

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

VICTOR CAVADAS BARRETO DE ALBUQUERQUE

***Análise *in vitro* de compostos com potencial antimicrobiano para o
tratamento da infecção gonocócica***

Florianópolis

2020

Victor Cavadas Barreto de Albuquerque

**Análise *in vitro* de compostos com potencial antimicrobiano para o
tratamento da infecção gonocócica**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Bazzo
Co-orientadora: MSc. Hanalydia de Melo Machado

Florianópolis, SC

2020

"Eficaz, acessível e tratamento antimicrobiano barato são imprescindíveis para o manejo e controle da gonorreia, isso é, em combinação com adequada prevenção; diagnóstico laboratorial; notificação de contato e tratamento e vigilância epidemiológica".

(Magnus Unemo)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação, apoio, suporte e principalmente incentivo em mais uma conquista.

À professora orientadora Dr^a. Maria Luiza Bazzo agradeço imensamente pela oportunidade de realizar este trabalho no laboratório, conselhos e ensinamentos.

À minha co-orientadora MSc. Hanalydia de Melo Machado pelo apoio e conhecimento compartilhado, que foram fundamentais em várias etapas.

Ao Álisson Bigolin por oferecer a oportunidade de participar do laboratório como Iniciação Científica, que sem dúvida nenhuma foi muito importante no meu trajeto de graduação.

Ao Cândido Detoni Gazzoni, pelo amor, carinho, paciência e, principalmente, apoio durante a etapa final deste trabalho.

A todos os colegas e integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia e Sorologia, por prestarem o apoio nas horas difíceis e compartilhar alegrias ao longo deste trabalho.

Às Professoras Dr^a. Miriam de Barcellos Falkenberg e Dr^a. Lílian Sibelle Campos Bernardes, juntamente com o Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas por terem cedidos os compostos para o desenvolvimento deste trabalho e, também, pelo suporte prestado.

Agradeço todos meus amigos pelos momentos de companheirismo, pelas conversas, desabafos e, principalmente, pelo que cada um acrescentou na pessoa que me tornei.

À Instituição UFSC por me proporcionar um ambiente sobretudo de aprendizado, onde pude conhecer e vivenciar situações que contribuíram para me tornar quem sou.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: *Neisseria gonorrhoeae* tem chamado a atenção mundial pela sua grande capacidade de desenvolver e adquirir resistência aos agentes antimicrobianos. A crescente e alarmante descrição de isolados resistentes a última linha de tratamento recomendado internacionalmente para gonorreia vem incentivando a busca por novas opções terapêuticas. Em 2012, a Organização Mundial da Saúde publicou um plano mundial de estratégias para conter a transmissão e impacto da resistência antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, e propôs como prioridade as estratégias de avaliação de novos antimicrobianos ou terapias alternativas para o tratamento da infecção gonocócica. **Objetivo:** Avaliar o desempenho e verificar o potencial antimicrobiano de compostos sintéticos e naturais contra *N. gonorrhoeae*, utilizando isolados de coleção e isolados clínicos. **Metodologia:** Realizou-se a padronização da metodologia REMA (do inglês, *Resazurin Microtiter Assay Plate*) para avaliação da atividade antimicrobiana. Após isso, realizou-se a triagem de um grupo de substâncias de compostos isolados, extratos e frações, totalizando 187 compostos, dos quais 119 são sintéticos e 68 naturais. Os compostos que apresentaram os melhores resultados foram escolhidos para seguimento do estudo da curva da determinação da concentração inibitória mínima. **Resultados e discussão:** Um composto sintético (RR103) e quatro compostos naturais (AP1, AP10, AP12 e AP16) apresentaram média de inibição da viabilidade bacteriana de 88,6 %, 89,9 %, 85,5 %, 98,8 % e 86,5 % respectivamente. Entre os compostos naturais, AP12 na concentração de 100 mg/L obteve o melhor resultado, apresentando uma ação inibitória de crescimento bacteriano acima de 70% em todas as cepas de *N. gonorrhoeae*, até mesmo nas cepas multirresistentes como a cepa WHO W, WHO Y, WHO X e WHO Z. O composto sintético RR103 apresentou atividade antimicrobiana limitada, obtendo concentração inibitória mínima variável dependendo da cepa a qual foi utilizada no ensaio. **Conclusão:** O composto natural AP12 mostrou-se ser um potencial candidato para futuros estudos de desenvolvimento de novos medicamentos, por demonstrar sua atividade sem depender dos diferentes mecanismos de resistência expressos pelas diferentes cepas testadas, além de possuir características químicas que possibilitam a ser um composto por via oral, favorecendo o seu acesso e uso para a população.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*; microdiluição; resazurina

ABSTRACT

Background: *Neisseria gonorrhoeae* has drawn worldwide attention for its great ability to develop and acquire resistance to antimicrobial agents. The growing and alarming description of isolates resistant to the last internationally recommended treatment line for gonorrhoea has been encouraging the search for new therapeutic options. In 2012, the World Health Organization published a worldwide strategy plan to contain the transmission and impact of *N. gonorrhoeae* antimicrobial resistance, and proposed as a priority strategies for the evaluation of new antimicrobials or alternative therapies for the treatment of gonococcal infection. **Aims:** To evaluate the performance and verify the antimicrobial potential of synthetic and natural compounds against *N.gonorrhoeae*, using collection isolates and clinical isolates. **Methods:** The REMA methodology (Resazurin Microtiter Assay Plate) was standardized to assess antimicrobial activity. After that, a group of substances of isolated compounds, extracts and fractions was screened, totaling 187 compounds, of which 119 are synthetic and 68 natural. The compounds that showed the best results were chosen to follow the study of the determination of minimum inhibitory concentration. **Results and discussion:** A synthetic compound (RR103) and four natural compounds (AP1, AP10, AP12 and AP16) showed a great inhibition of bacterial viability of 88.6%, 89.9%, 85.5%, 98.8% and 86.5% respectively. Among the natural compounds, AP12 at a concentration of 100 mg/L obtained the best result, with inhibitory action of bacterial growth above 70% in all strains of *N.gonorrhoeae*, even in multiresistant strains such as the WHO W, WHO Y, WHO X and WHO Z. The synthetic compound RR103 showed limited antimicrobial activity, obtaining a minimum inhibitory concentration that varies depending on the strain used in the assay. **Conclusion:** The natural compound AP12 proved to be a potential candidate for future studies on the development of new drugs, as it demonstrates its activity without depending on the different resistance mechanisms expressed by the different strains tested, in addition to have a chemical structure that makes it possible to be a drug. orally, favoring its access and use for the population.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*; microdilution; resazurin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZT	Azitromicina
CDC	do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFX	Cefixima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CRO	Ceftriaxona
CYP	Citocromo
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EC50	Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
GARDP	do inglês <i>The Global Antibiotic Research and Development Partnership</i>
GW	Graver-Wade
HIV	do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IM	Intramuscular
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	do inglês <i>Multiple drug resistance</i>
MM	Massa Molar
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
REMA	do inglês <i>Resazurin Microtiter Assay Plate</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VO	Via oral
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
XDR	do Inglês <i>extensively drug resistant</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa das concentrações dos inóculos e os volumes de resazurina.....	24
Figura 2:Esquema das testagens dos compostos em quadruplicata.....	26
Figura 3: Esquema das testagens dos compostos em quadruplicata.....	27
Figura 4: Esquema do modelo da determinação da concentração inibitória mínima:.....	29
Figura 5: Microplaca de diluição após a incubação em estufa a 37°C.	31
Figura 6: Resultados da leitura do controle positivo.	31
Figura 7: Resultados da leitura do controle negativo.	32
Figura 8: Resultados da leitura do branco.....	32
Figura 9: Resultados do crescimento bacteriano com volume de 20 µL de resazurina 0,1 mg/mL (0.01%).	33
Figura 10: Resultados do crescimento bacteriano com volume de 30 µL de resazurina 0,1 mg/mL (0.01%).	33
Figura 11: Resultados do crescimento bacteriano com volume de 50 µL de resazurina 0,1 mg/mL (0.01%).	34
Figura 12: Crescimento do inóculo em ágar Chocolate na estufa de CO ₂ após incubação de 60 minutos em contato com a resazurina.	36
Figura 13: Coloração de Gram de uma colônia oriunda da placa de ágar Chocolate após incubação em contato com a resazurina.....	36
Figura 14: Placa da curva da determinação da concentração inibitória mínima utilizando a cepa WHO F de <i>N.gonorrhoeae</i>	39
Figura 15: Placa da curva da determinação da concentração inibitória mínima utilizando a cepa WHO L de <i>N.gonorrhoeae</i>	40
Figura 16: Resultado da placa após incubação com a conversão de resazurina em resorufina.....	41
Figura 17: Estrutura do composto AP1 (9'-hidroxisargaquinona).	42
Figura 18: Estrutura do composto AP12 (sargatetraol).	43
Figura 19: Estrutura da substância AP10 (fucoxantina).	43
Figura 20: Estrutura do composto RR103 (5-(azidometil)-3-(4-metoxifenil)isoxazol).	44
Figura 21: Placa contendo os inóculos bacteriano (WHO L) em contato com as diferentes concentrações dos compostos.....	44

Figura 22: Placa contendo o inóculo de cepa WHO O de <i>N.gonorrhoeae</i> após incubação em estufa de CO2 em contato com a resazurina.	46
Figura 23: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de <i>N.gonorrhoeae</i> em contato com o composto AP1.....	47
Figura 24: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de <i>N.gonorrhoeae</i> em contato com o composto AP10.....	47
Figura 25: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de <i>N.gonorrhoeae</i> em contato com o composto AP12.....	48
Figura 26: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de <i>N.gonorrhoeae</i> em contato com o composto AP16.....	48
Figura 27: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de <i>N.gonorrhoeae</i> em contato com o composto RR103.....	49
Figura 28: Resultado da viabilidade bacteriana (%) em relação a estipulação de diferentes concentrações dos compostos testados, utilizando a cepa WHO F de <i>N.gonorrhoeae</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração inicial a partir da solução estoque e concentração final n: microdiluição.....	28
Tabela 2: Resultado da leitura qualitativa da curva determinação da concentração inibitória mínima das diferentes concentrações dos compostos em contato com os inóculos bacterianos de cada cepa de <i>N.gonorrhoeae</i>	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 NEISSERIA	15
2.2. GONORREIA	15
2.2.1 Diagnóstico	16
2.2.2 Tratamento	16
2.2.3 Epidemiologia	17
2.2.4 Resistência aos antimicrobianos.....	18
2.3 Fármacos em pesquisa para o tratamento de gonorreia.....	19
2.4 Produtos naturais	19
3.OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4.MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Compostos:	22
4.2 Produção do Caldo Graver-Wade (GW):.....	22
4.3 Preparo da solução de uso dos compostos:	22
4.4 Cepa bacteriana e condições de crescimento:	23
4.5 Inóculo bacteriano:.....	23
4.6 Preparo da resazurina (Alamar Blue):.....	23
4.7 Padronização do volume de resazurina (Alamar Blue):.....	24
4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana:	25
4.9 Determinação da concentração inibitória mínima:	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 PADRONIZAÇÃO DO VOLUME DE RESAZURINA E CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO	30
5.2 TRIAGEM DOS COMPOSTOS:.....	40
5.3 COMPOSTOS	42
5.3.1 AP1	42
5.3.2 AP12	42
5.3.3 AP10	43

