β lactâmico em razão de possuir um anel característico que recebe este nome pela sua estrutura (Aminov, 2010; Strebhardt e Ullrich, 2008).

[004] Baseados nos trabalhos pioneiros de Paul Ehrlich, Sahachiro Hata e Alexander Fleming, pesquisadores ligados a indústrias farmacêuticas e instituições de ensino e pesquisa caracterizaram as mais diferentes classes de antibióticos com distintas ações biológicas. O período

compreendido entre os anos 1950 e 1970 foi o auge das descobertas de novas classes de antibióticos (Aminov, 2010; Strebhardt e Ullrich, 2008) (Tabela 1). Entretanto, após este período o número de novos antibióticos se tornou muito escasso e a principal abordagem para o desenvolvimento de novos medicamentos para combater a resistência emergente e re-emergente de patógenos a antibióticos tem sido, em sua grande maioria, baseada na modificação dos antibióticos existentes, inclusive por razões econômicas (Chopra, Hesse e O'Neill, 2002).

Tabela 1: Principais classes de antibióticos, exemplos, processos biológicos atingidos e ação descoberta.

Classe de antibiótico	Exemplos	Alvo Biológico	Modo de ação / Descoberta
β lactâmicos	Penicilinas (ampicilina), cefalosporina (cefamicina), penema (meropenema), monolactâmicos (aztreonam)	Biossíntese de peptoglicanos (proteínas de ligação a penicilina - PBPs)	Bacteriostático ou bactericida (dependente da concentração) / 1928
Aminoglicosídeos	Gentamicina, estreptomicina, espectinomicina	Tradução	Bacteriostático/1943
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina	Biossíntese de peptoglicanos	Bactericida/1950
Tetraciclinas	Minociclina, Tigeciclina	Tradução	Bacteriostático/1953
Macrolídeos	Eritromicina,	Tradução	Bacteriostático ou

	azitromicina		bactericida (dependente da bactéria) / 1950
Lincosamidas	Clindamicina	Tradução	Bacteriostático ou bactericida (dependente da concentração) / 1963
Estreptograminas	Synercid	Tradução	Bacteriostático/1953
Oxazolidinonas	Linezolida	Tradução	Bacteriostático/1952
Fenicóis	cloramfenicol	Tradução	Bacteriostático/1947
Quinolonas	Ciprofloxacino	Replicação do DNA (Topoisomerase)	Bactericida/1962
Pirimidinas	Trimetoprima	Metabolismo C1	Bacteriostático/1962
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Metabolismo C1	Bacteriostático/1932
Rifamicinas	Rifamicinas	Transcrição	Bactericida/1957
Lipopeptídeos	Daptomicina	Membrana celular	Bactericida/1986
Peptídeos catiônicos	Colistina	Membrana celular	Bactericida/1949

Modificado de Davies e Davies (2010).

[005] De fato, o desenvolvimento de novos antibióticos pela indústria farmacêutica, experimentou e tem experimentado um vertiginoso decréscimo devido a obstáculos econômicos e regulatórios bem como fusões empresariais que reduziram substancialmente o número de pesquisas. Das 18 maiores empresas farmacêuticas, 15 abandonaram a produção de antibióticos (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013; Piddock, 2012).

[006] Para a indústria farmacêutica os antibióticos não são mais considerados um investimento economicamente vantajoso, uma vez que, sua utilização ocorre somente por um curto período de tempo, e portanto, não são tão lucrativos como aqueles utilizados para o tratamento de doenças crônicas como

diabetes, transtornos psiquiátricos, asma, doenças cardíacas dentre outros (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013; Gould e Bal, 2013; Piddock, 2012). Uma análise custo-benefício do Escritório de Economia da Saúde (Office of health economics - OHE) da Inglaterra calculou que o valor líquido de um novo antibiótico é de apenas 50 milhões de dólares, o que é bastante inferior a medicamentos utilizados para tratamentos de cardiopatias e doenças neuromusculares que podem alcançar 1 bilhão de dólares (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013).

[007] Ainda no que concerne ao fator econômico, o valor dos antibióticos é considerado baixo pela indústria farmacêutica. O tratamento de doenças infeciosas com antibióticos mais modernos apresenta um custo variando de 1.000-3.000 dólares, enquanto quimioterápicos utilizados no tratamento de neoplasias alcançam dezenas de milhares de dólares (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013; Gould e Bal, 2013; Piddock, 2012). Agravando este cenário, as pesquisas conduzidas por grupos de instituições acadêmicas também foram substancialmente reduzidas em razão da crise econômica mundial iniciada em 2007, e, que ainda traz grandes reflexos para a sociedade como um todo (Piddock, 2012). A grande necessidade de novos antibióticos reside no aparecimento crescente de bactérias resistentes a diversos antibióticos utilizados atualmente, tópico que será abordado a seguir.

Bactérias resistentes a múltiplos antibióticos

[008] As taxas de mortalidade relacionadas às infecções bacterianas resistentes a múltiplas drogas (Multi Drug Resistance - MDR) têm se tornado cada vez mais elevadas, o que constitui um grave problema de saúde em todo o mundo. Na União Europeia (UE) a cada ano, cerca de 25.000 pacientes

morrem em decorrência de infecções ocasionadas por bactérias MDR (ECDC / EMEA Joint Working Group, 2009). Nos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 63.000 pacientes morrem anualmente como consequência de infecções hospitalares ocasionadas por bactérias MDR (Ventola, 2015). Os custos econômicos estimados na UE revelam que os gastos para o sistema de saúde, em conjunto com a perda de produtividade dos pacientes, geram um prejuízo aproximado de 1.5 bilhões de euros por ano (ECDC / EMEA Joint Working Group, 2009). Em período similar (2006), o custo anual do tratamento de infecções hospitalares nos EUA de apenas seis espécies de bactérias MDR foi estimado em aproximadamente 1.9 bilhão de dólares (Ventola, 2015).

[009] Pelos dados acima é possível perceber que a situação é altamente preocupante e, em 2013 o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dos EUA declarou que estamos na "era pós-antibiótica". Esta declaração está alinhada com a Organização Mundial da Saúde (OMS) que, em 2014, alertou que a crise de resistência aos antibióticos está se tornando alarmante uma vez que o percentual de bactérias MDR aumenta ano a ano (Michael, Dominey-Howes e Labbate, 2014; Reardon, 2015).

[010] Entre os patógenos Gram positivos, a maior ameaça para uma pandemia global é representada por bactérias como *Staphylococcus aureus* e o gênero *Enterococcus* (CDC, 2013; Rossolini, 2014). De fato, ainda na década de 1960 já foram descritos isolados de *Staphylococcus* resistentes a metaciclina, denominados de MRSA (para Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Nessa época, para o tratamento das infecções causadas por este agente etiológico, foi utilizada a vancomicina. Entretanto, duas décadas mais tarde, foram

identificadas linhagens resistentes à vancomicina e, atualmente, as MRSA representam uma grande ameaça a saúde pública mundial (Ventola, 2015). De fato, somente nos EUA, as MRSAs são responsáveis todos os anos por mais mortes do que a AIDS, doença de Parkinson, enfisema e homicídio juntos (CDC, 2013). Adicionalmente, apesar da resistência aos antibióticos anti-MRSA geralmente ocorrer através de mutações, existem estudos que demonstram a transferência de genes de resistência aos antibióticos linezolida (oxazolidinonas) e glicopeptídeos, aspecto de grande gravidade (Rossolini *et al.*, 2014).

[011] Patógenos Gram-negativos também trazem preocupação porque estão se tornando resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis (Golkar, Bagasra e Pace, 2014; Rossolini *et al.*, 2014). O surgimento de bacilos Gram-negativos MDR tem tido grande impacto na medicina, e as infecções mais graves ocorrem em ambientes hospitalares sendo as mais comuns causadas por Enterobacteriaceae (principalmente *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* (CDC, 2013; Rossolini *et al.*, 2014). Bactérias patogênicas Gram-negativas MDR como *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae* também estão se tornando cada vez mais prevalentes em ambientes hospitalares, e já foi demonstrado que diversas linhagens produzem β-lactamases capazes de inibir a ação de diversos antibióticos β-lactâmicos (Ventola, 2015).

[012] É importante deixar claro que bactérias MDR ameaçam o atendimento hospitalar tanto em países de alta renda *per capita* quanto naqueles que possuem baixa renda, afetando tanto os procedimentos terapêuticos de alta complexidade como aqueles de rotina para doenças infecciosas comuns. Uma vez que a resistência tenha se manifestado, as bactérias resistentes

podem espalhar-se nos hospitais, nas comunidades e meio ambiente. A escassez de novos antibióticos possibilita que infecções intratáveis se tornem cada vez mais comuns, o que é particularmente preocupante, pois após o aparecimento, a resistência antimicrobiana é irreversível ou caracteriza-se por uma reversão muito lenta apesar da introdução de programas de contenção e vigilância. De fato, em razão da falta de novos medicamentos e do aparecimento de linhagens multirresistentes, antibióticos que haviam sido proibidos por conta de graves efeitos colaterais, incluindo danos renais e nervosos, voltaram a ser utilizados, como a colistina, que foi banida entre os anos 1990 até meados de 2010.

Causas da Resistência e Disseminação

[013] Trabalhos recentes demonstram que um grande número de bactérias ambientais filogeneticamente distintas é capaz de utilizar antibióticos, como β lactâmicos, tetraciclinas, vancomina, dentre outros, como única fonte de carbono, o que revela um amplo reservatório de genes que codificam proteínas de resistência a antibióticos (Dantas *et al.*, 2009). Adicionalmente, existe um número crescente de evidências da transferência de genes que codificam proteínas de resistência a antibióticos para bactérias patogênicas humanas (D'Costa *et al.*, 2011; Dantas *et al.*, 2008; Forsberg *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2016).

[014] O descarte constante no meio ambiente de antibióticos, através de esgotos não tratados e que são lançados em corpos de água como rios e oceanos, representa um risco para o aparecimento de bactérias resistentes (Segura *et al.*, 2009). Atenção especial é dada às estações de tratamento de esgoto, onde ocorre grande concentração de bactérias

ambientais e oriundas do microbioma de humanos e animais em uma diminuta área, o que torna as condições particularmente adequadas para troca/alteração de material genético contendo genes de resistência e posterior propagação de bactérias (Alós, 2015; Czekalski *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2013).

[015] No que diz respeito a mutações nos genes que codificam proteínas alvo dos antibióticos, trabalhos recentes sugerem que baixas doses de antibióticos levam ao aparecimento de linhagens resistentes em razão de mutações, ponto que será discutido em maior detalhe na próxima seção. De fato, foi demonstrado o aparecimento de bactérias resistentes em concentrações de antibióticos bem abaixo da concentração mínima inibitória para crescimento, o que demonstra que o aparecimento das linhagens resistentes pode ocorrer no regime ambulatorial, onde as concentrações de antibióticos não são muito elevadas ou quando a prescrição médica não é seguida integralmente por pacientes externos aos hospitais (Gullberg *et al.*, 2011). Por estas razões, diversos países possuem a venda de antibióticos extremamente controlada. No Brasil, a restrição de venda está em vigor desde 2010 e engloba 119 antibióticos (http://www.anvisa.gov.br/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf).

[016] Outro fator bastante relevante para o aparecimento de linhagens resistentes reside na utilização de baixas concentrações de antibióticos na ração animal, prática associada com o maior ganho de peso, de modo que os antibióticos são utilizados como promotores de crescimento (em massa) para animais, contribuindo para o aparecimento de bactérias resistentes (Giguère, Prescott e Dowling, 2007). Em razão deste grande problema para a saúde pública, diversos países têm

banido a utilização de antibióticos na ração animal, como é o caso dos países constituintes da União Europeia (UE), que proibiram sua utilização em 2006. Essa proibição levou à interrupção da utilização de antibióticos para fins de ganho de peso em bovinos no Brasil, em razão do grande volume de importações para países da UE (Millen *et al.*, 2011).

[017] Por outro lado, nos EUA 13 toneladas de antibióticos foram utilizadas em animais em 2010, principalmente como promotores de crescimento (Bartlett, Gilbert e Spellberg, 2013). Apesar de restrições introduzidas em 01/2017 pelo FDA (Food and drug admnistration), diversas moléculas que possuem propriedades antibióticas (Amprolium, Bacitracina, Bambermicina, Carbadox, Decoquinato, Fenbendazole, Lasaloacid, Monensina, Melengestrol, Ractopamina e Tiamulina) ainda são permitidas para utilização no agronegócio (https://www.federalregister.gov/documents/2016/12/27/2016-31083/newanimal-drugs-for-use-in-animal-feed-approval-of-new-animal-drug-applications-withdrawal-of). É importante salientar que regulamentações não estão presentes na maioria dos países; por exemplo, a China produz aproximadamente 40 toneladas de antibióticos, dos quais 50% são utilizados na produção animal (Wang *et al.*, 2016).

[018] Outro caso emergente é representado pela aquicultura, a qual experimentou um significativo crescimento nos últimos anos. Nela, os antibióticos crescentemente utilizados como profiláticos contaminam corpos de água, o que por si só possui grande potencial para o aparecimento de linhagens resistentes a antibióticos em razão da transferência gênica, seleção e/ou mutação (Cabello, 2006; Done, Venkatesan

e Halden, 2015). Entretanto, não existe uma regulamentação clara em nenhum país que vise diminuir a utilização de antibióticos nessa área (Cabello, 2006; Done, Venkatesan e Halden, 2015).

[019] No que concerne à disseminação de linhagens resistentes a antibióticos, a globalização sem dúvida contribui de forma extremamente significativa. O maior intercâmbio entre os países por meio do comércio de animais, alimentos, bens de consumo, viagens de turismo e negócios, movimentos migratórios de fundo religioso, científico ou político (estágios no exterior, refugiados, missionários, intervenções militares), dentre outros, favorece fortemente a dispersão de bactérias super-resistentes, o que evidencia que este é um problema de dimensões globais (Alós, 2015; Kennedy e Collignon, 2010).

[020] Como pode ser observado acima, o problema com os antibióticos é mundial, bastante complexo e sua resistência engloba aspectos, genéticos, evolutivos e ambientais. De fato, outros fatores envolvendo saneamento básico, idade, nutrição, estado imunológico também influenciam na dispersão de linhagens MDR (Martínez e Baquero, 2014). Apesar de ocorrer de forma acentuada em diversos países, a ausência de um controle mais rígido para a utilização de antibióticos - seja para a saúde humana ou animal e a falta de colaboração integrada global faz com que o perigo do surgimento de bactérias MDR prospere, uma vez que em diversos países das Américas central e do sul, parte da Europa, do continente Africano e do continente Asiático, o controle dos antibióticos é bastante precário. Neste contexto, além de uma política de controle global de antibióticos é bastante importante que sejam efetuados esforços na busca de novos alvos biológicos e novas classes de antibióticos com o

objetivo de evitar epidemias ou mesmo pandemias.

A letalidade de antibióticos é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

[021] Estudos recentes e independentes indicam que diferentes classes de antibióticos, independentemente das suas interações fármaco-alvo, geram níveis variáveis de EROs que contribuem decisivamente para a morte celular dos patógenos. Os trabalhos investigaram o efeito de classes de antibióticos distintas e muito utilizadas como β-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em diversas espécies bacterianas (*Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Burkholderia cepecia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, dentre outros) (Bizzini *et al.*, 2009; Breidenstein *et al.*, 2008; Calhoun e Kwon, 2011; Davies *et al.*, 2009; Foti *et al.*, 2012; Girgis, Hottes e Tavazoie, 2009; Grant *et al.*, 2012; Gusarov *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2012; Kohanski *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010, 2012; Nguyen *et al.*, 2011; Shatalin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Yeom, Imlay e Park, 2010). Apesar de existir ainda grande debate sobre a relação de antibióticos, geração de EROs e letalidade em patógenos, trabalhos recentes utilizando as mais distintas abordagens confirmam os dados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa (Acker, Van *et al.*, 2016; Dwyer, Belenky, Yang, MacDonald, *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que o aumento intracelular dos níveis de EROs é capaz de promover eficientemente a morte de patógenos (Brynildsen *et al.*, 2013; Jee *et al.*, 2016).

[022] Neste contexto, foi demonstrado que as três

principais classes de drogas bactericidas (β-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas) utilizam um mecanismo comum que estimula a produção de doses letais de radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$) por meio de reações químicas de Fenton. De fato, a administração de quelantes de ferro (Fe) atenua a morte bacteriana por fármacos, sugerindo que os radicais hidroxila contribuem para a morte celular bacteriana por antibióticos. Dessa forma, é importante salientar que a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da dismutação efetuada pela enzima superóxido dismutase (Sod) também pode favorecer a formação $HO^{\bullet}$. Além disso, o H_2O_2 juntamente com o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet}$) também é capaz de produzir $HO^{\bullet}$ por meio da reação de Harber-Weiss (Figura 1). Ponto de importância reside no fato que, apesar dos diferentes fármacos bactericidas (β-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas) terem diferentes alvos biológicos (proteínas de ligação à penicilina, ribossomo e topoisomerase, respectivamente), todos eles convergem em uma via comum.

[023] Essa via é baseada na produção de oxidantes através de resposta metabólica envolvendo o ciclo do ácido tricarboxílico (Tricarboxylic Acid Cycle – TCA) que induz a rápida depleção de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH), resultando em uma hiperativação da cadeia de transporte de elétrons que aumenta a produção de produtos secundários como o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 (Kohanski, DePristo e Collins, 2010). O $O_2^{\bullet-}$ pode atacar grupamentos ferro-enxofre (Fe-S) presentes em diversas proteínas que executam funções variadas, desde transporte de elétrons à catálise enzimática e regulação gênica. Neste contexto, em especial o $O_2^{\bullet-}$ pode levar à disponibilização de Fe ferroso dos grupos Fe-S que participa da reação de Fenton,

resultando em formação de HO• que auxilia na morte celular (Figura 2) (Kohanski, DePristo e Collins, 2010).

[024] O H_2O_2 também é capaz de danificar grupos Fe-S (Imlay, 2008; Jang e Imlay, 2010), o que deve maximizar este processo e levar a mais danos celulares. A importância do H_2O_2 e do Fe^{2+} (férrico) é ressaltada pela existência de proteínas denominadas de Dps (DNA-binding protein from starved cells) que pertencem à família das ferritinas. Este grupo de proteínas é capaz de se ligar ao DNA bacteriano e sequestrar o Fe^{2+}, o que evita sua reação com H_2O_2 (reação de Fenton 1) e protege fisicamente o DNA (Haikarainen e Papageorgiou, 2010; Wolf *et al.*, 1999). De fato, bactérias *Δdps* (bactérias com o gene *dps* deletado) são altamente suscetíveis à morte por H_2O_2 e possuem sua virulência atenuada em macrófagos e camundongos (Halsey *et al.*, 2004; Velayudhan *et al.*, 2007).

[025] Outro ponto de grande importância dos trabalhos acima mencionados é demonstrar que, apesar de possuírem alvos biológicos distintos, os antibióticos atuam gerando EROs que possuem capacidade de danificar o DNA. Portanto, é importante perceber a relação observada previamente entre baixas doses de antibióticos e o aparecimento de bactérias resistentes (Giguère, Prescott e Dowling, 2007). Concluindo, altas concentrações ou concentrações apropriadas de antibióticos levam a sérios danos em biomoléculas em especial no DNA impossibilitando a sobrevivência do patógeno. No lado oposto, baixas concentrações de antibióticos podem produzir mutações no DNA acelerando as taxas de evolução, o que deve contribuir para o aparecimento de linhagens resistentes.

Defesas oxidativas do organismo na infecção por patógenos

[026] Quando um patógeno invade um hospedeiro ocorre

um dos mecanismos de defesa mais estudados, denominado de explosão respiratória (*respiratory burst*), o qual se caracteriza pela geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN). A geração das EROs é devido à ativação de uma oxidase multicomponente (NADPH oxidase, também denominada de fagócito oxidase), que oxida o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) e, no processo, reduz o oxigênio a $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell e Gutteridge, 2015). Em neutrófilos, essa rápida reação oxidativa é disparada pelos sinais de ativação e acompanha a fagocitose (Babior, 2004). Quando o radical $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação, produz H_2O_2, uma molécula altamente difusível no organismo capaz de desencadear mecanismos potencialmente tóxicos para as células (Gordon, 2016; Halliwell e Gutteridge, 2015; Underhill e Ozinsky, 2002). O H_2O_2, por si só, não é capaz de destruir eficientemente o patógeno. Entretanto, grânulos azurófilos dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que catalisa a reação entre o H_2O_2 e íons haletos (Cl^-), produzindo ácido hipocloroso (HOCl), um potente agente microbicida (Klebanoff, 2005; Winterbourn e Kettle, 2013). Adicionalmente, conforme já mencionado, o H_2O_2 também é convertido $HO^\bullet$, por meio de reações químicas como as de Fenton e de Haber-Weiss, outro agente destrutivo muito potente podendo atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015).

[027] Outra forma de eliminar os organismos invasores é através da produção do radical óxido nítrico ($NO^\bullet$). O $NO^\bullet$ é gerado quando ocorre a oxidação da arginina na presença da molécula de oxigênio, sendo esta reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Fritzsche, Schleicher e Bogdan,

2010; Prolo, Alvarez e Radi, 2013). Elevadas concentrações de $NO^{\bullet}$ podem originar uma série de compostos reativos, as ERNs. Por exemplo, a reação $NO^{\bullet}$ com o radical ânion superóxido promove a liberação de peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), um potente agente oxidante cujos derivados são capazes de causar danos ao DNA e oxidação lipídica (Calcerrada, Peluffo e Radi, 2011; Niles, Wishnok e Tannenbaum, 2006).

[028] Diante da exposição às diversas fontes de espécies reativas, os hospedeiros possuem mecanismos de defesa para evitar danos maiores provocados por estas substâncias produzidas endogenamente durante a interação hospedeiro-patógeno. Os patógenos, da mesma maneira, para se defenderem dos efeitos tóxicos destas espécies reativas, dispõem de enzimas antioxidantes capazes de ajudá-los a superar a barreira oxidante imposta pelo hospedeiro, possibilitando assim a infecção.

Proteínas antioxidantes na defesa de patógenos

[029] Para se defenderem das diferentes fontes de estresse oxidativo, os patógenos possuem diversas enzimas capazes de metabolizar as EROs e ERNs em produtos menos tóxicos ou atóxicos. Entre as mais importantes enzimas estão as superóxido dismutases (Sod) e as peroxidases como as catalases (Cat) e as peroxirredoxinas (Prx). As Sod são enzimas capazes aumentar a velocidade de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 de $\sim10^5\ M^{-1}s^{-1}$ (pH7) para $\sim10^9\ M^{-1}s^{-1}$ (Halliwell e Gutteridge, 2015). Por sua vez, a Cat converte o H_2O_2 em H_2O em taxas de $\sim10^6\ M^{-1}s^{-1}$ e as Prx são capazes de fazer esta conversão em taxas que alcançam até $\sim10^7\ M^{-1}s^{-1}$. A importância destas enzimas pode ser medida pelo grande número de isoformas em bactérias patogênicas. Como exemplo, em *Salmonella entérica* são encontradas quatro

isoformas de Sod (SodA, SodB, SodC1 e SodC2), três de Cat (KatE, KatG e KatN) e três de Prx (AhpC, TsaA e Tpx) (Ammendola *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 1999). Redundância similar é encontrada em outras bactérias o que revela a importância das enzimas antioxidantes (Bansal *et al.*, 2012; Mishra e Imlay, 2012).

[030] Ponto importante reside no fato que a Sod pode impedir a formação de peroxinitrito e, consequentemente de seus derivados, pela decomposição do $O_2^{\bullet-}$ impedindo que ele reaja com o $NO^{\bullet}$. Adicionalmente, tanto a Sod quantos as peroxidases (Cat e Prx) são fundamentais para impedir a formação do $HO^{\bullet}$ que pode ocorrer diretamente pela reação de Harber Weiss entre H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ ou mediado pelo Fe nas reações de Fenton (Figura 1). A redundância de enzimas antioxidantes é somente aparente, pois várias diferem quanto ao substrato, cofatores, regulação gênica, estabilidade dentre outros aspectos. Adicionalmente, mutantes sem enzimas antioxidantes individuais apresentam susceptibilidade aumentada de EROs (Mishra e Imlay, 2012).

[031] Diversos trabalhos revelam que o bloqueio de enzimas antioxidantes por agentes químicos é capaz de acentuar a morte celular dos patógenos quando submetidos a estresse oxidativo ou tratamento com antibióticos e, dessa forma, uma alternativa lógica seria a utilização destes inibidores de enzimas antioxidantes em terapias antimicrobianas (Birben *et al.*, 2012). No entanto, os hospedeiros, e aí se incluem os humanos, possuem enzimas extremamente semelhantes as dos patógenos, principalmente quando se trata da Sod e Cat e os inibidores acabam por ser tóxicos também às células dos hospedeiros (Benov e Fridovich, 1994; Heikkila e Cohen, 1977; Lu *et al.*, 1998; Misra e Fridovich, 1978; Roberts e Hirst,

1996; Sugadev, Ponnuswamy e Sekar, 2011). Neste contexto um importante alvo seria as Prx, uma vez que diversas destas enzimas possuem características distintas entre procariotos e eucariotos.

Peroxirredoxinas e sua importância em bactérias patogênicas

[032] As Prx foram a última grande família de peroxidases a ser descoberta. Diferentemente da Sod e Cat, estas enzimas não possuem grupos prostéticos e utilizam uma cisteína (cisteína peroxidásica, C_P) altamente reativa para decompor hidroperóxidos (Kim *et al.*, 1988; Netto *et al.*, 1996). Adicionalmente, quando se analisa as estruturas quaternárias destas enzimas, observa-se que a C_P se encontra em grande proximidade com uma Thr (ou Ser, em alguns casos) e com uma arginina (Arg), a qual é totalmente conservada em todas as Prx já descritas até o momento. Estes três resíduos de aminoácidos (C_P, Thr/Ser e Arg) formam a tríade catalítica, e a desprotonação e a manutenção de C_P na forma de tiolato são altamente dependentes da integridade de Thr/Ser e Arg (Tairum *et al.*, 2016).