5.3.4 AP 16.....	43
5.3.5 RR103	43
5.4 CURVA DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	44
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE A: Informações dos compostos sintéticos e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de <i>N. gonorrhoeae</i>, após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO2 por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.	69
APÊNDICE A: Informações dos compostos sintéticos e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de <i>N. gonorrhoeae</i>, , após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO2 por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.	70
APÊNDICE C - Gráfico da porcentagem de crescimento referente a cada cepa de <i>N.gonorrhoeae</i>.....	75
ANEXO A - Perfil de sensibilidade e resistência das cepas de referência WHO de <i>N.gonorrhoeae</i> (n=14)	80

1. INTRODUÇÃO

Neisseria gonorrhoeae (gonococo) é um diplococo gram-negativo, patógeno humano obrigatório e caracteriza-se por ser o agente etiológico da gonorreia, uma infecção sexualmente transmissível (1), que acomete cerca de 156 milhões de pessoas a cada ano (2). O gonococo infecta as membranas mucosas do trato genital inferior, reto, orofaringe, conjuntiva e em casos raros, pode evoluir para infecção sistêmica. A infecção pode ser assintomática ou com manifestações clínicas como secreção endocervical e uretral. Pode evoluir para epididimite em homens e salpingite em mulheres e, quando não tratada, pode causar infertilidade, sendo considerada uma das causas mais comuns dessa complicação no gênero feminino (3).

Em homens sintomáticos o diagnóstico laboratorial da gonorreia pode ser realizado por meio de esfregaço de secreção uretral corado pelo método de Gram. No entanto, em infecções assintomáticas e/ou extragenitais a coloração de Gram não é recomendada devido a sua baixa sensibilidade, resultante da presença de *Neisserias* comensais nesses nichos. A cultura é um teste diagnóstico amplamente utilizado e tem como principal vantagem, a possibilidade de realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Devido a característica fastidiosa de *N. gonorrhoeae*, a viabilidade dos isolados deve ser preservada por utilização de meio de transporte específico e meios de cultura enriquecidos como ágar Chocolate e/ou enriquecidos e seletivos como ágar Thayer-Martin. O meio seletivo é indispensável especialmente para amostras de sítios com microbiota residente abundante, como orofaringe e reto (4).

Em 2018 foi publicado o primeiro estudo brasileiro de vigilância da resistência *in vitro* do gonococo – o Projeto Sengono, realizado entre 2015 e 2016, numa parceria entre o Ministério da Saúde e a Universidade Federal de Santa Catarina. Nesse estudo, foram coletadas amostras de secreção uretral masculina em sete centros da Rede de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana do Gonococo: Porto Alegre, Florianópolis, São Paulo, Belo Horizonte, Brasília, Salvador e Manaus representando todas as regiões brasileiras. Além da resistência já bem estabelecida às sulfas, tetraciclina e penicilinas, o estudo constatou resistência em expansão ao ciprofloxacino (CIP), com taxas superiores a 50% em todas as regiões do país. Embora, as amostras de *N.gonorrhoeae* tenham sido sensíveis às cefalosporinas de terceira geração, verificou-se isolados com diminuição da sensibilidade à cefixima (CFX) e ceftriaxona (CRO) (5). Os resultados do estudo suscitaram imediata resposta do Ministério da Saúde, que atualizou as recomendações de

tratamento no território nacional para infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto), desaconselhando a utilização do CIP e adotando a terapia dupla com CRO 500mg intramuscular (IM) associada à azitromicina (AZT) 1g via oral (VO) em dose única (6).

O gonococo tem chamado a atenção mundial pela sua grande capacidade de desenvolver e adquirir resistência aos agentes antimicrobianos (7). Na maioria dos países, o tratamento empírico para gonorreia é a utilização de CRO em associação com AZT (8,9). A resistência à CRO foi inicialmente relatada no Japão no ano de 2011 (10). Posteriormente, isolados resistentes foram descritos novamente no Japão, Espanha, Austrália e França (11,12,13,14). Devido a descrição crescente de isolados resistentes à CRO, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) incluiu *N.gonorrhoeae* na lista de organismos na qual a resistência aos antimicrobianos é considerada uma ameaça à saúde pública (15).

A partir de 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um plano mundial de estratégias para conter a transmissão e impacto da resistência antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, e propôs como prioridade as estratégias de avaliação de novos antimicrobianos ou terapias alternativas para o tratamento da infecção gonocócica (16). Segundo a OMS, um composto ideal para primeira linha de tratamento deverá ser altamente eficaz, amplamente disponível em qualidade apropriada, ter uma boa relação de custo e dose, sem toxicidade e possivelmente em uma dose única com taxa de cura > 95 % dos pacientes infectados (16). Nos últimos anos, diversos derivados e análogos de antimicrobianos desenvolvidos mostraram atividade *in vitro* contra *N.gonorrhoeae*. Isso inclui novas fluorquinolonas (17,18), tetraciclina (19), carbapenênicos (20) e macrolídeos (21,22). A solitromicina é o primeiro fluorocetolídeo que recentemente entrou em estudo clínico, sendo da mesma classe do antimicrobiano AZT (23,24). Um estudo preliminar realizado na Índia em 2005, demonstrou atividade antimicrobiana de extratos de *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifoliae*, *Anonnas quamosa* em *N.gonorrhoeae* (25), quando comparada com AZT e beta-lactâmicos. Jacobsson e colaboradores demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro* da nova moditromicina de biciclólídeos em isolados clínicos na Suécia (26). Porém, o mesmo estudo identificou resistência cruzada em isolados com resistência de alto nível à AZT.

Com o incentivo de desenvolvimento e pesquisa de novos medicamentos, a parceria global de pesquisa e desenvolvimento de antibióticos, do inglês *The Global Antibiotic Research and Development Partnership* (GARDP), o zoliflodacino (inibidor da DNA topoisomerase II) é o potencial antimicrobiano que, após resultados promissores da

fase II, está sendo avaliado para um estudo global de fase III. O estudo, que está avaliando a eficácia e a segurança do zoliflodacino em relação aos tratamentos padrão, deve incluir 1.000 pessoas com gonorreia nos Estados Unidos, Holanda, Tailândia e África do Sul. Além disto, o zoliflodacino também foi projetado como uma opção de tratamento oral, com potenciais benefícios em comparação com o atual padrão de tratamento de injeções intramusculares (IM) (27).

A crescente e alarmante descrição de isolados resistentes à última linha de tratamento recomendado internacionalmente para gonorreia vem incentivando a busca por novas opções terapêuticas (16,28).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi de avaliar o desempenho e verificar o potencial antimicrobiano de compostos sintéticos e naturais em *N.gonorrhoeae*, utilizando isolados de coleção e isolados clínicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEISSERIA

Neisseria gonorrhoeae pertence ao gênero *Neisseria*, do qual *N.gonorrhoeae* (gonococo) é um patógeno obrigatório do gênero e *Neisseria meningitidis* (meningococo) é um patógeno oportunista, em que existem relatos de colonização de 10% da população sem desenvolver a infecção (29). Além dessas, ainda existem oito espécies de *Neisseria* comensais da microbiota nasal e da orofaringe (30). Análises filogenéticas mostram que *N.gonorrhoeae* e *N. meningitidis* evoluíram de um ancestral comum não patogênico, mas agora representam linhagens separadas que ocupam nichos distintos, a mucosa genital e a mucosa nasofaríngea, respectivamente (31,32). Embora *N. meningitidis* possa suportar a desidratação, sobreviver fora do hospedeiro humano por períodos e ter transmissão via gotículas respiratórias, *N.gonorrhoeae* é inviável se desidratada ou exposta a temperaturas não fisiológicas, sendo considerada uma bactéria fastidiosa. Os eventos que levaram à evolução de dois organismos que são altamente semelhantes no genoma e na fisiologia do núcleo e causam doenças distintas em diferentes locais do corpo humano, ainda não são compreendidos (33).

2.2. GONORREIA

A gonorreia é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada por *N.gonorrhoeae*, sendo transmitida pelo contato íntimo desprotegido. As manifestações clínicas são distintas entre os sexos, majoritariamente sintomáticas nos homens e assintomáticas nas mulheres. A gonorreia retal e faríngea, geralmente assintomáticas, são identificadas principalmente em homens que fazem sexo com homens (HSH), no entanto, dependendo das práticas sexuais, pode ser encontrada em ambos os sexos. Se a infecção urogenital permanecer sem ser detectada ou se não for tratada adequadamente, ela pode atingir o trato genital superior e resultar em complicações reprodutivas graves (principalmente, mas não exclusivamente, em mulheres), como endometrite, doença inflamatória pélvica, resultando em infertilidade ou perda involuntária durante a gravidez ectópica, e em homens, pode ocasionar edema peniano, prostatite e epididimite. A conjuntivite pode ocorrer quando há infecção ocular por meio das secreções genitais e em recém-nascidos durante o parto vaginal de mãe infectada, ocasionando oftalmia neonatal, que e em alguns casos, leva à cegueira. A infecção gonocócica disseminada pode ocorrer em ambos os sexos, mas atualmente é pouco descrita (34,16,35).