[033] Apesar de todas as Prx possuírem a C_P, elas constituem uma família de enzimas bastante heterogênea e diversas classificações já foram propostas, sendo que a mais utilizada subdivide essas proteínas em três grandes grupos (Prx 1-Cys, Prx 2-Cys típicas e Prx 2-Cys atípicas) de acordo com a quantidade de resíduos de cisteína envolvidos no processo de redução do hidroperóxido (Wood *et al.*, 2003). As Prx 1-Cys são proteínas homodiméricas que apresentam apenas um resíduo de cisteína (C_P) envolvido no ciclo catalítico localizado na região N-terminal. Já as Prx 2-Cys utilizam dois resíduos de

cisteína no ciclo catalítico, um na região N-terminal (C_P) e outro na C-terminal, este último denominado de cisteína de resolução (C_R). Durante o ciclo catalítico forma-se um dissulfeto C_P - C_R, sendo que as Prx 2-Cys típicas apresentam-se em homodímeros e formam uma ligação dissulfeto intermolecular, e as Prx 2-Cys atípicas apresentam-se como monômeros ou homodímeros e formam uma ponte dissulfeto intramolecular (Wood, Poole e Karplus, 2003). Após sua oxidação, as Prx são geralmente reduzidas pelo sistema Trx, composto pelas enzimas tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR), que utiliza elétrons provenientes do NADPH via uma molécula de FAD (flavina adenina dinucleotídeo). A redução pelo sistema Trx restaura a atividade peroxidásica das Prx, tornando-as aptas à decomposição de uma nova molécula de hidroperóxido. Neste contexto, a partir deste ponto iremos nos referir somente as Prx 2-Cys típicas que são alvo desta solicitação.

[034] Enquanto a Cat é capaz de decompor somente H_2O_2 com constante de 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, as Prx 2-Cys apresentam constantes de 10^{7-8} $M^{-1}s^{-1}$. Em contraste com Cat que responde somente pela decomposição de H_2O_2, as Prx são capazes de decompor uma grande variedade de hidroperóxidos, dentre eles hidroperóxidos de lipídeos (Lp-OOH) e peroxinitrito (NOO^-), com constantes de segunda ordem de 10^{7-8} $M^{-1}s^{-1}$ (Ogusucu *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 2015; Tairum *et al.*, 2016). Também foi demonstrado que as Prx 2-Cys típicas são capazes de decompor até mesmo peróxidos de proteínas e aminoácidos com eficiência moderada (10^4 M^{-1} s^{-1}), o que revela sua grande versatilidade na decomposição de hidroperóxidos (Peskin *et al.*, 2010).

[035] Adicionalmente, estas proteínas estão entre as

mais abundantes em bactérias. Como exemplo, em *Escherichia coli* as Prx estão entre as dez proteínas mais expressas (Link, Robison e Church, 1997). Em bactérias, as 2-Cys Prx típicas, são normalmente denominadas de AhpC (Alquil hidroperóxido redutase C). Assim como as Prx de eucariotos, as enzimas bacterianas são capazes de decompor com taxas extremamente elevadas tanto H_2O_2 quanto peróxidos de lipídeos. Já foi demonstrado que linhagens de *Helicobacter pylori* e *Helicobacter hepaticus,* agentes causadores de úlceras/gastrites estomacais e de hepatite crônica em mamíferos, respectivamente, apresentam níveis elevados de peróxidos de lipídeos quando o gene *ahpc* é deletado (Mehta *et al.*, 2007). Resultados similares foram descritos para *Campylobacter jejuni*, o agente etiológico de gastroenterites (Oh e Jeon, 2014).

[036] Em *Salmonella typhimurium*, patógeno responsável por moléstias gastrointestinais, febre tifoide e septicemia, foi demonstrado que linhagens deficientes de Prx apresentam alteração da morfologia celular e proliferação reduzida no interior da célula. O estudo também revelou que quando uma AhpC é superexpressa em células de *S. typhimurium* nocautedas para genes envolvidos na decomposição de peróxidos (*ΔKatE, ΔKatG, ΔKatN, ΔAhpC* e *ΔTSA A*), o patógeno recupera as características da linhagem selvagem (Hébrard *et al.*, 2009). Estes dados indicam que as Prx de *Salmonella* contribuem para a virulência do patógeno ao capacitá-lo a sobreviver em ambientes hostis.

[037] Em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, a expressão de AhpC em isolados clínicos com a deleção de uma das isoformas de Cat (*ΔkatG*) é aumentada tanto no meio intracelular quanto no extracelular, o que aparentemente é de importância para a manutenção da

virulência de *M. tuberculosis* (Nieto R *et al.*, 2016). No caso de *S. aureus*, o agente etiológico de diversas infecções hospitalares, AhpC juntamente com a catalase possuem papéis compensatórios e são fundamentais para a sobrevivência e colonização do trato respiratório (Cosgrove *et al.*, 2007). Estudos envolvendo metatranscriptoma de *S. aureus* e *S. epidermidis* revelaram que *ahpc* é altamente expresso no trato respiratório, sendo ao menos três vezes maior no ambiente *in vivo* quando comparado com os microrganismos crescidos em meio de cultura (*in vitro*) (~1320 *reads per million* × ~540 rpm) (Chaves-Moreno *et al.*, 2016).

[038] Insultos oxidativos revelam que antioxidantes bacterianos desempenham um papel na proteção de microorganismos (Melillo, Bakshi e Melendez, 2010), não somente atuando na decomposição das EROs como também são capazes de subverter vias de sinalização como os envolvidos na resposta imunológica (Baxt, Garza-Mayers e Goldberg, 2013). Neste contexto, é fundamental explorar novos paradigmas para desenvolver novos fármacos antibacterianos, e aí se incluem as 2-Cys Prx de bactérias patogênicas (Baxt, Garza-Mayers e Goldberg, 2013; Melillo, Bakshi e Melendez, 2010).

Inibição de Prx2-Cys típicas por Adenantina (Adn) e efeito em células tumorais

[039] Os compostos extraídos de plantas despertam um interesse especial da indústria farmacêutica em função de sua potencialidade para o desenvolvimento de novas drogas. Entre esses compostos naturais encontram-se os diterpenoides, uma ampla classe de metabólitos secundários com significativa atividade biológica que vem sendo investigada quanto à sua eficácia no tratamento de diversas doenças como câncer, doenças

cardiovasculares e inflamatórias (Tirapelli *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrado que a adenantina (Adn), um diterpenoide da classe dos *ent*-caurânicos, extraído de *Isodon adenantha*, possui propriedades antitumorais (Liu *et al.*, 2012, 2013). Os autores observaram que a Adn possui a capacidade de induzir a diferenciação de células de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), a forma de leucemia aguda mais comum entre adultos (Liu *et al.*, 2012). Na LMA ocorre um bloqueio da diferenciação de células sanguíneas em estágios específicos de maturação, impedindo a especialização celular e levando a proliferação descontrolada de células leucêmicas. Acredita-se que essa diferenciação seja mediada por hidroperóxidos, em especial o H_2O_2, através da oxidação de MAP quinases como ERK1 e ERK2 que estão envolvidas na diferenciação de células hematopoiéticas e, portanto, sujeitas a regulação por peroxidases (Cassinat *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2000).

[040] Através de análises bioquímicas e de biologia molecular foi demonstrado que os alvos biológicos da Adn eram as isoformas citosólicas de 2-Cys Prx típicas: Prx1 e Prx2. Também foi demonstrado que a ligação da Adn ocorria especificamente com o Sγ de resíduos de cisteína, onde esta atuaria como um aceptor de Michael em uma reação de adição entre o C17 da Adn com cisteínas das 2-Cys Prx típicas Prx1 e Prx2 de células de LMA, originando um aduto e inibindo a atividade peroxidásica dessas enzimas (Liu *et al.*, 2012).

[041] Assim, foi proposto um modelo de ligação onde a Adn interagiria com outros aminoácidos na região do sítio ativo, incluindo os resíduos da tríade catalítica por meio de uma interação hidrofóbica com a Thr49 e uma interação polar com a Arg128, ambos pertencentes à tríade catalítica.

Consequentemente, ocorreria a inibição da atividade peroxidásica dessas proteínas, permitindo então o acúmulo de H_2O_2 intracelular (Liu *et al.*, 2012, 2013).

[042] Posteriormente, Hou e colaboradores observaram que a inibição de Prx1 e Prx2 por Adn foi capaz de induzir a morte de células de hepatocarcinoma (CHC) com mais eficiência do que em células normais imortalizadas, além de inibir significantemente o crescimento de tumores xenográficos sem efeitos tóxicos significativos (Hou *et al.*, 2014). Foi observado pelos autores que células tratadas com adenantina tiveram seus níveis de hidroperóxidos aumentados de duas a três vezes em relação às células que não receberam o tratamento, o que possibilitaria a utilização destes compostos em processos de morte celular induzida por hidroperóxidos e espécies geradas através de reações como a de Fenton e Harber-Weiss, sendo portanto, um potencial agente terapêutico para pacientes com hepatocarcinoma (Hou *et al.*, 2014). Recentemente, foi demonstrado que a administração de Adn juntamente com o antitumoral VD3 (1,25-dihydroxyvitamin D3) é capaz de aumentar significativamente a diferenciação e atividade apoptótica em células de leucemia promilelocítica aguda (APL) (Wei *et al.*, 2016).

[043] Em razão da promissora utilização da Adn como inibidor de Prx para o tratamento de neoplasias em 2011 foi solicitada a patente para o tratamento de neoplasias (CN103045715A). Também existe patente prévia (2010) para a utilização de Adn para o tratamento de esclerose múltipla em humano (CN102462677A). Entretanto, não existe até o presente momento solicitação de patente para o tratamento de doenças infecciosas incluindo aquelas causadas por bactérias. Neste

contexto, diferenças entre as 2-Cys Prx típicas de eucariotos e AhpCs de procariotos podem significar importantes características para serem exploradas na utilização de fármacos que sejam capazes de inibir essas proteínas em bactérias, potencializando o estresse oxidativo promovido pela administração de antibióticos, mas que tenham pouco ou nenhum efeito sobre as proteínas dos hospedeiros.

ESTADO DA TÉCNICA

[044] O documento CN103045715A refere-se ao conhecido uso da substância Adenantina para o tratamento de leucemia pela inibição da atividade enzimática de enzimas antioxidantes resultando no efeito da diferenciação celular nas células de leucemia. O documento ainda revela que a Adenantina é segura, não tóxica e é um forte composto em atividade farmacológica. Conforme observado, tal documento cita a utilização de adenantina (Adn) como inibidor de peroxirredoxinas de humanos e também relata que é uma molécula segura para utilização como fármaco no tratamento de leucemia. De fato, tal molécula é considerada segura desde os estudos pioneiros em células humanas (Liu et al., 2012. Nat. Chem. Biol. 2012. 5:486-93) e, posteriormente, em mamíferos contendo tumores xenográficos (Hou, JK et al. 2014. Cell Death & Disease, 5, e1400) e esse é um fator bastante favorável para a utilização do composto em terapias médicas. Entretanto, é importante ressaltar que tal documento foca em uma doença genética e não uma doença infecciosa, como as ocasionadas por bactérias patogênicas, e também não prevê sua utilização em conjunto com antibacterianos. De fato, a presente invenção demonstra que as doses utilizadas para inibir isoformas bacterianas são menores que as de enzimas humanas, o que pode estar relacionado a

diferenças estruturais existentes entre enzimas de eucariotos (e.g. mamíferos) e procariotos (bactérias) (Wood et al. 2003. Science, 300:650-3).

[045] O documento CN102462677A refere-se ao diterpenoide Adenantina, discorrendo sobre sua atividade farmacológica, toxicidade e segurança. Adicionalmente refere-se ao uso como aditivo em uma nova formulação medicamentosa como inibidor de NF-kB para o tratamento de Esclerose Múltipla. Entretanto, tal documento não apresenta conflito com a presente invenção por ser direcionado ao tratamento de doença genética (esclerose múltipla) e propõe sua utilização com outros agentes já utilizados no tratamento (glicocorticoides, imunoglobulinas, interferon, ciclofosfamida, dentre outros). Novamente se trata de uma doença genética, muito distinta de doenças causadas por agentes infeciosos, e, em nenhum momento, é proposto a utilização de Adenantina em conjunto com antibióticos, como na presente invenção.