2.2.1 Diagnóstico

Em homens sintomáticos o diagnóstico laboratorial da gonorreia pode ser realizado por meio de esfregaço de secreção uretral corado pelo método de Gram. Na coloração de Gram, os gonococos podem ser identificados por microscopia (ampliação, 1.000 X) como diplococos Gram negativos intracelulares em leucócitos polimorfonucleares. No entanto, em infecções assintomáticas e/ou extragenitais a coloração de Gram não é recomendada devido a sua baixa sensibilidade. A cultura é um teste diagnóstico amplamente utilizado e tem como principal vantagem, a possibilidade de realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Devido a característica fastidiosa de *N.gonorrhoeae*, a viabilidade dos isolados deve ser preservada por utilização de meio de transporte específico e o isolamento necessita de meios de cultura enriquecidos como ágar Chocolate e/ou de meios enriquecidos e seletivos como ágar Thayer-Martin, no qual são adicionados vancomicina, colistina, trimetoprim e nistatina. O meio seletivo é indispensável especialmente para amostras de sítios com microbiota residente abundante, como orofaringe e reto (36).

2.2.2 Tratamento

O tratamento empírico da gonorreia na maioria dos países é a utilização de CRO em associação com AZT (8,9).

Pelo histórico do gonococo relacionado ao desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da gonorreia, o uso de terapia combinada de dois antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação (por exemplo, uma cefalosporina e um macrolídeo) melhora a eficácia do tratamento e auxilia a retardar o surgimento e a disseminação de cepas resistentes aos antimicrobianos. O uso de AZT como segundo ATM é preferível à doxiciclina devido às vantagens de conveniência, conformidade da terapia de dose única e à prevalência substancialmente mais alta de resistência gonocócica à tetraciclina do que à AZT entre isolados do Projeto de Vigilância de isolados gonocócicos (GISP) dos Estados Unidos da América, particularmente em cepas com concentração inibitória mínima (CIM) de CFX elevada (37). Dados limitados sugerem que a terapia dupla com AZT pode aumentar a eficácia do tratamento para infecção faríngea ao usar cefalosporinas orais (38). Além disso, pessoas infectadas com *N.gonorrhoeae* frequentemente são coinfectadas com *Chlamydia trachomatis*. Esse achado levou à recomendação de que as pessoas tratadas para infecção gonocócica também sejam tratadas

com um regime eficaz contra a infecção genital não complicada por *C. trachomatis*, apoiando ainda mais o uso de terapia dupla que inclui AZT (39).

No Brasil, conforme *N.gonorrhoeae* adquiriu e desenvolveu genes de resistência aos antimicrobianos, os protocolos clínicos e as diretrizes terapêuticas referentes à gonorreia sofreram alterações. Em 1999, o Ministério da Saúde brasileiro preconizou a utilização de uma ampla variedade de antimicrobianos para o tratamento da gonorreia, dentre os quais, a ofloxacina dose única (400 mg) pela via oral (VO); dose única de CFX (400 mg) VO; dose única de CIP (500 mg) VO; dose única de CRO (250 mg) via IM; ou uma única dose de tianfenicol (2,5 g) VO (40).

No entanto, o Ministério da Saúde publicou, em 2006, um novo manual que alterou tais opções terapêuticas para terapia dupla, recomendando duas opções para o tratamento da gonorreia e da clamídia concomitantemente. A primeira opção consistia no uso de uma única dose de CIP (500 mg) VO ou dose única de CRO (250 mg) IM associada com dose única de AZT (1 g) VO ou doxicilina (100 mg) VO por 7 dias. Já a segunda opção de tratamento compreendia o uso de uma única dose de CFX (400 mg) VO, dose única de ofloxacina (400 mg) VO ou dose única de 2 g espectinomicina via IM concomitante com eritromicina (500 mg) VO, tetraciclina (500 mg) VO ou ofloxacina (400 mg) VO (41).

Com a publicação do estudo brasileiro de vigilância da resistência *in vitro* do gonococo – o Projeto Sengono (5). O Ministério da Saúde, atualizou as recomendações de tratamento no território nacional para infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto), desaconselhando a utilização de CIP e adotando a terapia dupla com CRO 500mg IM associada à AZT 1g VO em dose única (6).

2.2.3 Epidemiologia

A prevalência das infecções por *N.gonorrhoeae* é a segunda mais alta dentre as ISTs bacterianas, sendo o primeiro lugar ocupado pelas infecções por *C. trachomatis*. Entre 2005 e 2008, o número de casos reportados globalmente de infecções gonocócicas aumentou em 21% em adultos entre 15 e 49 anos (42). Além disso, estima-se que ocorreram 106,1 milhões de casos novos de infecção por *N.gonorrhoeae* em 2008 no mundo (42). Tal incidência varia de acordo com as diferentes regiões geográficas, sendo que a região do Pacífico Ocidental, que abriga países como Camboja, Vietnã, Filipinas, República da Coreia, os quais possuem um baixo índice de desenvolvimento econômico, possui a maior incidência com 42 milhões de novos casos em 2008 (8).

A prevalência mundial da infecção por *N.gonorrhoeae* em mulheres é estimada em 0,9% e nos homens em 0,7% (2). A comparação dessa prevalência com aquela encontrada no Brasil é dificultada pelos poucos estudos disponíveis, bem como seus resultados conflitantes, variando entre 0,7% e 18% de infecções por *N.gonorrhoeae* em homens e mulheres (43,44,45). A falta de informação sobre a epidemiologia das infecções por *N.gonorrhoeae* também se deve ao fato de tais infecções não integrarem a lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória. Dessa forma, as informações disponíveis, atualmente, são baseadas em estudos envolvendo determinadas parcelas da população, o que não reflete o cenário do território brasileiro.

2.2.4 Resistência aos antimicrobianos

O controle da saúde pública da gonorreia depende totalmente do tratamento apropriado, juntamente com esforços de prevenção generalizados e direcionados, uso de métodos diagnósticos eficazes, processos de notificação de parceiros e vigilância epidemiológica. A terapia deve curar casos individuais para reduzir o risco de complicações e impedir a transmissão adicional da infecção. Considerando o grande número de casos anuais estimados (156 milhões) (2) em todo o mundo, o monitoramento da resistência em *N.gonorrhoeae* tem implicações consideráveis no controle da gonorreia.

A perspectiva do aumento do número de cepas gonocócicas que exibem resistência a multidrogas (MDR) e resistência extensiva aos antimicrobianos (XDR), incluindo resistência à CRO, a última opção restante para monoterapia empírica de primeira linha em muitos contextos, é motivo de grande preocupação (14).

A primeira cepa gonocócica com alto nível de resistência à CRO (H041) foi isolada da faringe de uma mulher na cidade de Kyoto no Japão no ano de 2011 (10). O surgimento de cepas resistentes à CRO ressalta preocupações para controlar a gonorreia pelo motivo de que CRO é amplamente recomendada e é o tratamento de primeira linha para gonorreia na maioria dos países do mundo. Posteriormente, isolados resistentes foram descritos na França, Espanha e Austrália (14,12,13).

Em 2018, na Inglaterra foi descrito o primeiro caso de infecção uretral e faríngea por *N.gonorrhoeae* resistente à CRO associada à resistência de alto nível para AZT. O paciente obteve cura após o tratamento com ertapenem, antimicrobiano reservado para uso hospitalar (46).

2.3 Fármacos em pesquisa para o tratamento de gonorreia

Solitromicina é o primeiro fluorocetolídeo que recentemente entrou em desenvolvimento clínico, pertence à mesma classe do antimicrobiano AZT (47,23). Já são descritos estudos *in vitro* da atividade desse medicamento em comparação com outros antimicrobianos utilizados no tratamento (21), obtendo menor CIM e melhor estabilidade em meio ácido quando comparado à AZT (48). No estudo clínico de fase II, foram testadas duas concentrações do antimicrobiano (solitromicina 1200 mg e 1000 mg) para tratamento de gonorreia não complicada, os resultados mostraram atividade em ambas as doses (49). O estudo de fase III multicêntrico realizado nos Estados Unidos da América e na Austrália avaliou a eficácia e segurança da solitromicina em dose única VO em comparação à terapia combinada de dose IM de CRO (500 mg) mais dose oral de AZT (1000 mg), porém, foi identificada uma taxa maior de efeitos adversos e houve falha terapêutica, comprovada por cultura positiva após sete dias de tratamento em comparação com o tratamento de primeira linha. Isso demonstra que a Solitromicina em dose única não é uma alternativa segura de tratamento para da gonorreia, devido à insuficiência de duração da exposição do medicamento no sítio da infecção. Entretanto, os novos estudos com esse medicamento devem considerar o potencial do risco gastrointestinal e a elevação das enzimas hepáticas. (50,51).

Outro medicamento em estudo é o Zoliflodacin (AZD0914 e ETX0914), espiropirimidinatriona, que está em estudo clínico de fase III. Este novo medicamento tem como mecanismo de ação a inibição da biossíntese de DNA bacteriano por meio da inibição de topoisomerases do tipo II, que incluem a DNA girase e topoisomerase IV. Embora ETX0914 e CIP tenham como alvo a DNA girase, os diferentes modos de ligação são funcionalmente efetivos e suficientes para o ETX0914 inibir o crescimento de cepas resistentes ao CIP (52).

2.4 Produtos naturais

Os produtos naturais possuem enorme diversidade estrutural e química que não pode ser comparada por quaisquer bibliotecas sintéticas de pequenas moléculas e continuam a inspirar novas descobertas nas áreas da química, biologia e medicina. Acredita-se que o sucesso de produtos naturais como moléculas líderes no desenvolvimento de novos fármacos seja devido à sua ‘pré-validação biológica’: organismos produzem metabólitos secundários que, ao longo da evolução, foram modificados para serem capazes de interagir com alvos biológicos (53).

Uma vez estudados, esses produtos são otimizados para melhorar sua estrutura e muitas vezes sua atividade e estabilidade (54). A história da medicina está cheia de eventos notáveis de como a descoberta de um produto natural que impactou profundamente os avanços na biologia e inspirou a descoberta de medicamentos.

William C. Campbell e Satoshi Omura foram os ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2015 pela descoberta da Avermectina, produto natural, que originou a ivermectina, medicamento usado no tratamento de infecções parasitárias (em especial por nematódeos). Esse medicamento reduziu significativamente o índice de mortalidade e trouxe otimismo para novas descobertas com produtos naturais (55).