[046] O documento CN108721275A refere-se ao uso da Adenantina em conjunto com Andrografolida. Quando administrados em conjunto possuem ação sinérgica contra a atividade proliferativa de células cancerígenas. Adicionalmente, é revelado que Andrografolida possui atividades antimicrobianas. Ainda, é informado que, em conjunto, permitem redução da dose administrada, proporcionando menos efeitos adversos e colaterais. Conforme observado, no documento é citado que a Andrografolida possui atividade antimicrobiana, e existem estudos publicados de sua utilização para esta finalidade Zhang et al., 2019. Biomed Pharmacother. 117:109065; Banerjee et al., 2017. Acta Trop. 176:58-67). A atividade antimicrobiana discutida é para o outro

composto (Andrografolida). Novamente, é importante ressaltar que, a utilização da Adenantina em conjunto com a Andrografolida é proposta para tratamento de doença genética e não infecciosa, como proposto na presente invenção.

[047] O documento em nome de Chuan-Xu Liu *et al.*, intitulado "ADENANTHIN TARGETS PEROXIREDOXIN I AND II TO INDUCE DIFFERENTIATION OF LEUKEMIC CELLS" relata e reforça que a adenantina induz a diferenciação de células APL sensíveis ao ácido trans-retinoico (ATRA) e resistentes a ATRA, visando diretamente o CR de Prx I e Prx II, juntamente com a inibição de suas atividades antioxidantes. Entretanto, tal documento não apresenta conflito com a presente invenção por propor a utilização da Adenantina para doença genética e não infecciosa, como na presente invenção.

[048] O documento em nome de Marta Siernicka *et al.*, intitulado "ADENANTHIN, A NEW INHIBITOR OF THIOL-DEPENDENT ANTIOXIDANT ENZYMES, IMPAIRS THE EFFECTOR FUNCTIONS OF HUMAN NATURAL KILLER CELLS", também evidencia a capacidade que Adenantina possui de inibir enzimas antioxidantes. Adicionalmente, descreve que tais ações são mediadas pela regulação de ligações dissulfeto intra ou intermolecular. Tal documento foca novamente em enzimas humanas de células NK (Natural Killers) e como mencionado, a Adenantina interfere na regulação de ligações dissulfeto com o sistema redutor representado pelas enzimas Trx e TrxR. Entretanto, existem diferenças fundamentais entre enzimas do sistema redutor de bactérias e humanos; como exemplo, a enzima TrxR de mamíferos não utiliza cisteína, mas sim selenocisteína para as atividades enzimáticas (Oliveira et al., 2010. Biochemistry, 15:3317-26), um aminoácido muito mais reativo e presente quase que

exclusivamente em organismos com células nucleadas. Aqui ressalta-se que além de diferenças entre sistema redutor, existem diferenças fundamentais entre enzimas de bactérias e humanos, como apontado no esclarecimento ao documento 1 (Wood et al. 2003. Science, 300:650-3), o que não torna óbvio que um composto utilizado para enzimas humanas seja ativo para bactérias. De fato, foi demonstrado na presente invenção que a inibição por Adn é extremamente mais eficaz para peroxirredoxinas bacterianas quando comparadas com as humanas.

[049] Assim, conforme observado, não há no estado da técnica documentos que pudessem prever o sinergismo entre a Adenantina e o Aminoglicosídeo Canamicina, conforme sugerido pela presente invenção. Adicionalmente, a presente invenção mostra-se bastante promissora, visto que: 1) As enzimas bacterianas apresentam diferenças significativas estruturais e funcionais com as de mamíferos, o que a princípio pode explicar uma inibição acentuada das enzimas bacterianas; 2) Os compostos (Adenantina e amioglicosídeos) que são alvo da presente invenção são considerados seguros pela comunidade científica internacional; 3) Infecções hospitalares ocasionadas por bactérias super-resistentes sendo muitas delas Gram+ levam a um elevado número de comorbidades, óbitos, despesas hospitalares e reflexos de grande monta financeira, uma vez que, somente nos EUA e Europa ocidental são gastos bilhões de dólares anuais em decorrência de infecções de origem bacterianas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[050] Para obter uma total e completa visualização do objetivo desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme segue.

[051] A Figura 1 apresenta as reações de Fenton (A) e Haber-Weiss (B), onde em (A) a interação entre uma molécula de Fe^{3+} com uma de ânion superóxido resulta na liberação de Fe^{2+} que, ao reagir com peróxido de hidrogênio, produz o radical hidroxila; enquanto que em (B), a hidroxila é originada a partir da reação entre peróxido de hidrogênio e ânion superóxido.

[052] A Figura 2 apresenta o mecanismo comum de morte celular induzida por antibióticos, onde em (1) as interações primárias fármaco-alvo biológico (aminoglicosídeos com ribossomos, quinolonas com topoisomerase e β-lactâmicos com proteínas ligadas à penicilina (PBPs) da parede celular) estimulam a oxidação do NADH através da cadeia transportadora de elétrons, que é dependente do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA); em (2) a hiperativação da cadeia transportadora de elétrons estimula a formação do radical ânion superóxido (O_2^-), o qual danifica grupamentos Fe-S (3), tornando o ferro ferroso disponível para oxidação pela reação de Fenton (4), que produz radical hidroxila (OH^-), danificando DNA, lipídios e proteínas (5), o que contribui para a morte celular induzida por antibióticos. Figura modificada de Kohanski et al. (2010).

[053] A Figura 3 mostra as diferenças que a porção C-terminal, presente somente em proteínas de eucariotos como o homem, alteram o microambiente do sítio ativo em torno da cisteína catalítica. A Superfície molecular de decâmeros de 2-Cys Prx típicas de eucarioto e procarioto são representados por (A) e (B), respectivamente. As estruturas estão coloridas em cinza, os aminoácidos da tríade catalítica estão coloridos em laranja (C_P), azul (Arg) e vermelho (Thr/Ser) e a cauda C-terminal presente somente em eucariotos, em verde escuro.

[054] A Figura 4 mostra graficamente a inibição da formação de dissulfeto intermolecular e da atividade peroxidásica de EcAhpC e SaAhpC por Adn. As proteínas EcAhpC **(A)** e SaAhpC **(B)** foram reduzidas com 5mM de DTT por 1 hora (*lane* 1) e, em seguida, dessalinizadas para a remoção do excesso de redutor (*lane* 2). Alíquotas contendo 10µM das enzimas reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variadas de Adn (0.5, 1, 2.5, 5 e 10 equivalentes molares - *lanes* 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente) por 1 hora e posteriormente oxidadas com 5 equivalentes molares de H_2O_2 por 30 minutos. As reações foram paralisadas com a adição de *stop buffer* (Tris 50mM pH 6,8, NEM 50mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1%) e analisadas em SDS-PAGE não redutor corado com *coomassie blue*. A *lane* 3 representa a proteína reduzida/dessalinizada e posteriormente oxidada, sem tratamento com Adn. Os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes. Inibição da atividade peroxidásica de EcAhpC e SaAhpC por Adn. EcAhpC **(C)** e SaAhpC **(D)** reduzidas e dessalinizadas foram tratadas com concentrações variáveis de Adn (0.5 -■, 1 - ▲e 2.5 - ▼equivalentes molares) por 1 hora em temperatura ambiente e, posteriormente, dessalinizadas novamente. A seguir, 3µM das proteínas tratadas foram adicionadas a reações contendo EcTrx 6µM, EcTrxR 0,9µM, NADPH 150µM, HEPES 50mM pH 7,0, DTPA 100µM e azida sódica 1mM. As reações foram incubadas a 37°C por 3 minutos antes de serem iniciadas pela adição de H_2O_2 500µM e monitoradas espectrofotometricamente a 340nm, 37°C, por 5 minutos. Como controle positivo foram utilizadas reações em que as proteínas não foram previamente tratadas com Adn (●) e, como controle

negativo, foram utilizadas reações sem a adição de AhpC(⧫). As velocidades iniciais de cada reação foram calculadas, transformadas em valores de porcentagem e plotadas para o cálculo dos valores de IC_{50} de Adn para EcAhpC **(E)** e SaAhpC **(F)**. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

[055] A Figura 5 mostra imagens da avaliação da inibição do crescimento de bactérias Gram + (*B. subtilis, S. aureus* e *S. epidermidis*) e avaliação da atividade bactericida/bacteriostática de Adn. **(A)** Viabilidade celular de *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium* após tratamento com Adn. As células de *B. subtilis* F41923-PY79 (⬣), *S. aureus* ATCC 25923 (■), *S. epidermidis* ATCC 12228 (▲), *E. coli* ATCC 35218 (▼), *P. aeruginosa* ATCC29853 (◆) e *S. typhimurium* ATCC 700720 (●), em concentração de 10^5 UFC, foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo concentrações crescentes de Adn e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Células de *S.aureus* **(B)** e *S. epidermidis* **(C)** foram incubadas em meio de cultura LB sem Adn (figuras à esquerda) ou contendo Adn 750µM (figuras à direira) por 24 horas a 37°C. A seguir, as células não tratadas foram diluídas 10.000 e 100.000 vezes e inoculadas em meio de cultura LB-ágar, sem Adn. As células tratadas foram inoculadas no mesmo meio de cultura sem diluição ou diluídas 100 vezes. Após 16 horas de incubação a 37°C, foi possível observar que as células que não receberam o tratamento com Adn foram capazes de formar colônias abundantes (figuras à esquerda), enquanto as células tratadas com Adn apresentaram formação de colônias reduzida (figuras à direita). Este ensaio foi realizado em duplicata.

[056] A Figura 6 mostra graficamente o teste de toxicidade de canamicina em combinação com adenantina sobre células de bactérias patogênicas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. *S. aureus* e *S. epidermidis* foram cultivadas por 6 horas em meio LB e, posteriormente, diluídas no mesmo meio de cultura até OD_{600}=0.01. As células foram então tratadas com 1,5 µg/ml de canamicina (Kan) e 200µM adenantina (Adn) separadamente (colunas 2 e 3), ou simultaneamente (coluna 4) por 24 horas, a 37°C e sem agitação. Após o período de incubação, a densidade celular foi quantificada por espectrofotometria a 600nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

[057] A Figura 7 mostra graficamente a avaliação da toxicidade de gentamicina associada a Adn sobre *S. aureus*. Células de *S. aureus* (ATCC 25923) em concentração de 10^5 UFC foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo apenas gentamicina 50ng/ml, ou associada Adn (60µM) e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

[058] A Figura 8 mostra graficamente a avaliação da toxicidade de polimixina B (PMNB) associada à adenantina (Adn) sobre células da bactéria Gram- *E. coli*. Células de *E. coli* (ATCC25922) em concentração de 10^5 UFCs foram inoculadas em meio Mueller Hinton contendo apenas PMNB (0,2µg/ml em **A**; 0,3 µg/ml em **B**), apenas Adn 200µM ou a associação dessas duas moléculas e incubadas por 24 horas, a 37°C, sendo então quantificadas espectrofotometricamente a 600nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e com repetições independentes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[059] A presente invenção refere-se ao uso de diterpenoides *ent*-caurânicos, como a adenantina (Adn), seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan), como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos.

[060] A adenantina (Adn) extraída de *Isodon adenanthus*, também conhecida como *Rabdosia adenantha* (Cat. No: CFN99215) oriundo da flora da China, que possui a propriedade antitumoral através da inibição de peroxirredoxinas 2-Cys típicas de humanos. Uma vez que, existem diferenças significativas no ambiente de ligação de substratos (sítios ativos) entre 2-Cys Prx típicas de eucariotos e procariotos (Figura 3), avaliamos a capacidade inibitória sobre enzimas 2-Cys Prx (AhpC) de bactérias Gram- e Gram+. Através de dois ensaios enzimáticos distintos (oxidação DTT – Tabela 2; oxidação de NADPH - Figura 4) foi demonstrado que Adn é capaz de inibir de forma acentuada as enzimas de ambas as classes bacterianas. Também demonstramos que Adn é capaz de aniquilar linhagens de bactérias patogênicas Gram+ de forma isolada (Figura 5) e de Gram + e Gram-, potencializando a ação de antibacterianos conhecidos (Figuras 6,7 e 8). De forma clara, foi demonstramos que a Adn é capaz de inibir de forma mais eficiente as 2-Cys Prx bacterianas, quando comprado com as de humanos, e potencializar a ação de antibacterianos de forma acentuada. A descrição detalhada da invenção é apresentada a seguir.

Diferenças entre 2-Cys Prx de eucariotos e procariotos

[061] Uma diferença marcante entre as 2-Cys Prx típicas de procariotos e eucariotos reside na existência de um

prolongamento C-terminal que insere uma α hélice nas enzimas de eucariotos que se projeta para o interior do sítio ativo alterando de forma substancial o microambiente catalítico (Figura 3A e 3B). Já foi postulado que a ausência dessa região está relacionada com uma maior resistência de 2-Cys Prx típicas à inativação por altas doses de hidroperóxidos, enquanto que, nas representantes de eucariotos este prolongamento favorece a superoxidação de C_P da enzima em C_P-SO_2H, impedindo a formação de dissulfeto e levando à sua inativação (Wood, Poole e Karplus, 2003). Esta diferença parece bastante relevante, uma vez que para patógenos é importante possuir uma enzima altamente resistente à inativação por superoxidação para garantir a sua sobrevivência no hospedeiro.