Com a pesquisa de novos medicamentos em expansão, em especial os de fontes naturais, espera-se identificar compostos com potencial atividade antimicrobiana em doses que viabilizem a continuidade dos estudos para o desenvolvimento de fármacos. Para isso, os compostos deverão apresentar resultado satisfatório no ensaio de determinação da concentração inibitória mínima que poderão ser guia de novos estudos da fase pré-clínica.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho e verificar o potencial antimicrobiano de compostos sintéticos e naturais em *N.gonorrhoeae*, utilizando isolados de coleção e isolados clínicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o volume de resazurina e concentração do inóculo bacteriano;
- Triar o potencial antimicrobiano em um conjunto de compostos naturais e sintéticos;
- Verificar a atividade antimicrobiana dos compostos triados utilizando um painel de 15 cepas de referência de *N.gonorrhoeae*;
- Avaliar a curva da determinação da concentração inibitória mínima dos compostos com melhor atividade antimicrobiana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos:

Os compostos utilizados foram cedidos pelas professoras Dr^a. Miriam de Barcellos Falkenberg e Dr^a. Lílian Sibelle Campos Bernardes (Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil). O grupo de substâncias compreende compostos isolados, extratos e frações, totalizando 187 compostos, dos quais 119 são sintéticos e 68 são naturais. Entre os compostos naturais estão as espécies do grupo das algas vermelhas (*Laurencia catarinenis* e *Laurencia dendroide*), algas pardas (*Dictyoteris jolyana*, *Dictyoteris plagiogramma*, *Dictyoteris delicatula*, *Distyopteris justii* e *Dictyopteris sp.*), algas marrons (*Desmarestia mezesii*, *Desmarestia anceps* e *Ascoseira mirabilise*) e macroalga (*Palmaria decipiens*).

4.2 Produção do Caldo Graver-Wade (GW):

A produção do caldo GW foi realizada de acordo com protocolo estabelecido por Graver e Wade (2007) (56): foi preparado 1 litro do meio de cultura celular M199 (comercialmente disponível com sais de Earle, mas sem L-glutamina, vermelho de fenol e bicarbonato de sódio; Sigma-Aldrich®) em água destilada. Ao meio M199, adicionou-se 500 mL de água destilada com glicose (10,0 g; 37 mM), bicarbonato de amônio (2,0 g; 17 mM), acetato de sódio tri-hidratado (1,0 g; 4,9 mM), L-glutamina (0,75 g; 3,4 mM), espermidina (0,2 g; 919 µM), L-arginina (0,1 g; 383 µM), hipoxantina (0,05 g; 245 µM), uracilo (0,05 g; 298 µM), oxaloacetato (0,05 g; 252 µM), cloridrato de tiamina (0,05 g; 99 µM), L-ornitina (0,01 g; 39 µM), dinucleotídeo de nicotinamida adenina (0,01 g; 10 µM) e DL-lactato de sódio (2,5 mL xarope a 60% p/p; 13 mM). Hipoxantina e Uracilo foram dissolvidos cada um em 3 mL de NaOH 1M. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O pH foi ajustado para 6,8 com HCl 1M e o caldo esterilizado à vácuo por filtração em 0,22 µm. O caldo foi armazenado em geladeira em temperatura (2-8°C) por até 15 dias.

4.3 Preparo da solução de uso dos compostos:

Os compostos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se a concentração de 10000 mg/L (solução de estoque), e em seguida, foram diluídos em caldo

GW na concentração de 1000 mg/L (solução de uso), para utilização no ensaio de microdiluição.

4.4 Cepa bacteriana e condições de crescimento:

A cepa de referência WHO K de *N.gonorrhoeae* (57) foi utilizada para a realização da triagem inicial dos compostos.

Após o ensaio de triagem, realizou-se o ensaio de determinação da concentração inibitória mínima dos compostos avaliados com melhor atividade antimicrobiana utilizando-se um painel contendo 15 isolados de *N.gonorrhoeae*.

Todas as cepas de *N.gonorrhoeae* foram armazenadas em caldo Casoy com 20 % de glicerol em freezer -80°C. Na semana da realização dos ensaios dos compostos, as cepas utilizadas foram descongeladas e semeadas em placas de ágar Thayer Martin (Laborclin®) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por 16-18 horas e repicada em placa de ágar Chocolate (Laborclin®) e incubada nas mesmas condições por mais 16-18 horas.

Para a realização do ensaio da concentração inibitória mínima foram utilizadas as 15 cepas de referência de *N. gonorrhoeae*.

O perfil de sensibilidade e resistência de cada cepa utilizada está descrito no Anexo A.

4.5 Inóculo bacteriano:

Após o crescimento das cepas de *N.gonorrhoeae* no ágar Chocolate (Laborclin®), foi realizado o inóculo 0.5 McFarland verificado em DensiCheck® (Biomérieux, França). Pipetou-se 1 mL desse inóculo em um tubo tipo Falcon de 50 mL, já contendo 14 mL do Caldo GW aquecido em banho maria a 37 °C, obtendo-se a concentração final do inóculo de 1×10^7 UFC/mL.

4.6 Preparo da resazurina (Alamar Blue):

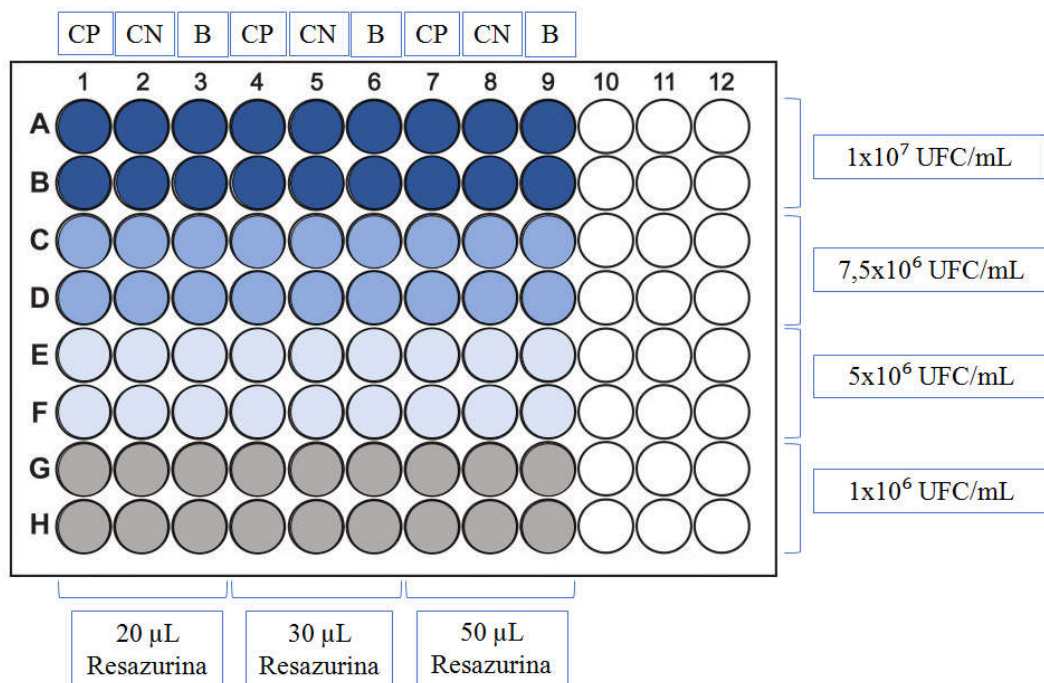
O pó de resazurina sal sódico (Sigma-Aldrich®) foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4) estéril na concentração final de 0,1 mg/mL (0.01%). Foram pesados 5 mg do pó e adicionados 50 mL de PBS (pH 7,4) estéril. Logo após o preparo da solução de resazurina, o corante foi esterilizado a através do filtro de 0,22 µm e armazenado em geladeira entre 2 e 8°C.

4.7 Padronização do volume de resazurina (Alamar Blue):

Foram realizadas quatro (4) concentrações diferentes e decrescentes do inóculo da cepa de referência WHO K de *N.gonorrhoeae* (1×10^7 UFC/mL; $7,5 \times 10^6$ UFC/mL; 5×10^6 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL). Durante o ensaio, foi pipetado 1 mL do inóculo na concentração de 0.5 da escala de McFarland em 14 mL de caldo GW, obtendo-se a concentração de 1×10^7 UFC/mL. Para as outras concentrações foram transferidos 0,75 mL, 0,5 mL e 0,1 mL do inóculo (0.5 McFarland) em tubo contendo 14 mL do caldo GW cada, assim obtendo $7,5 \times 10^6$ UFC/mL, 5×10^6 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL respectivamente. Além dessas concentrações, foram utilizados volumes diferentes de resazurina (20 μ L, 30 μ L e 50 μ L).

Em cada poço (placa de microdiluição estéril de 96 poços e fundo em U) (Kasvi®) foram adicionados 90 μ L de cada concentração dos inóculos, como demonstrado na figura 1. No controle positivo (controle de efetividade da atividade antimicrobiano) foram adicionados 10 μ L de solução de Triton x-100 em etanol e no controle negativo (presença do crescimento das bactérias), 10 μ L de PBS (pH 7,4) estéril. Já nos poços referentes ao branco, pipetou-se somente 100 μ L do caldo GW.

Figura 1: Mapa das concentrações dos inóculos e os volumes de resazurina.



Fonte: Próprio autor, 2020. CP: Controle positivo (Coluna 1, 4 e 7); CN: Controle negativo (Coluna 2, 5 e 8); B: Branco (Coluna 3, 6 e 9). A1 a A9 e B1 a B9 Concentração do inóculo de 1×10^7 UFC/mL; C1 a C9 e D1 a D9 Concentração do inóculo de $7,5 \times 10^6$ UFC/mL; E1 a E9 e F1 a F9 Concentração do inóculo de 5×10^6 UFC/mL; G1 a G9 e H1 a H9 Concentração do inóculo de 1×10^6 UFC/mL. Os volumes de resazurina utilizados estão demonstrados nas colunas 1, 2 e 3 para o volume de 20 μ L; 4, 5 e 6 para o volume de 30 μ L; 7, 8 e 9 para o volume de 50 μ L. UFC: Unidade formadora de colônias.

Após o tempo de incubação de 6 horas, realizou-se a coloração de Gram com uma alíquota do poço do controle negativo para confirmação de crescimento bacteriano (Diplococos gram negativos) e avaliação de contaminação do caldo GW. Por fim foram adicionados os volumes de resazurina (20 μ L, 30 μ L e 50 μ L). A placa foi incubada novamente por mais 60 minutos e a leitura da fluorescência foi realizada no fluorímetro (LS 55 PerkinElmer®) nos comprimentos de onda de 560 e 590 nm.