[062] Na presente invenção, explorou-se se Adn é capaz de inibir de forma eficiente e diferencial as 2-Cys Prx bacterianas (AhpCs). Para tanto, foram testadas individualmente por meio do ensaio de oxidação do DTT, um ensaio pouco rápido e simples para avaliar a atividade de peroxirredoxinas. Como alvos de inibição foram utilizadas as 2-Cys Prx bacterianas, denominadas de AhpC, das seguintes bactérias de linhagens patogênicas Gram-: *Eschericchia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29853)e *Salmonella typhimurium* (ATCC 700720); ou Gram+: *Bacillus subtilis* (F41923-PY79), *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. epidermidis* (ATCC 12228). Os resultados demonstraram que Adn é capaz de inibir, eficientemente, com taxas de inibição da velocidade inicial (v0) da reação de ~ 40-80% (Tabela 2).

Tabela 2: Velocidade inicial (v0) de enzimas AhpCs de espécies de bactérias Gram- (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*) e Gram+ (*B. subtilis, Staphylococcus aureus* e

Staphylococcus epidermidis) tratadas (Adn+) ou não (Adn-) com Adenantina.

	Velocidade inicial (v0) de reação (µM/s)	
	Adn-	**Adn+**
EcAhpC	10.53 (±0.75)	6.69 (±0.13)
PaAhpC	9.36 (±0.13)	6.52 (±1.67)
StAhpC	8.03 (±0.83)	6.77 (±0.61)
BsAhpC	19.49 (±0.06)	3.21 (±0.06)
SaAhpC	12.04 (±0.73)	4.84 (±1.62)
SeAhpC	15.88 (±0.78)	5.14 (±0.14)

O inibidor Adn é capaz de inibir a atividade de AhpCs ao se ligar a cisteínas e apresenta alta atividade inibitória

[063] Uma vez que a ligação de Adn ao sítio ativo das Prx impede a formação do dissulfeto intermolecular, o sucesso desse tratamento pode ser observado através de SDS-PAGE não redutor. Dessa forma, a porção de proteína que não estiver ligada a Adn apresenta sua forma oligomérica usual, caracterizada por dímeros unidos por dissulfeto (~44 kDa), enquanto a porção de proteína ligada a Adn será visualizada no gel como monômeros (~22kDa), devido à sua incapacidade de formar o dissulfeto. Para isso, foi separada uma alíquota de proteína após o tratamento com cada concentração de Adn (0.5-10 equivalentes molares) e adicionados 5 equivalentes molares (em relação à concentração da proteína) de H_2O_2, sendo a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, analisada por SDS-PAGE não redutor. As proteínas avaliadas foram a AhpC de *E. coli* (EcAhpC)(Gram-) e *S. epidermidis* (SeAhpC) (Gram-). Os resultados revelam que, quanto maior a dose de Adn aplicada maior foi a inibição da formação de dissulfetos intermoleculares (Figuras 4A e 4B) e,

portanto, demonstram que Adn é capaz de inibir as AhpCs bacterianas por meio do bloqueio das cisteínas.

[064] Com a finalidade de determinar o IC_{50} de Adn foram efetuados ensaios de oxidação de NADPH com enzimas tratadas com as concentrações de Adn e enzimas utilizadas no ensaio em SDS-PAGE. Os resultados revelaram que mesmo doses estequiométricas de Adn (0.5 eq.) foram capazes de inibir fortemente a atividade das enzimas (Figuras 4C e 4D). O cálculo da concentração inibitória mínima aparente (IC_{50}) revelou IC_{50} de 0,481 ± 0,024 μM para EcAhpC e 1,650 ± 0,100 μM para SaAhpCT (Figuras 4E e 4F), cerca de 10-30 · menores aos determinados para Prx2 humana e até 3 · menor que o determinado para Prx1 humana utilizando o mesmo método (Liu et al., 2012). Neste contexto, os dados obtidos inicialmente indicam um IC_{50} bastante diminuto tanto para EcAhpC quanto par SaAhpC.

Adn é capaz de agir como bactericida em linhagens de *bactérias patogênicas*

[065] Com o objetivo de investigar a possível atividade bactericida/bacteriostática da Adn, realizamos testes de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de microdiluição em meio de cultura (Eloff, 1998; NCCLS, 2003) utilizando as linhagens das bactérias Gram+ *B. subtilis* (ATCC 39094), *S. aureus* (ATCC 29213) e *S. epidermidis* (ATCC 12228), e das bactérias Gram- e *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 29853) e *S. typhimurium* (ATCC 19585), na presença de concentrações crescentes de Adn. Para isso, uma concentração final de 10^5 UFC de cada bactéria foi inoculada em microplacas contendo meio Mueller Hinton e concentrações crescentes de Adn e incubada a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, a densidade celular foi estimada espectrofotometricamente a 600

nm para o cálculo do valor de MIC_{50}. O crescimento de *E. coli, P. aeruginosa* e *S. typhimurium* não foi inibido pela presença de Adn e, portanto, não foi possível calcular o MIC_{50} para essas linhagens. Entretanto, as linhagens de *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sensíveis à toxicidade de Adn, apresentado IC50 de 116µM, 111µM e 146µM, respectivamente (Figura 5A).

[066] A seguir, para avaliar se Adn possui efeito bactericida ou bacteriostático sobre as linhagens *S. aureus* e *S. epidermidis*, essas cepas foram pré-tratadas com 750µM de Adn por 24 horas, a 37°C, e posteriormente inoculadas em meio LB-ágar sem Adn (Figura 5B). Ao contrário do observado para o controle positivo, em que as células não receberam o pré-tratamento com Adn e foram capazes de formar colônias abundantes no meio LB-ágar sem Adn, as células tratadas com Adn apresentaram crescimento bastante reduzido após serem inoculadas em meio sem Adn, indicando o efeito bactericida deste composto.

Efeito do tratamento de linhagens de bactérias patogênicas Gram+ com Adn em associação com antibióticos

[067] Adicionalmente ao efeito bactericida isolado de Adn, sua utilização pode ser combinada com antibióticos para que promovam um aumento do estresse oxidativo, como os β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (Dwyer, Belenky, Yang, Macdonald, *et al.*, 2014), o que potencializaria o efeito antimicrobiano desses fármacos. Com o objetivo de avaliar o efeito sinérgico de Adn e aminoglicosídeos, as linhagens bacterianas *S. aureus* e *S. epidermidis* foram tratadas isoladamente com 1,5µg/ml de canamicina (Kan) ou 200µM de Adn e, a seguir, simultaneamente com as mesmas concentrações de

Kan e Adn (Figura 6). Os resultados indicam que o tratamento apenas com Adn provocou morte celular de ~60% para *S. aureus* e 47% para *S. epidermidis*, enquanto o tratamento apenas com Kan provocou morte celular de ~29% para *S. aureus* e ~44% para *S. epidermidis*. Já quando essas cepas bacterianas foram tratadas simultaneamente com Adn e Kan, a morte celular atingiu ~97% para ambas as linhagens, indicando um efeito sinérgico promovido por Adn e Kan.

[068] Também avaliamos os efeitos da associação do antibiótico gentamicina sobre linhagens de *S. aureus.* Os resultados revelaram que o tratamento das células com gentamicina (50μg/ml) levou à mortalidade de ~55% das células bacterianas, ao passo que, quando combinada com Adn a morte celular foi elevada para ~90% (Figura 7). Em conjunto, os resultados demonstram que Adn combinada com antibióticos é capaz de potencializar a ação dos antibióticos.

A combinação de Adn com o antibiótico polimixina B nonapeptídeo (PMBN) é capaz de aniquilar bactérias Gram-

[069] Não escapou à nossa atenção que, apesar da Adn inibir de forma muito acentuada a atividade de AhpC de bactéria Gram- (Figuras 4C e 4E), as bactérias que não apresentaram suscetibilidade ao tratamento com Adn foram justamente as Gram- (*E. coli, P. aeruginosa* e *S. typhimurium*). De fato, é bem conhecido que bactérias Gram- podem ser mais resistentes ou mesmo insensíveis ao tratamento com moléculas que apresentam atividade bactericida ou bacteriostática, pois seu sistema de membranas representa uma barreira para a entrada de compostos, incluindo antibacterianos, fornecendo uma camada extra de proteção às bactérias (Delcour, 2009; Krishnamoorthy *et al.*, 2017; Vaara, 1992). A membrana externa (ME) de bactérias Gram-

negativas é uma bicamada assimétrica composta de lipopolissacarídeos (LPS) na camada externa e glicerofosfolipídeos (PL) na interna (Nikaido, 1998). As principais características da estrutura LPS, como a presença do lipídio A e do antígeno O, são conservadas entre várias espécies. A maior parte do conhecimento atual sobre a seletividade das barreiras de permeabilidade da ME foi determinada por estudos envolvendo *E. coli*. Nesta bactéria, a atividade antibacteriana de antibióticos grandes e polares excedendo o tamanho para o transporte em porinas (> 600 Da em *E. coli*), são geralmente as mais restritas pela ME (Krishnamoorthy *et al.,* 2017; Nikaido, 1998; O'Shea e Moser, 2008; Lakaye *et al.,* 2001). Por outro lado, o caráter zwiteriônico de compostos se correlaciona com o aumento da permeabilidade através da ME, enquanto a hidrofobicidade está correlacionada com a propensão aumentada de um determinado composto ser substrato de bombas de efluxo de drogas (Krishnamoorthy *et al.,* 2017). Neste contexto, compostos como Adn o qual apresenta baixa polaridade e peso molecular de 500Da, se encaixam nas drogas as quais este tipo de bactéria são refratárias (Vaara, 2019).

[070] As características da membrana de Gram- são alvo de uma classe de antibióticos denominados de polimixinas, os quais podem subjugar a barreira membranar desta classe de bactérias (Vaara et al., 2019). Neste contexto, avaliamos a capacidade da administração de Adn em conjunto com doses subletais de polimixina B nonapeptídeo (PMBN) sobre linhagem de *E. coli*. Os resultados revelaram que a administração de 0,2μg de PMBN, Adn (200μM) ou a combinação dos dois compostos não foi capaz de alterar de forma significativa as taxas de

sobrevivência das bactérias (Figura 8A). Entretanto, quando foi aplicada a dose de 0,3μg de PMBN a sua combinação com Adn levou à redução da taxa de sobrevivência celular em ~ 90% (Figura 8B).

Diterpenoides *ent*-caurânicos, novos fármacos

[071] Do ponto de vista farmacológico, a avaliação da relação entre estrutura e atividade biológica de diterpenoides em geral incluindo os diterpenoides *ent*-caurânicos sugerem que determinadas características destas moléculas estão envolvidas em suas funções biológicas. Foi constatada a presença de um esqueleto decalínico substituído (porção hidrofóbica), capaz de interagir com lipídeos das membranas biológicas, e uma região que apresenta um grupo doador de hidrogênio (H) (porção hidrofílica), o qual é capaz de interagir com grupos aceptores de H presentes na membrana plasmática. Estas características permitem que estas moléculas sejam capazes de atravessar a membrana celular exercendo sua atividade biológica (Wang *et al.*, 2011). De fato, características como as apresentadas para este grupo de moléculas são altamente importantes para que um fármaco possa ser mais facilmente absorvido pelo organismo (Walters, 2012). Adicionalmente, é importante observar nestas estruturas a presença de um carbono (C) capaz de atuar como um doador de Michael para a reação com as cisteínas das 2-Cys-Prx (Liu *et al.*, 2012).

[072] Neste contexto, apesar de Adn ter sido utilizada para o tratamento de doenças genéticas, ela não é utilizada para o tratamento de doenças infecciosas. Neste pedido, demonstramos claramente que Adn é capaz de inibir as Prx bacterianas por meio da inativação do resíduo catalítico. Também demonstramos que as doses utilizadas (IC_{50}) para inativar

as enzimas bacterianas é significativamente menor que as determinadas para enzimas de humanos (até 30× menor) (Liu et al., 2012). Também demonstramos que possui propriedade bactericidas, em concentrações de micromolar, sobre bactérias Gram-, e, em conjunto com baixas concentrações de antibióticos é capaz de aniquilar bactérias Gram+ (Adn + Kan ou Gen) e também bactérias Gram- (Adn + polimixina nonapeptídeo), demostrando um amplo espectro para sua utilização no tratamento de infecções ocasionadas por bactérias patogênicas. Dessa forma, o presente pedido de patente consiste em proteger o uso de Adn, seus derivados (moléculas modificadas) e diterpenoides *ent*-caurânicos quando associado a antibacterianos que promovem aumento do estresse oxidativo (β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas) e também de polimixinas, uma vez que Adn e derivados são inibidores de 2-Cys Prx bacterianas (AhpCs) e agem como potencializadores da atividade antimicrobiana de fármacos antibacterianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[073] ACKER, H. VAN *et al.* The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Induced Cell Death in Burkholderia cepacia Complex Bacteria. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159837, 2016.

[074] ALEXANDER FLEMING. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226–236, 1929.

[075] ALÓS, J.-I. [Antibiotic resistance: A global crisis]. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica**, v. 33, n. 10, p. 692–9, dez. 2015.

[076] AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic

era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.

[077] AMMENDOLA, S. *et al.* Regulatory and structural differences in the Cu,Zn-superoxide dismutases of Salmonella enterica and their significance for virulence. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 20, p. 13688–99, maio 2008.

[078] BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 42–7, fev. 2004.

[079] BANSAL, S. *et al.* **Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of actionThe FASEB Journal**, 2012.

[080] BARTLETT, J. G.; GILBERT, D. N.; SPELLBERG, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 10, p. 1445–50, maio 2013.

[081] BATISTA, R. *et al.* New oxidized ent-kaurane and ent-norkaurane derivatives from kaurenoic acid. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 622–627, 2007.

[082] BAXT, L. A.; GARZA-MAYERS, A. C.; GOLDBERG, M. B. Bacterial subversion of host innate immune pathways. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6133, p. 697–701, maio 2013.

[083] BENOV, L. T.; FRIDOVICH, I. Escherichia coli expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25310–4, out. 1994.

[084] BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

[085] BIZZINI, A. *et al.* The Enterococcus faecalis superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1196–202, dez. 2009.

[086] BREIDENSTEIN, E. B. M. *et al.* Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a Pseudomonas aeruginosa mutant library for altered susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4486–91, dez. 2008.

[087] BROOKS, A. N. *et al.* Adaptation of cells to new environments. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 5, p. 544–561, 2011.

[088] BRYNILDSEN, M. P. *et al.* Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 160–5, 6 jan. 2013.

[089] CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137–44, jul. 2006.

[090] CALCERRADA, P.; PELUFFO, G.; RADI, R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 35, p. 3905–32, dez. 2011.

[091] CALHOUN, L. N.; KWON, Y. M. The ferritin-like protein Dps protects Salmonella enterica serotype Enteritidis from the Fenton-mediated killing mechanism of bactericidal antibiotics. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n. 3, p. 261–5, mar. 2011.

[092] CASSINAT, B. *et al.* New role for granulocyte colony-stimulating factor-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 in histone modification and retinoic acid receptor α recruitment to gene promoters: relevance to acute promyelocytic leukemia cell differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 7, p. 1409–18, abr. 2011.

[093] CHAVES-MORENO, D. *et al.* Exploring the transcriptome of Staphylococcus aureus in its natural niche. **Scientific reports**, v. 6, p. 33174, set. 2016.

[094] CHOPRA, I.; HESSE, L.; O'NEILL, A. J. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. s1, p. 4S–15S, maio 2002.

[095] COSGROVE, K. *et al.* Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in Staphylococcus aureus. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 1025–35, fev. 2007.

[096] CZEKALSKI, N. *et al.* Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake geneva, Switzerland. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 106, 2012.

[097] D'COSTA, V. M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457–461, ago. 2011.

[098] DANTAS, G. *et al.* Bacteria subsisting on antibiotics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5872, p. 100–3, abr. 2008.

[099] DAVIES, B. W. *et al.* Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in Escherichia coli. **Molecular cell**, v. 36, n. 5, p. 845–60, dez. 2009.

[100] DEMASI, A P.; PEREIRA, G. A; NETTO, L. E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. **FEBS letters**, v. 509, n. 3, p. 430–4, 14 dez. 2001.

[101] DONE, H. Y.; VENKATESAN, A. K.; HALDEN, R. U. Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? **The AAPS journal**, v. 17, n. 3, p. 513–24, maio 2015.

[102] DUTRA, L. M. *et al.* ent-Kaurane diterpenes from the stem bark of Annona vepretorum (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 15, p. 3315–20, ago. 2014.

[103] DWYER, D. J.; BELENKY, P. A.; YANG, J. H.; MACDONALD, I. C.; *et al.* Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. 2014.

[104] DWYER, D. J.; BELENKY, P. A.; YANG, J. H.; MACDONALD, I. C.; *et al.* Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, p. E2100–9, maio 2014.

[105] ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta medica**, v. 64, n. 8, p. 711–3, dez. 1998.

[106] FANG, F. C. *et al.* Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 13, p. 7502–7, jun. 1999.

[107] FORSBERG, K. J. *et al.* The shared antibiotic

resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6098, p. 1107–11, ago. 2012.

[108] FOTI, J. J. *et al.* Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6079, p. 315–9, abr. 2012.

[109] FRITZSCHE, C.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. Endothelial nitric oxide synthase limits the inflammatory response in mouse cutaneous leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 215, n. 9–10, p. 826–32, 2010.

[110] GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; DOWLING, P. M. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2007.

[111] GIRGIS, H. S.; HOTTES, A. K.; TAVAZOIE, S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. **PloS one**, v. 4, n. 5, p. e5629, maio 2009.

[112] GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; PACE, D. G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 2, p. 129–36, fev. 2014.

[113] GORDON, S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 463–75, mar. 2016.

[114] GOULD, I. M.; BAL, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 185–91, fev. 2013.

[115] GRANT, S. S. *et al.* Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 30, p. 12147–52, jul. 2012.

[116] GULLBERG, E. *et al.* Selection of Resistant

Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. e1002158, jul. 2011.

[117] GUSAROV, I. *et al.* Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5946, p. 1380–4, set. 2009.

[118] HAIKARAINEN, T.; PAPAGEORGIOU, A. C. Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 67, n. 3, p. 341–51, fev. 2010.

[119] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5 edition ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

[120] HALSEY, T. A. *et al.* The ferritin-like Dps protein is required for Salmonella enterica serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 1155–8, fev. 2004.

[121] HÉBRARD, M. *et al.* Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to Salmonella Virulence and Oxidative Stress Resistance. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 14, p. 4605–4614, 2009.

[122] HEIKKILA, R. E.; COHEN, G. The inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. In: Superoxide and Superoxide Dismutases. **London, UK: Academic Press**, p. 367–373, 1977.

[123] HOU, J.-K. *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1400, jan. 2014.

[124] HU, X. *et al.* Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is required for

macrophage-like differentiation of a human myeloid leukemic cell line. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 191–200, abr. 2000.

[125] HU, Y. *et al.* The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 22, p. 6672–6681, nov. 2016.

[126] IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 755–76, 2008.

[127] JANG, S.; IMLAY, J. A. Hydrogen peroxide inactivates the Escherichia coli Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. **Molecular microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1448–67, dez. 2010.

[128] JEE, J. *et al.* Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing. **Nature**, v. 534, n. 7609, p. 693–6, jun. 2016.

[129] KANG, T. M. *et al.* The aminoglycoside antibiotic kanamycin damages DNA bases in Escherichia coli: caffeine potentiates the DNA-damaging effects of kanamycin while suppressing cell killing by ciprofloxacin in Escherichia coli and Bacillus anthracis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3216–23, jun. 2012.

[130] KENNEDY, K.; COLLIGNON, P. Colonisation with Escherichia coli resistant to "critically important" antibiotics: a high risk for international travellers. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 1501–6, dez. 2010.

[131] KIM, K. *et al.* Asparaginase I1 of Saccharomyces cerevisiae. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 24, p. 11948–11953, 1988.

[132] KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, maio 2005.

[133] KOHANSKI, M. A. *et al.* Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. **Cell**, v. 135, n. 4, p. 679–90, nov. 2008.

[134] KOHANSKI, M. A; DEPRISTO, M. A; COLLINS, J. J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. **Molecular cell**, v. 37, n. 3, p. 311–20, 12 fev. 2010.

[135] LING, J. *et al.* Protein aggregation caused by aminoglycoside action is prevented by a hydrogen peroxide scavenger. **Molecular cell**, v. 48, n. 5, p. 713–22, dez. 2012.

[136] LINK, A. J.; ROBISON, K.; CHURCH, G. M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Escherichia coli K-12. **Electrophoresis**, v. 18, n. 8, p. 1259–313, ago. 1997.

[137] LIU, A. *et al.* Antibiotic sensitivity profiles determined with an Escherichia coli gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1393–403, abr. 2010.

[138] LIU, C.-X. *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells. **Nature chemical biology**, v. 8, n. 5, p. 486–93, maio 2012.

[139] LIU, C. X. *et al.* Targeting peroxiredoxins

against leukemia. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 2, p. 170–176, 2013.

[140] LU *et al.* Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1,2, 4-triazole. **Biotechnology and bioengineering**, v. 60, n. 1, p. 135, out. 1998.

[141] MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Upsala journal of medical sciences**, v. 119, n. 2, p. 68–77, maio 2014.

[142] MEHTA, N. S. *et al.* In vitro and in vivo characterization of alkyl hydroperoxide reductase mutant strains of Helicobacter hepaticus. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1770, n. 2, p. 257–65, fev. 2007.

[143] MELILLO, A. A.; BAKSHI, C. S.; MELENDEZ, J. A. Francisella tularensis antioxidants harness reactive oxygen species to restrict macrophage signaling and cytokine production. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27553–60, set. 2010.

[144] MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 145, 2014.

[145] MILLEN, D. D. *et al.* Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. **Animal Frontiers**, v. 1, n. 2, p. 46–52, out. 2011.

[146] MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 145–60, set. 2012.

[147] MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. Inhibition of superoxide dismutases by azide. **Archives of biochemistry and**

biophysics, v. 189, n. 2, p. 317–22, ago. 1978.

[148] MUNHOZ, D. C.; NETTO, L. E. S. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H2O2 by yeast. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35219–27, ago. 2004.

[149] NASCIMENTO, C. J. DO *et al.* Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from Erythroxylum suberosum. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 401–406, jun. 2012.

[150] NCCLS. **No Title**. [s.l: s.n.].

[151] NETTO, L. E. S. *et al.* Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 26, p. 15315–21, jun. 1996.

[152] NGUYEN, D. *et al.* Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6058, p. 982–6, 18 nov. 2011.

[153] NIETO R, L. M. *et al.* Virulence of Mycobacterium tuberculosis after Acquisition of Isoniazid Resistance: Individual Nature of katG Mutants and the Possible Role of AhpC. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166807, 2016.

[154] NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. **Nitric oxide: biology and chemistry**, v. 14, n. 2, p. 109–21, mar. 2006.

[155] OGUSUCU, R. *et al.* Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 42, n. 3, p. 326–334, 2007.

[156] OH, E.; JEON, B. Role of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) in the biofilm formation of Campylobacter jejuni. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87312, 2014.

[157] OTEO, J.; BELÉN ARACIL, M. [Molecular characterization of resistance mechanisms: methicillin resistance Staphylococcus aureus, extended spectrum β-lactamases and carbapenemases]. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica**, v. 33 Suppl 2, p. 27–33, jul. 2015.

[158] PARSONAGE, D. *et al.* Analysis of the Link between Enzymatic Activity and Oligomeric State in AhpC , a Bacterial Peroxiredoxin. **Biochemistry**, v. 44, n. 31, p. 10583–10592, 2005.

[159] PERKINS, A. *et al.* Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 8, p. 435–45, ago. 2015.

[160] PESKIN, A. V *et al.* Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. **The Biochemical journal**, v. 432, n. 2, p. 313–21, 1 dez. 2010.

[161] PIDDOCK, L. J. The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 249–253, mar. 2012.

[162] PROLO, C.; ALVAREZ, M. N.; RADI, R. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. **BioFactors (Oxford, England)**, v.

40, n. 2, p. 215–25, 2013.

[163] PURRELLO, S. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: A review of the currently available treatment options. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 7, p. 178–186, 2016.

[164] REARDON, S. Spread of antibiotic-resistance gene does not spell bacterial apocalypse — yet. **Nature**, dez. 2015.

[165] RIZZO, L. *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **The Science of the total environment**, v. 447, p. 345–60, mar. 2013.

[166] ROBERTS, B.; HIRST, R. Identification and characterisation of a superoxide dismutase and catalase from Mycobacterium ulcerans. **Journal of medical microbiology**, v. 45, n. 5, p. 383–7, nov. 1996.

[167] ROSSOLINI, G. M. *et al.* Update on the antibiotic resistance crisis. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, p. 56–60, out. 2014.

[168] SEGURA, P. A. *et al.* Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. **Environmental health perspectives**, v. 117, n. 5, p. 675–84, maio 2009.

[169] SHATALIN, K. *et al.* H2S: a universal defense against antibiotics in bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6058, p. 986–90, 18 nov. 2011.

[170] STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 6, p. 473–80, 2008.

[171] SUGADEV, R.; PONNUSWAMY, M. N.; SEKAR, K.

Structural analysis of NADPH depleted bovine liver catalase and its inhibitor complexes. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 2, n. 1, p. 67–77, 2011.

[172] TAIRUM, C. A *et al.* Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. **Journal of molecular biology**, v. 424, p. 28–41, 23 nov. 2012.

[173] TAIRUM, C. A. *et al.* Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, p. 33133, set. 2016.

[174] TIRAPELLI, C. R. *et al.* Diterpenes: A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. p. 1–8, 2008.

[175] UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 825–52, 2002.

[176] VAARA M. Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. **Molecules**. v. 24, n. 2, p. 249. 2019.

[177] VELAYUDHAN, J. *et al.* The role of ferritins in the physiology of Salmonella enterica sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1495–507, mar. 2007.

[178] VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, abr. 2015.

[179] WALTERS, W. P. Going further than Lipinski’s rule in drug design. **Expert opinion on drug discovery**, v. 7,

n. 2, p. 99–107, fev. 2012.