Foram avaliados os melhores volumes de resazurina e as concentrações dos inóculos bacterianos utilizados no ensaio, a fim de definir o protocolo para as etapas posteriores. Este deve ter uma boa conversão da resazurina em resarufina sem ultrapassar o limite de detecção de fluorescência no fluorímetro (LS 55 PerkinElmer®) (58).

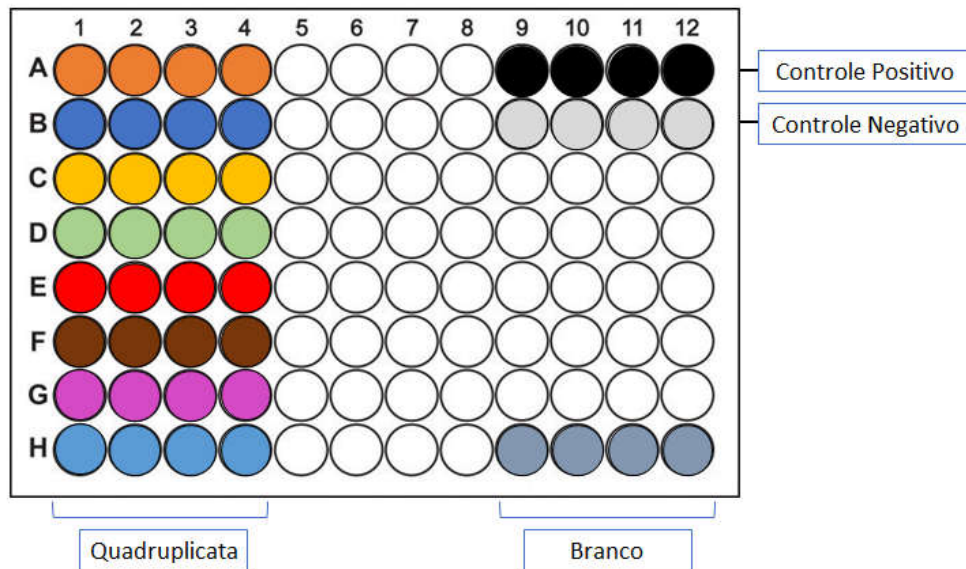
4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana:

Para avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizada a metodologia REMA (do inglês, *Resazurin Microtiter Assay Plate*) (58). Foram pipetados 10 μ L de cada composto (solução de uso) em quadruplicata na placa de microdiluição estéril de 96 poços e fundo em U (Kasvi®) e em seguida 90 μ L do inóculo bacteriano da cepa WHO K de *N.gonorrhoeae* preparado previamente. Após o período de incubação (6 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$) em estufa com 5 % CO_2 e atmosfera úmida, foi adicionado o volume de resazurina (Alamar blue) definido após a padronização. As placas de reação (Kasvi®) foram incubadas novamente durante 60 minutos. A concentração final de cada composto testado foi de 100 mg/L.

A determinação da fluorescência foi realizada no equipamento fluorímetro (LS 55 PerkinElmer®) nos comprimentos de ondas de 560 e 590 nm. Para cada rodada de testes (placa de 96 poços) foram utilizados: Controle positivo (10 μ L de Triton x-100 em Etanol), controle negativo (10 μ L de PBS estéril) e branco (100 μ L do caldo GW).

Os compostos foram testados em três dias diferentes, com o propósito de realizar triplicata biológica, sendo que a cada dia o teste foi realizado em quadruplicata (Figura 2), configurando replicatas técnicas. Foi calculada a média de cada quadruplicata para o cálculo de viabilidade.

Figura 2:Esquema das testagens dos compostos em quadruplicata.



Nota: Figura cedida por Álisson Bigolin

Legenda: as cores laranja, azul escuro, amarelo, verde, vermelho, marrom, rosa e azul claro (colunas 1 a 4) indicam locais de testagem de compostos em quadruplicata. Posições A9 a A12 correspondem ao controle positivo, B9 a B12 controle negativo e H9 a H12 branco.

A avaliação da viabilidade bacteriana frente a cada composto foi realizada comparando a fluorescência do controle negativo (100% de viabilidade bacteriana) em relação ao composto testado (Equação 1) (58).

$$\% \text{ de Crescimento Bacteriano} = \frac{(fC - fB) \cdot 100}{fCN - fE} \quad (1)$$

Em que: fCN representa a média da leitura da fluorescência do controle negativo, fB a média da leitura do Branco e fC a média da leitura de cada composto testado.

Foram analisadas as porcentagens de crescimento bacteriano frente a cada composto com o propósito de selecionar os compostos com maior atividade para proceder com a etapa posterior de ensaio da determinação da CIM.

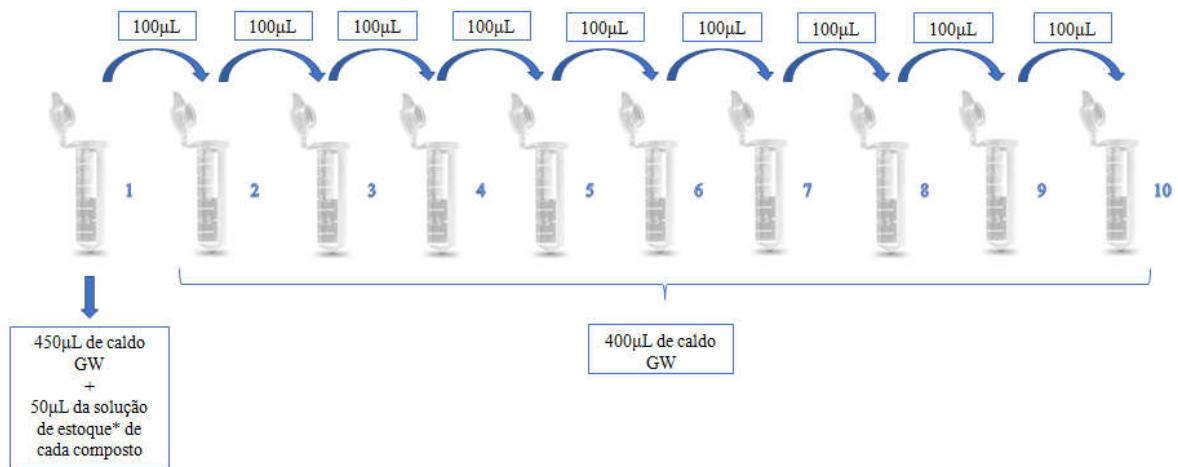
Foi considerada atividade antimicrobiana quando o tratamento das bactérias com o composto apresentou crescimento inferior a 30%.

4.9 Determinação da concentração inibitória mínima:

Para a realização da determinação CIM, as 15 cepas de referência de *N.gonorrhoeae* (57) foram descongeladas em 15 de em placas de ágar Thayer Martin (Laborclin®) a 35 ± 1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 16 a 18 horas e repicadas em placa de ágar Chocolate (Laborclin®) com incubação por mais 16 a 18 horas

A diluição dos compostos foi realizada em tubos de 2 mL. Para a diluição seriada foram adicionados 450µL de caldo GW no primeiro tubo e 400 µL nos tubos seguintes. Para cada composto utilizado, adicionaram-se 50 µL da solução de estoque (10000 mg/L) no primeiro tubo, obtendo a concentração de 1000 mg/L. A diluição seriada (1:5) foi realizada pipetando 100 µL da concentração anterior em 400 µL do caldo GW já pipetado (figura 3). As concentrações intermediárias de cada composto variaram de 1000 mg/L a 0,000512 mg/L)

Figura 3: Esquema das testagens dos compostos em quadruplicata.



Fonte: Próprio autor.*Solução estoque na concentração de 10000 mg/L.

Legenda: Tubos enumerados de 1 a 10 representando as diluições que foram realizadas a partir da solução de estoque. A concentração final no tubo 1 foi realizado com a adição de 450 µL de caldo GW mais 50 µL da solução estoque de cada composto. A partir do tubo 2 até o tubo 10 foram realizados as diluições 1:5 com adição de 400 µL de caldo GW mais a transferência de 100 µL do tubo anterior para o tubo correspondente. Concentração inicial partindo de 1000 mg/L (tubo 1) até a concentração de 0,000512 mg/L (tubo 10).

Na placa de microdiluição estéril de 96 poços e fundo em U (Kasvi®) foram adicionados 10 µL das soluções das concentrações dos compostos preparados

anteriormente. Nos primeiros poços (coluna 1), como controle positivo, foram adicionados 10 µL de Triton x100 em etanol ao invés dos compostos (Figura 4).

Para preparação do inóculo bacteriano utilizou-se um tubo do tipo Falcon de 50 mL onde foram adicionados 14 mL de caldo GW previamente aquecido em banho maria a 37°C e 1 mL do inóculo bacteriano na escala 0.5 McFarland, obtendo-se a concentração final do inóculo de 1×10^7 UFC/mL. Para cada cepa testada, foram adicionados 90 µL do inóculo preparado em cada poço na placa estéril de 96 poços (Kasvi®), já contendo 10 µL dos compostos com concentração decrescente (Figura 4). O conteúdo dos poços foi homogeneizado com o auxílio da micropipeta e a incubação foi feita durante 6 horas em estufa 35 ± 1 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

Para cada cepa de *N.gonorrhoeae* foi utilizada uma placa de microdiluição (Kasvi®).

O resultado das concentrações de cada diluição dos compostos está demonstrado na Tabela 1.