[180] WANG, L. *et al.* Recent progress in the development of natural ent-kaurane diterpenoids with anti-tumor activity. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 10, p. 910–9, set. 2011.

[181] WANG, N. *et al.* A Comprehensive Analysis on Spread and Distribution Characteristic of Antibiotic Resistance Genes in Livestock Farms of Southeastern China. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0156889, 2016.

[182] WANG, X. *et al.* Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 520–4, mar. 2010.

[183] WEI, W. *et al.* Targeting peroxiredoxin I potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced cell differentiation in leukemia cells. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 3, p. 2201–7, mar. 2016.

[184] WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 6, p. 642–60, fev. 2013.

[185] WOLF, S. G. *et al.* DNA protection by stress-induced biocrystallization. **Nature**, v. 400, n. 6739, p. 83–5, jul. 1999.

[186] WOOD, Z. A *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 1, p. 32–40, jan. 2003.

[187] WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 650–653, 2003.

[188] YEOM, J.; IMLAY, J. A.; PARK, W. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in Pseudomonas species. **The Journal of biological chemistry**, v. 2852, n. 29, p. 22689-95, jul. 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de diterpenoides *ent*-caurânicos em associação a antibióticos, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para potencializar a atividade antimicrobiana desses fármacos.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os diterpenoides *ent*-caurânicos compreendem principalmente a adenantina e seus derivados.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os antibióticos são selecionados do grupo consistindo em β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, principalmente a canamicina, gentamicina e polimixinas.

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a associação provoca o aumento do estresse oxidativo de bactérias.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de a associação inibir 2-Cys Prx bacterianas.

A) Reações de Fenton:	Fe^{3+} $O_2^{\bullet -}$ → Fe^{2+} + O_2 (Reação 1)
	Fe^{2+} + H_2O_2 → Fe^{3+} + OH^- + $HO^\bullet$ (Reação 2)
B) Reação de Haber-Weiss:	H_2O_2 + $O_2^{\bullet -}$ → O_2 + $HO^\bullet$ + OH^-

Figura 1

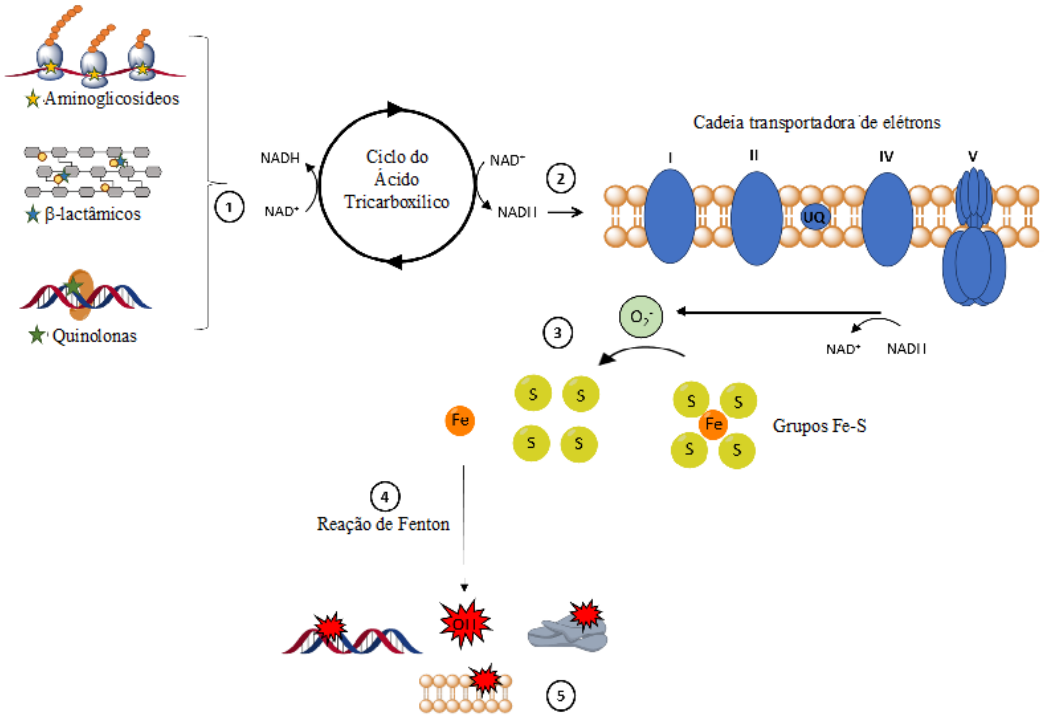
Aminoglicosídeos
β-lactâmicos
Quinolonas
1
NADH
NAD+
Ciclo do
Ácido
Tricarboxílico
NAD+
NADH
2
Cadeia transportadora de elétrons
I
II
IV
V
UQ
O2-
3
NAD+
NADH
Fe
S
Grupos Fe-S
4
Reação de Fenton
OH
5

Figura 2

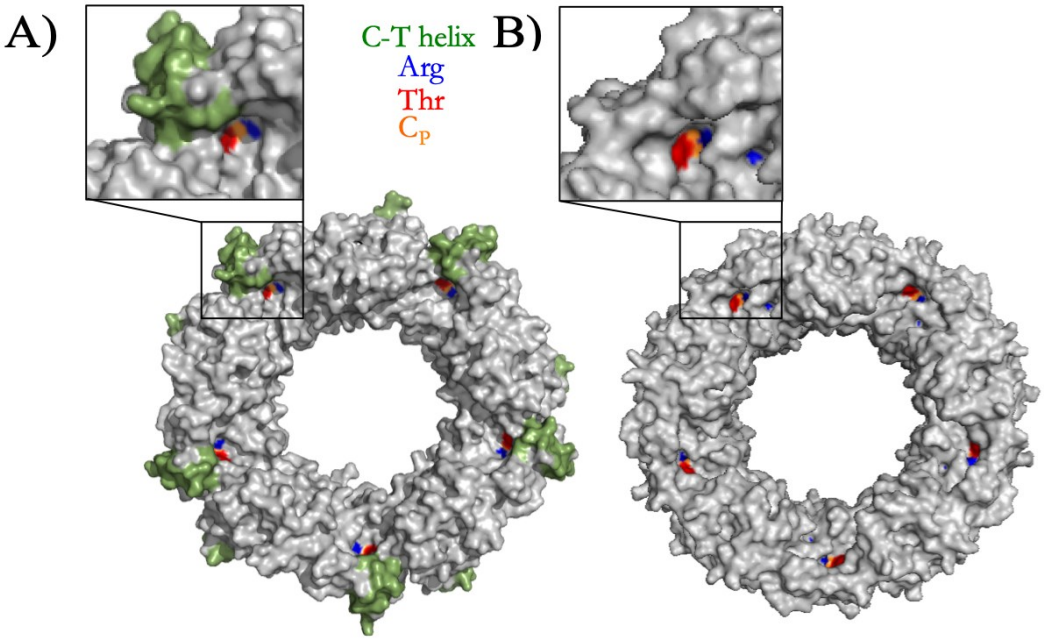

Figura 3

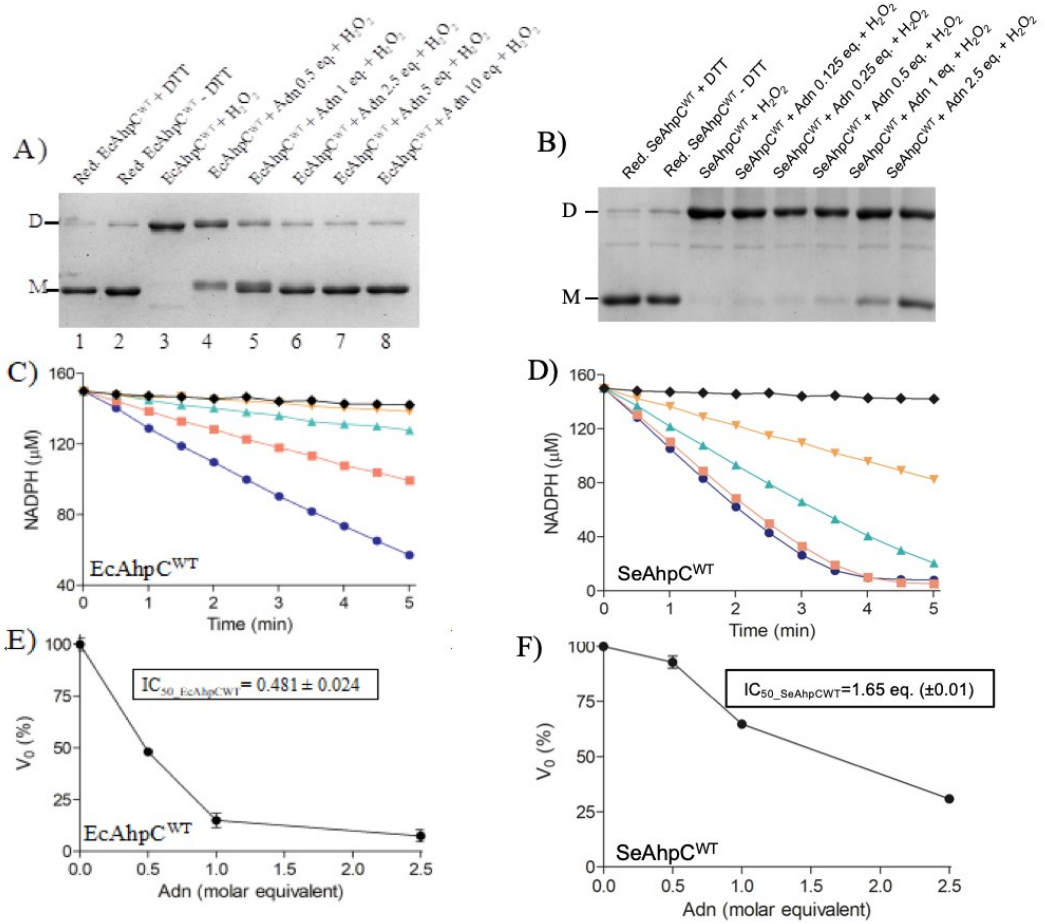
A)
Red. EcAhpC^WT + DTT
Red. EcAhpC^WT - DTT
EcAhpC^WT + H2O2
EcAhpC^WT + Adn 0.5 eq. + H2O2
EcAhpC^WT + Adn 1 eq. + H2O2
EcAhpC^WT + Adn 2.5 eq. + H2O2
EcAhpC^WT + Adn 5 eq. + H2O2
EcAhpC^WT + Adn 10 eq. + H2O2
D
M
1 2 3 4 5 6 7 8
B)
Red. SeAhpC^WT + DTT
Red. SeAhpC^WT - DTT
SeAhpC^WT + H2O2
SeAhpC^WT + Adn 0.125 eq. + H2O2
SeAhpC^WT + Adn 0.25 eq. + H2O2
SeAhpC^WT + Adn 0.5 eq. + H2O2
SeAhpC^WT + Adn 1 eq. + H2O2
SeAhpC^WT + Adn 2.5 eq. + H2O2
D
M
C)
NADPH (μM)
EcAhpC^WT
Time (min)
D)
NADPH (μM)
SeAhpC^WT
Time (min)
E)
V0 (%)
IC50_EcAhpCWT = 0.481 ± 0.024
EcAhpC^WT
Adn (molar equivalent)
F)
V0 (%)
IC50_SeAhpCWT=1.65 eq. (±0.01)
SeAhpC^WT
Adn (molar equivalent)

Figura 4

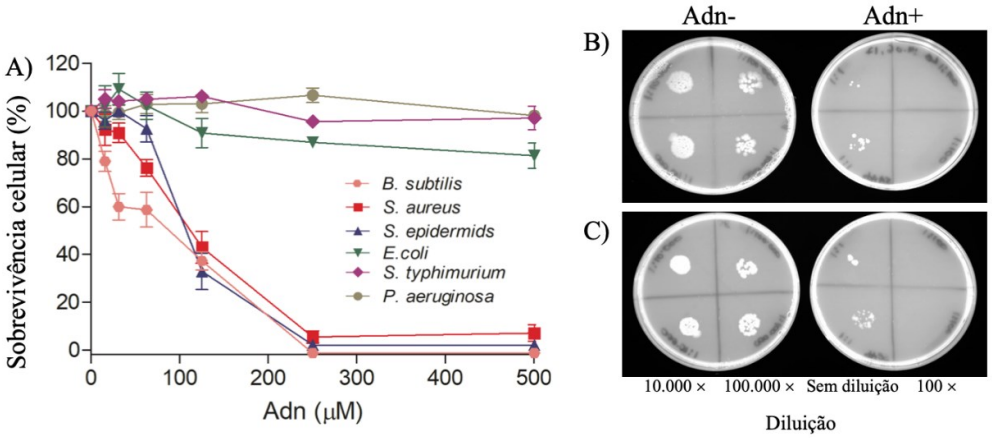
A)
Sobrevivência celular (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
Adn (μM)
B. subtilis
S. aureus
S. epidermids
E.coli
S. typhimurium
P. aeruginosa
B)
Adn-
Adn+
C)
10.000 ×
100.000 ×
Sem diluição
100 ×
Diluição