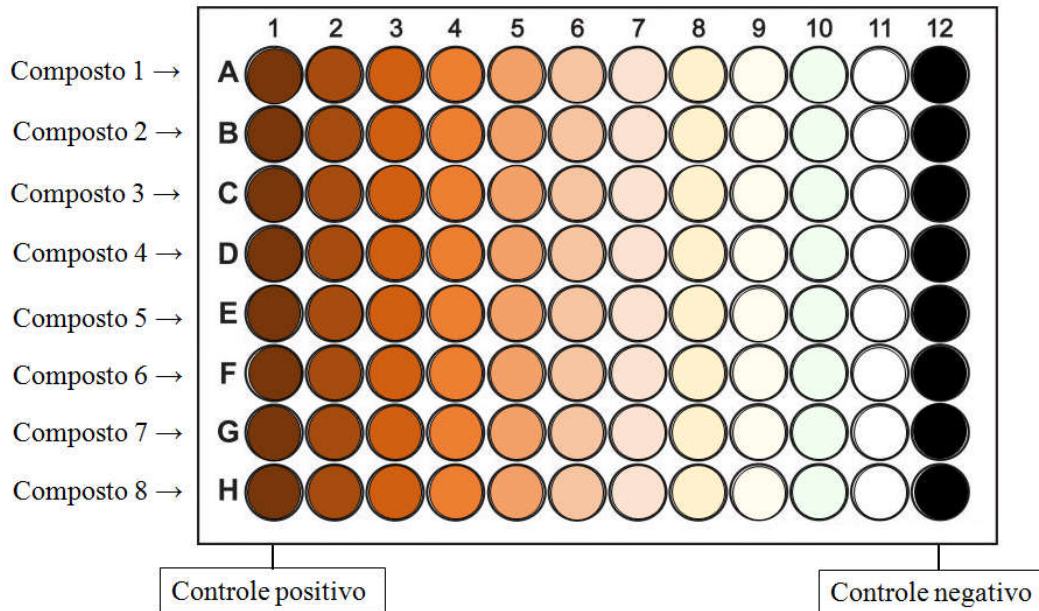
Tabela 1: Concentração inicial a partir da solução estoque e concentração final na placa de microdiluição.

	Concentrações dos compostos após diluição 1:5^a (mg/L)	Concentração final^b (mg/L)
1º tubo	1000	100
2º tubo	200	20
3º tubo	40	4
4º tubo	8	0,8
5º tubo	1,6	0,16
6º tubo	0,32	0,032
7º tubo	0,064	0,0064
8º tubo	0,0128	0,00128
9º tubo	0,00256	0,000256
10º tubo:	0,000512	0,0000512

Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: ^a:Diluição feita a partir da solução estoque de 10000 mg/L.^b:Concentração realizada após a adição de 10 µL das diluições dos compostos (1:5) mais 90 µL do inóculo bacteriano.

Figura 4: Esquema da determinação da concentração inibitória mínima:



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: Controle positivo (coluna 1): 10 μ L de Triton x-100 mais 90 μ L do inóculo bacteriano. Controle negativo (coluna 12): 10 μ L de PBS (pH 7,4) mais 90 μ L do inóculo bacteriano. Coluna 2 até a coluna 11 representa as concentrações decrescentes de cada composto, variando entre 100 mg/L a 0,0000512 mg/L.

A leitura foi realizada após a adição de 30 μ L da solução de resazurina na concentração de 0,1 mg/mL e incubação por mais 60 minutos a 35 ± 1 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂. A mensuração da intensidade da fluorescência foi de 560 nm e 590 nm de excitação no equipamento fluorímetro (LS 55 PerkinElmer®).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Microsoft Office Excel 2007. A avaliação da atividade antimicrobiana de cada composto sobre as diferentes cepas de *N.gonorrhoeae* foi quantificada pela curva da determinação da CIM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DO VOLUME DE RESAZURINA E CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

Com o objetivo de verificar possível interferência da fluorescência da resazurina no ensaio, foram realizadas as padronizações do volume deste reagente e a concentração do inóculo bacteriano para o estudo.

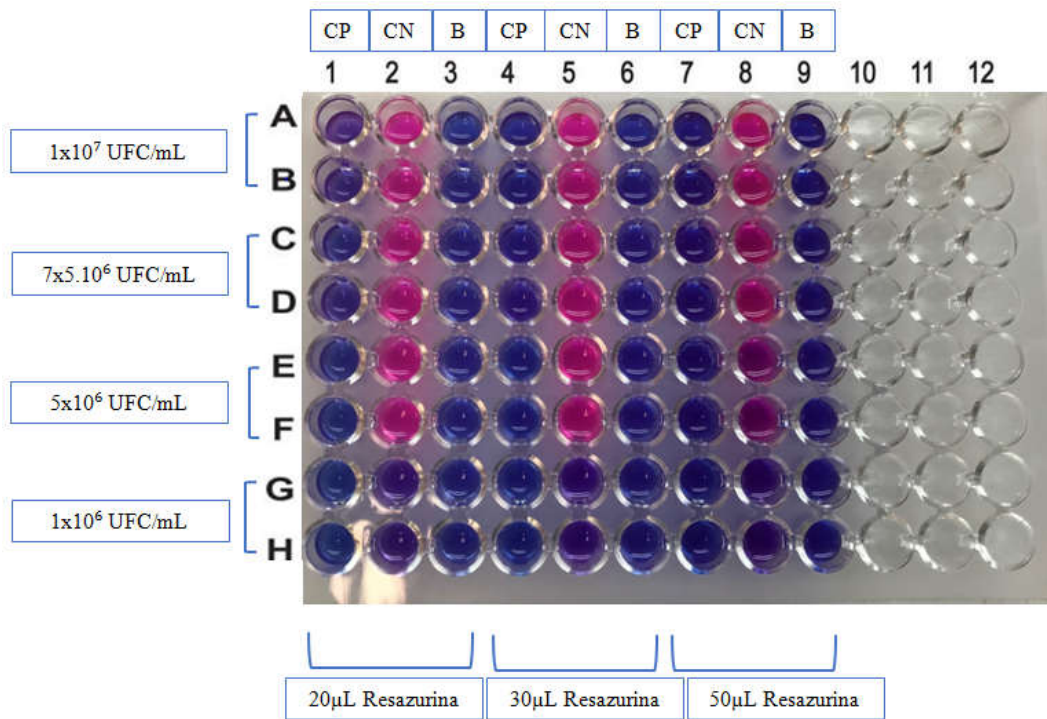
A princípio a detecção da fluorescência foi realizada no fluorímetro seguindo o protocolo de Foerster e colaboradores (58). No entanto, não foi possível a realização da análise de alguns controles e compostos devido a fluorescência estar além da faixa de leitura do equipamento.

Foram utilizadas, portanto, quatro (4) concentrações diferentes e decrescentes do inóculo (1×10^7 UFC/mL, $7,5 \times 10^6$ UFC/mL, 5×10^6 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL), além do branco, que avalia a interferência residual da própria fluorescência emitida pela resazurina e a esterilidade do caldo GW; o controle positivo para a avaliação da morte bacteriana em contato com o Triton X-100 e controle negativo o qual nos fornece informações da viabilidade total das cepas de *N.gonorrhoeae* sem contato com agente inibidor de crescimento.

Além dos inóculos testados, diminuiu-se o tempo de incubação para 60 minutos para não ter risco de passar da escala do equipamento, já que fluorescência emitida pela conversão da resazurina em resorufina é diretamente proporcional a taxa metabólica das bactérias presentes nos poços, ou seja, quanto maior o inóculo bacteriano e a taxa de divisão celular, maior vai ser a fluorescência detectada (figura 5).

Os resultados para cada volume e inóculo usados estão nas figuras 6, 7, 8, 9 e 10.

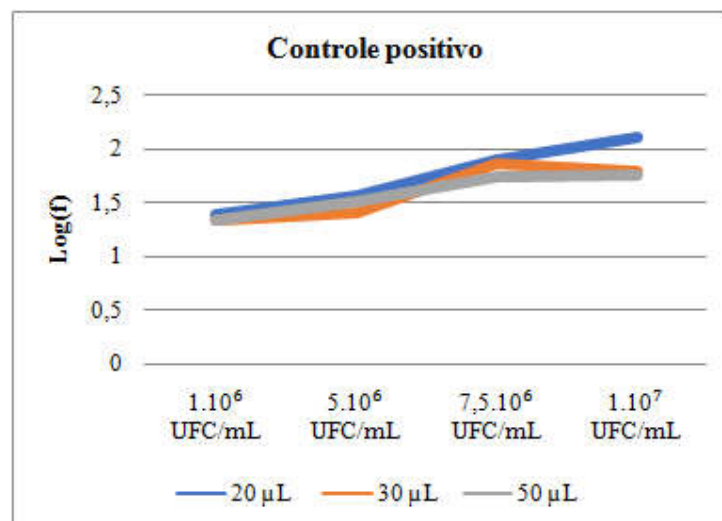
Figura 5: Microplaca de diluição após a incubação em estufa a 37°C.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: B: CP: Controle positivo (Coluna 1, 4 e 7); CN: Controle negativo (Coluna 2, 5 e 8); B: Branco (Coluna 3, 6 e 9). A1 a A9 e B1 a B9 Concentração do inóculo de 1×10^7 UFC/mL; C1 a C9 e D1 a D9 Concentração do inóculo de $7,5 \times 10^6$ UFC/mL; E1 a E9 e F1 a F9 Concentração do inóculo de 5×10^6 UFC/mL; G1 a G9 e H1 a H9 Concentração do inóculo de 1×10^6 UFC/mL. Os volumes de resazurina utilizados estão demonstrados nas colunas 1, 2 e 3 para o volume de 20 µL; 4, 5 e 6 para o volume de 30 µL; 7, 8 e 9 para o volume de 50 µL. UFC: Unidade formadora de colônias. Resazurina 0,1 mg/mL (0.01%).

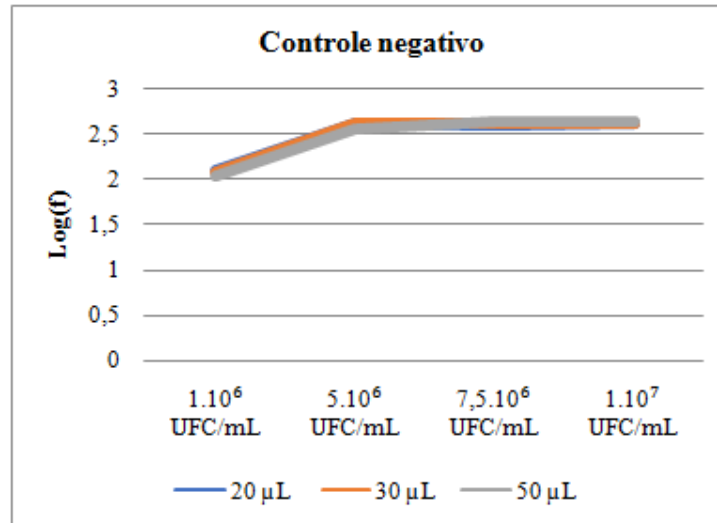
Figura 6: Resultados da leitura do controle positivo.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: UFC: Unidade formadora de colônias. Log(f): Log da fluorescência.