Figura 5

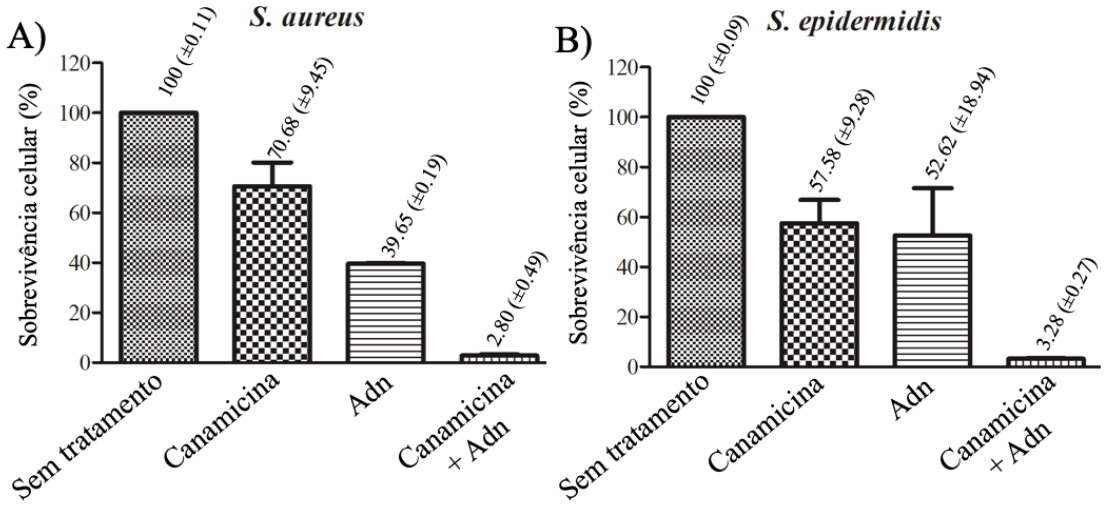
A)
S. aureus
Sobrevivência celular (%)
120
100
80
60
40
20
0
100 (±0.11)
70.68 (±9.45)
39.65 (±0.19)
2.80 (±0.49)
Sem tratamento
Canamicina
Adn
Canamicina + Adn
B)
S. epidermidis
Sobrevivência celular (%)
120
100
80
60
40
20
0
100 (±0.09)
57.58 (±9.28)
52.62 (±18.94)
3.28 (±0.27)
Sem tratamento
Canamicina
Adn
Canamicina + Adn

Figura 6

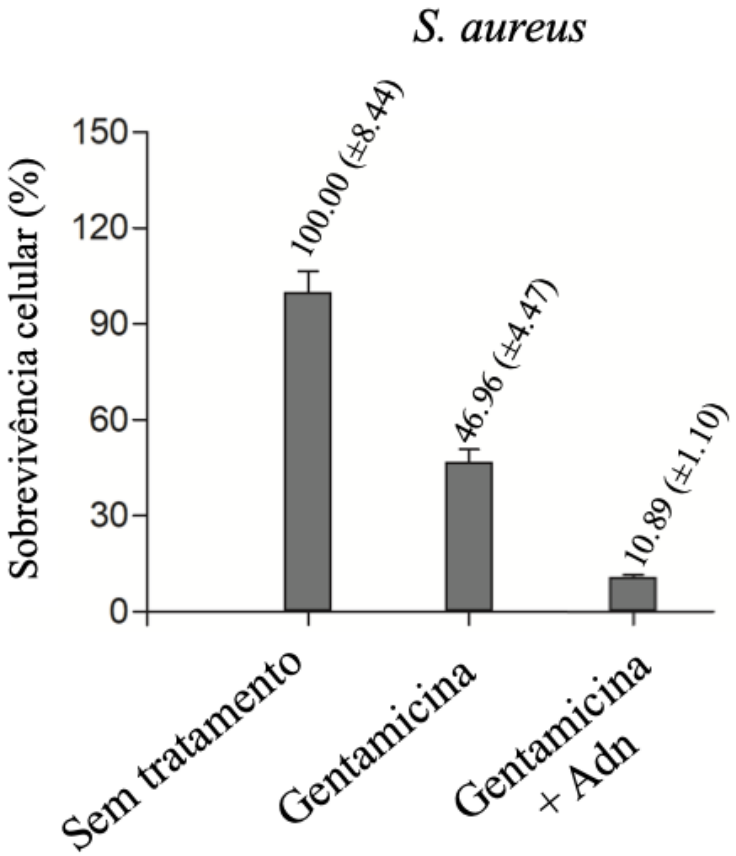
S. aureus
Sobrevivência celular (%)
150
120
90
60
30
0
100.00 (±8.44)
46.96 (±4.47)
10.89 (±1.10)
Sem tratamento
Gentamicina
Gentamicina + Adn

Figura 7

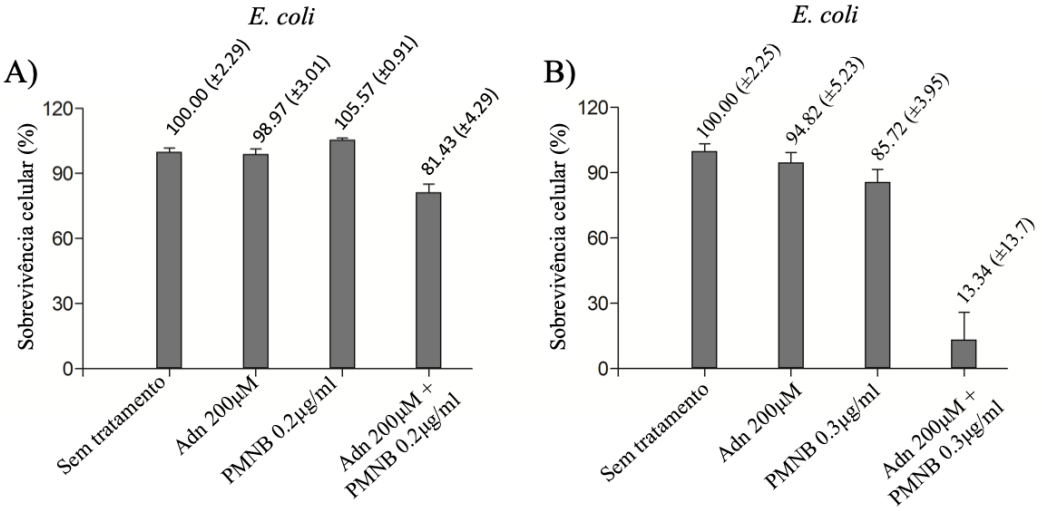
E. coli
A)
Sobrevivência celular (%)
120
90
60
30
0
100.00 (±2.29)
98.97 (±3.01)
105.57 (±0.91)
81.43 (±4.29)
Sem tratamento
Adn 200μM
PMNB 0.2μg/ml
Adn 200μM + PMNB 0.2μg/ml
E. coli
B)
Sobrevivência celular (%)
120
90
60
30
0
100.00 (±2.25)
94.82 (±5.23)
85.72 (±3.95)
13.34 (±13.7)
Sem tratamento
Adn 200μM
PMNB 0.3μg/ml
Adn 200μM + PMNB 0.3μg/ml

Figura 8

RESUMO

USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS

A presente invenção descreve o uso de diterpenoides *ent*-caurânicos, como a adenantina (Adn), ou seus derivados em associação a antibióticos que promovem aumento do estresse oxidativo, como os β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo a canamicina (Kan) e a gentamicina (Gen), e também as polimixinas, como potencializadores da atividade antimicrobiana desses fármacos. Além disso, o efeito sinérgico da utilização em conjunto dessas substâncias apresenta um elevado potencial de aplicação farmacêutica em tratamentos de diferentes infecções causadas por microrganismos, a fim de sensibilizar bactérias que apresentem resistência a esses últimos e, também, pode reduzir as quantidades administradas de antibióticos em pacientes reduzindo os efeitos colaterais.

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, GISELE MONTEIRO, brasileira, divorciada, professora universitária, portadora do RG nº 25963442-6, CPF nº 278.664.008-30, residente e domiciliada à Rua José Lopes da Silva, 235, São Paulo – SP, CEP 05376-110, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

GISELE MONTEIRO

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, ADALBERTO PESSOA JÚNIOR, brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 1195328-8, CPF nº 031.440.808-88, residente e domiciliado(a) à Rua Aibi, 16, Apto. 114, São Paulo – SP, CEP 05054-010, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

ADALBERTO PESSOA JUNIOR

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, ANA JULIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA, brasileira, divorciada, professora universitária, portadora do RG nº 14944269-5, CPF nº 094.490.148-41, residente e domiciliado(a) à Rua República do Iraque n 1745, casa 2, São Paulo – SP, CEP 04611-003, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

ANA JULIA FERNANDES CARDOSO DE OLIVEIRA

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, BRUNA DEL BUSSO ZAMPIERI, brasileira, casada, doutoranda, portadora do RG nº 14825528, CPF nº 094.758.076-08, residente e domiciliado(a) à Rua Sylvia Monteiro Franco, 19, Poços de Caldas – MG, CEP 37718-101, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

Poços de Caldas, 09 de julho de 2020.

Bruna D.B. Zampieri

BRUNA DEL BUSSO ZAMPIERI

Scanned by TapScanner

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, CARLOS ABRUNHOSA TAIRUM JUNIOR, brasileiro, solteiro, biólogo, portador do RG nº 43520934-6, CPF nº 320.485.068-44, residente e domiciliado(a) à Avenida Nossa Senhora da Assunção, 647, Apto. 54D, São Paulo – SP, CEP 05359-001, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

CA Tairum

CARLOS ABRUNHOSA TAIRUM JUNIOR

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, CARLOS ALEXANDRE BREYER, brasileiro, solteiro, empresário, portador do RG nº 58637344-5, CPF nº 009.724.099-04, residente e domiciliado(a) à Rua Aldo Coli, 843 – Casa4, Praia Grande – SP, CEP 11704-760, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositarem, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

Praia Grande,09 de Julho de 2020.

CARLOS ALEXANDRE BREYER

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, LUIS EDUARDO SOARES NETTO brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 11584521, CPF nº 090.822.648-97, residente e domiciliado(a) à Rua Doutor Manole de Paiva Ramos, 265, Apto. 51M, São Paulo – SP, CEP 05351-015, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

Luis E.S. Netto

_____

LUIS EDUARDO SOARES NETTO

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA, brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 16969416-1, CPF nº 119.178.798-22, residente e domiciliado(a) à Avenida Ariovaldo Reis, 253, Guarujá – SP, CEP 11421-190, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

Guarujá, 09 de Julho de 2020.

MARCOS ANTONIO DE OLIVEIRA

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, MARCOS HIKARI TOYAMA, brasileiro, casado, biólogo, portador do RG nº 17663205-0, CPF nº 120.693.908-70, residente e domiciliado (a) à Rua Frei Gaspar 253 apto 1009, Centro, São Vicente, CEP 11310-060, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supramencionado.

São Vicente, 09 de julho de 2020.

MARCOS HIKARI TOYAMA

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, MELINA CARDOSO DOS SANTOS, brasileira, divorciada, doutoranda, portadora do RG nº 34498656-1, CPF nº 332.041.858-00, residente e domiciliado(a) à Rua Serra da Mantiqueira, 129, Barueri – SP, CEP 06413-080, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

Barueri, 09 de Julho de 2020.

Melina C. Santos

MELINA CARDOSO DOS SANTOS

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, ROLANDO IÉ, guineense, solteiro, mestrando, portador do RG nº v719120-C, CPF nº 234.633.668-86, residente e domiciliado(a) à Rua Rangel Pestana, 273, Apto. 11, São Vicente – SP, CEP 11230-120, abaixo assinado, na qualidade de inventor e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N°7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADEESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO AANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DEMICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Vicente, 09 de julho de 2020.

Rolando Yé

ROLANDO IÉ

AUTORIZAÇÃO DO INVENTOR

Eu, VANESSA DA COSTA ANDRADE, brasileira, solteira, doutoranda, portadora do RG nº 35712262-8, CPF nº 399.193.328-44, residente e domiciliado(a) à Avenida Padre Antonio Jose dos Santos, 78, Apto. 78, São Paulo – SP, CEP 04563-000, abaixo assinado, na qualidade de inventora e de conformidade com a Lei da Propriedade Industrial N° 9.279 de 14.05.96 e Resolução-USP N° 7035 de 17.12.2014, autorizo a UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP, inscrita no CNPJ sob n° 63.025.530/0001-04 e a UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, a depositar, como titulares, o pedido de patente de invenção sob o título "**USO DE DITERPENOIDES ENT-CAURÂNOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS PARA INIBIÇÃO DE ENZIMAS PEROXIRREDOXINAS DE MICRORGANISMOS PARA O COMBATE DE INFECÇÕES MICROBIANAS**" e representar-me perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, para assinar petições, guias e demais documentos referentes ao pedido supra mencionado.

São Paulo, 09 de julho de 2020.

VANESSA DA COSTA ANDRADE