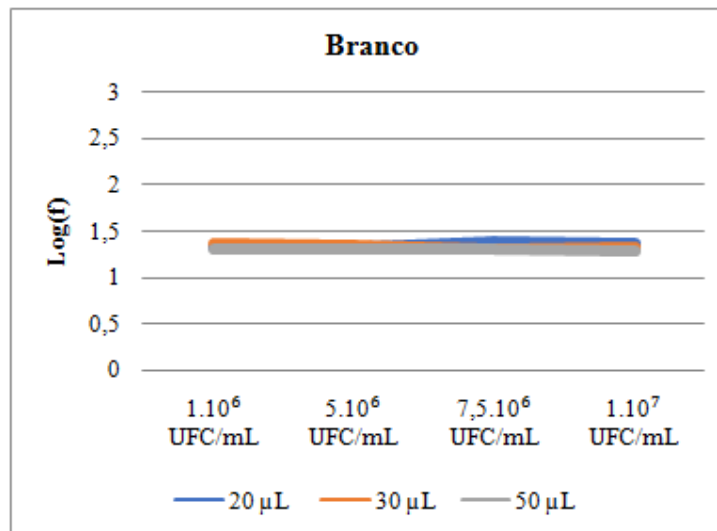
Figura 7: Resultados da leitura do controle negativo.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: UFC: Unidade formadora de colônias. Log(f): Log da fluorescência.

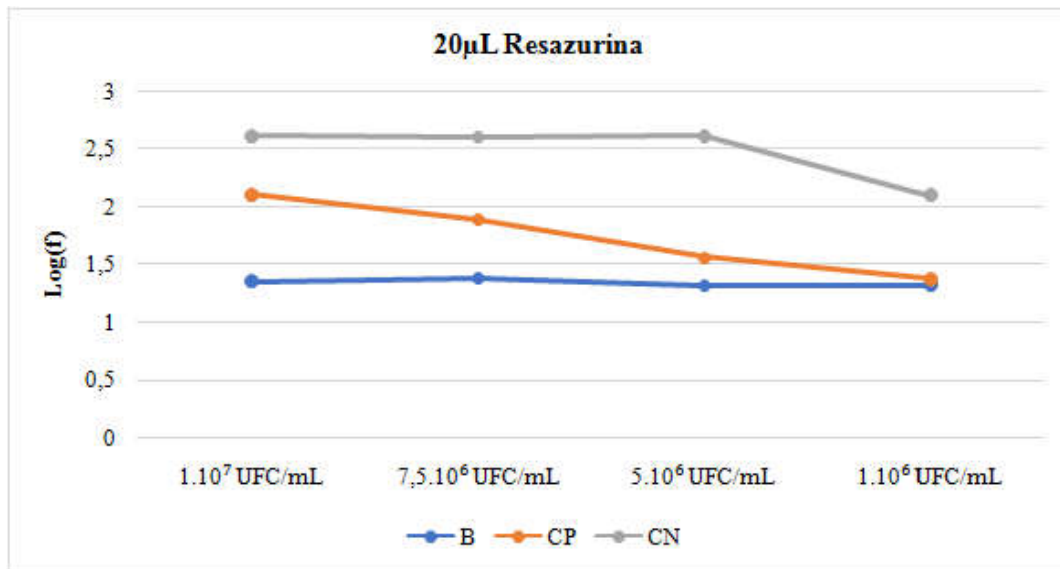
Figura 8: Resultados da leitura do branco.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: UFC: Unidade formadora de colônias. Log(f): Log da fluorescência.

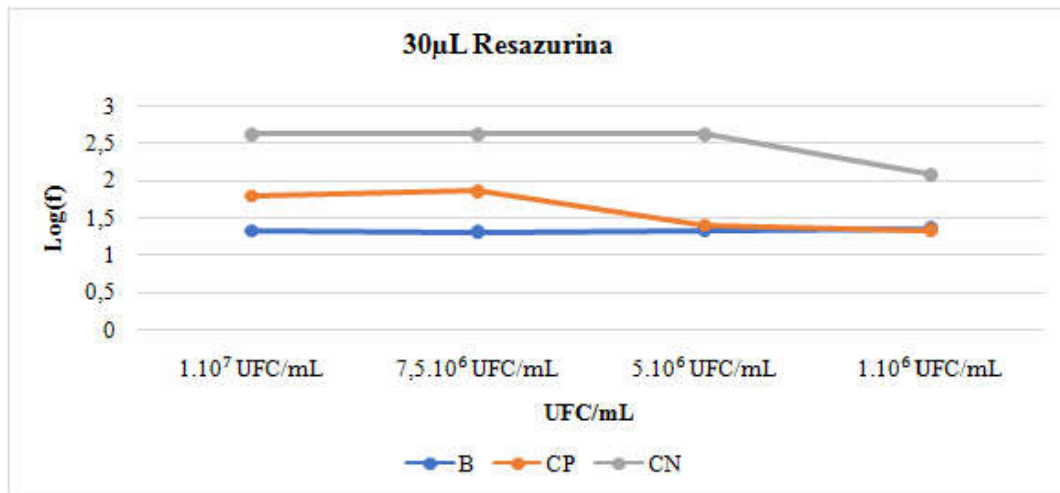
Figura 9: Resultados do crescimento bacteriano com volume de 20 μL de resazurina 0,1 mg/mL (0.01%).



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: B: Branco. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo. Log(f): Log da fluorescência. UFC: Unidade formadora de colônias.

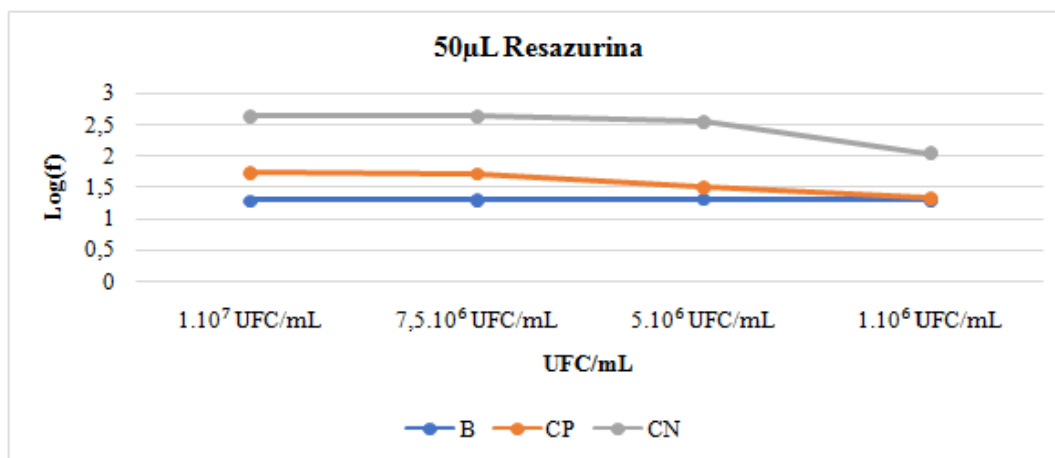
Figura 10: Resultados do crescimento bacteriano com volume de 30 μL de resazurina 0,1 mg/mL (0.01%).



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: B: Branco. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo. Log(f): Log da fluorescência. UFC: Unidade formadora de colônias.

Figura 11: Resultados do crescimento bacteriano com volume de 50 μL de resazurina 0,1 mg/mL (0.01%).



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: B: Branco. CP: Controle positivo. CN: Controle negativo. Log(f): Log da fluorescência. UFC: Unidade formadora de colônias.

A viabilidade celular e a atividade metabólica podem ser mensuradas pela quantidade de NADH e NADPH, visto que esses nucleotídeos de piridina são formados durante a atividade metabólica. A medição direta desses agentes redutores é possível, mas os níveis absolutos não são um indicador ideal para a atividade metabólica, pois sua taxa de rotatividade é importante. A taxa de rotatividade pode ser avaliada pela redução seletiva de certos compostos como diferentes sais de tetrazólio (MTT, XTT, MTS ou WST) ou resazurina, com a redução enzimática desses compostos pelas desidrogenases, usando NADH/NADPH como co-substrato. A forma reduzida desses compostos resulta em um produto colorido que pode ser medido por métodos espectroscópicos básicos (59).

A escolha da resazurina para a realização do experimento e não os sais de tetrazólio, considerou que esses outros sais quando sofrem o processo de redução, ou seja, ganho de elétron, se tornam um composto insolúvel não possibilitando a sua passagem pela membrana bacteriana. Para a realização da leitura seria necessário fazer a lise celular, destruindo a integridade da membrana e causando morte celular. Já a resazurina, descoberta por Weselsky (60) e utilizada primeiramente para estimar a contaminação bacteriana em leite (61), e a resorufina são substâncias solúveis sendo possível fazer a sua detecção intracelular, mantendo a viabilidade bacteriana e tornando possível a realização da leitura dentro do tempo estabelecido do experimento (59). Além disso, o uso da resazurina

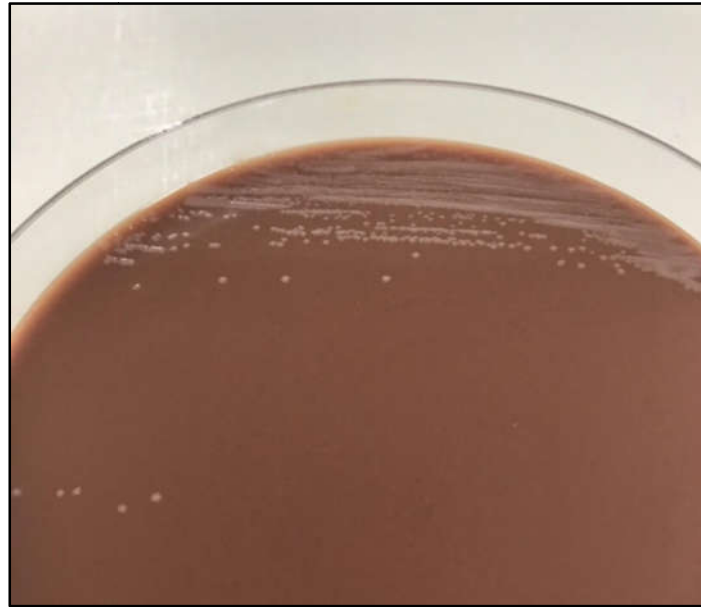
possibilita a realização do controle de contaminação, observado pelo poço contendo o branco.

O controle Branco possui apenas o caldo GW estéril e a sua mudança de cor indica que houve alguma contaminação durante o experimento, sendo necessário a investigação da fonte desta alteração para que interfere nos resultados e deve ser corrigida. Durante uma rodada do ensaio de triagem, observou-se a mudança de cor (azul para o rosa), o que indica que houve contaminação, visto isto, foi realizada a coloração de Gram para identificar qual tipo de bactéria estava presente. Na avaliação microscópica observaram-se somente bacilos gram negativos, indicando que a fonte de contaminação deve-se a presença desses microorganismos, podendo estar presentes nas soluções e reagentes utilizados. Com essa possibilidade, foram preparados novos reagentes e soluções a fim de diminuir as chances de contaminações durante os ensaios.

A resazurina é um corante pouco tóxico (62), mas não sem toxicidade para as células. A citotoxicidade da resazurina depende de sua concentração e do tempo em contato com as células (63). Mencionado isso, uma semeadura foi realizada no final do ensaio, utilizando uma alíquota do poço contendo o inóculo em contato com resazurina/resorufina, em ágar Chocolate e foi incubado a 35 ± 1 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂ por 24 horas. Isso foi feito para observar a viabilidade bacteriana após o contato com o corante e também para identificar possíveis contaminações com crescimento de outros tipos de bactéria. Verificou-se que houve crescimento de colônias indicativas de *N.gonorrhoeae* (pequenas, brilhantes, viscosas e extremamente aderidas ao meio) (Figura 12). Pela coloração de Gram foi possível observar os diplococos gram negativos (figura 13). Esses experimentos para observar a viabilidade bacteriana, ausência de contaminação possibilitaram constatar a segurança na escolha da resazurina na concentração de 0,1 mg/mL; mesma concentração utilizada nos estudos de Foerster e colaboradores (58) e Foerster e colaboradores (64). O experimento ainda possibilitou verificar que a incubação da bactéria em contato com a resazurina na estufa de CO₂ por 60 minutos, a viabilidade bacteriana foi mantida (Figura 12 e 13).

Os resultados dos experimentos de viabilidade bacteriana em relação a concentração de resazurina e tempo de incubação foram estimados para todas as concentrações bacterianas testadas.

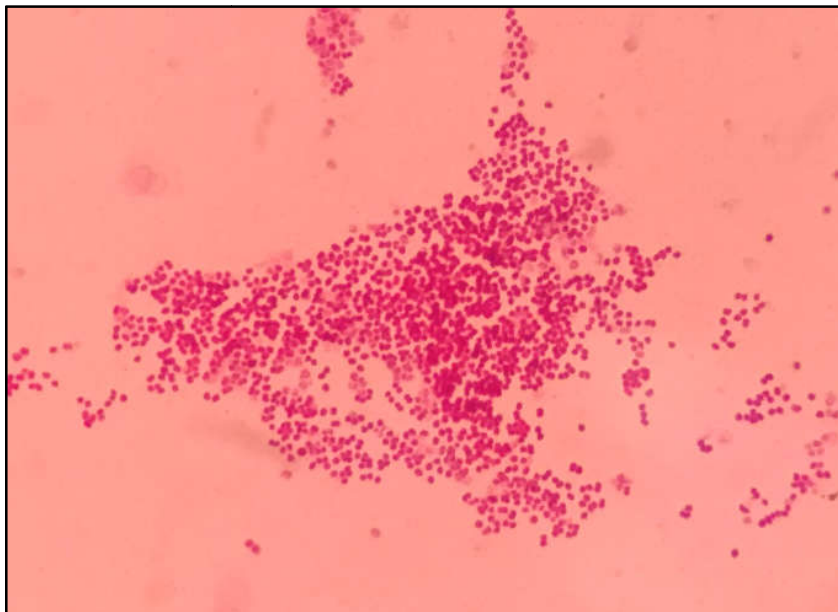
Figura 12: Crescimento do inóculo em ágar Chocolate na estuda de CO₂ após incubação de 60 minutos em contato com a resazurina.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Legenda: Crescimento de colônias indicativas de *N.gonorrhoeae* (pequenas, brilhantes, viscosas e extremamente aderidas ao meio)

Figura 13: Coloração de Gram de uma colônia oriunda da placa de ágar Chocolate após incubação em contato com a resazurina.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Legenda: Microscopia utilizando a objetiva de 100x em óleo de imersão. Presença de diplococos gram negativos sugestivo de *N.gonorrhoeae*.

Após a leitura na intensidade da fluorescência no fluorímetro (LS 55 PerkinElmer®) no comprimento de onda de 560 nm e 590 nm, foi constatada pouca diferença entre intensidade de fluorescência entre os volumes de resazurina no controle negativo (100% viável) (figura 7), obtendo-se valores de leitura parecidos. Com isso, válida a ideia que a concentração de células viáveis em uma suspensão contendo resazurina determina diretamente o tempo para uma conversão visível da cor púrpura para a rosa (65).

O volume de resazurina usado neste experimento foi definido em 30µL e não 50µL preconizado por Foerster e colaboradores (58) pelo motivo de não apresentar alteração de fluorescência significativa (figura 9, 10 e 11). Além disso, optou-se este volume por reduzir o consumo de reagentes nos ensaios.

Na leitura do branco (figura 8), pode-se dizer que não houve contaminação durante o experimento, visto que as leituras foram próximas entre si nas diferentes concentrações dos inóculos em contato com caldo GW estéril.

Em relação à concentração do inóculo, foi observado que somente a concentração de 1×10^6 UFC/mL não obteve o crescimento esperado por conta da quantidade reduzida de bactéria (figura 5 e 7). Não houve diferença entre as leituras nas concentrações dos inóculos de 1×10^7 UFC/mL, $7,5 \times 10^6$ UFC/mL e 5×10^6 UFC/mL.

Optou-se nesse experimento pelo uso da concentração do inóculo de 1×10^7 UFC/mL por apresentar maior quantidade de bactérias e por garantir a conversão da resazurina. Com isso, diminuíram-se as chances de invalidar a rodada dos ensaios por não ter o crescimento esperado.

Na padronização e na triagem inicial do experimento foi utilizada a cepa de referência WHO K de *N.gonorrhoeae* que, de acordo com Unemo (57), no estudo sobre as cepas WHO e sua caracterização fenotípica, genética e a genômica, é um cepa sensível à CRO e resistente ao CIP (Alto nível > 32 mg/L).

Por ser tratar de uma cepa com resistência e não do tipo selvagem (57), observamos um bom nível de conversão da resazurina em resorufina, tendo uma maior diferenciação de coloração do azul para o rosa e pela leitura obtida da intensidade da fluorescência no fluorímetro. Isso indica que a cepa WHO K de *N.gonorrhoeae* obteve um bom crescimento no caldo GW e resistiu às variações sofridas durante o experimento em conjunto com garantia de crescimento com a utilização do inóculo de 1×10^7 UFC/mL. Somado a isso, os possíveis vieses de leitura que poderiam ser causados por morte de bactérias durante os procedimentos dos ensaios foram evitados e, portanto, diminuindo interferência na intensidade da fluorescência e das porcentagens de crescimento em caldo GW. Isso porque

N.gonorrhoeae é considerada uma bactéria fastidiosa em que mudanças de ambientes e possíveis estresses sofridos durante os ensaios como variação de pH, temperatura e concentração de CO₂ causariam perda e por fim diminuição do inóculo bacteriano.

Os gonococos podem crescer em um meio contendo glicose em uma faixa de pH de 6,0 a 8,0, com um pH ótimo de 7,0 a 7,5 (66,67,68). Seus requisitos de temperatura são estreitos, com crescimento de 25 à 41 °C, com uma temperatura ideal de 36 ± 1 °C. O organismo é sensível à dessecação e não pode sobreviver a temperaturas menores que 25°C por longos períodos de tempo, sendo necessário que durante a realização do experimento haja um controle do tempo de manuseio e preparo dos ensaios. Além do mais, a viabilidade de *N.gonorrhoeae* diminui rapidamente na fase estacionária, devido à autólise aprimorada após a depleção de glicose do meio. Recomenda-se que os gonococos sejam incubados com CO₂ em 3% a 10%, pois o CO₂ melhora o desenvolvimento do crescimento exponencial (69).

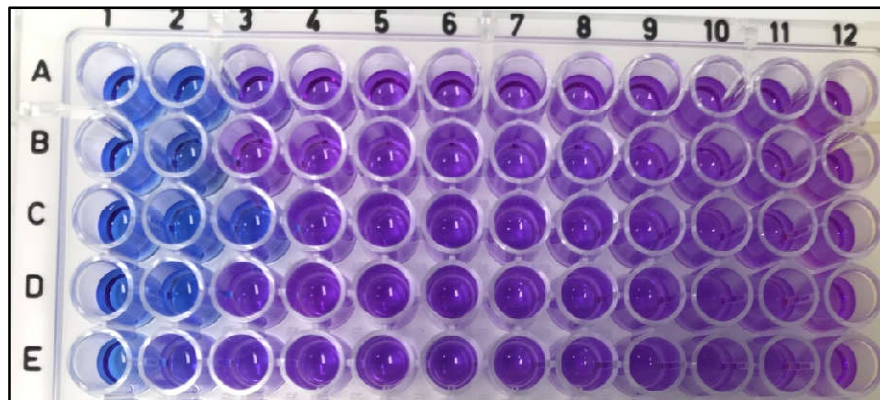
O caldo GW, validado no estudo de Graver e Wade (56), possui os insumos necessários e condições para o crescimento de *N.gonorrhoeae*. Sendo assim, foi possível a realização do ensaio de microdiluição. No estudo, os autores constataram que o caldo GW permitiu o crescimento de inóculo bacteriano entre 10^3 UFC/mL e 10^8 UFC/mL em 24 horas de incubação, utilizando a metodologia de contagem de células viáveis após os períodos de incubação (56). Nesse mesmo trabalho relatou-se como limitações a utilização de um painel relativamente pequeno e que foram utilizados isolados locais podendo não ser representativo.

Com relação às demais cepas de *N.gonorrhoeae* utilizadas neste estudo, foi possível observar diferenças de crescimento dependendo da cepa utilizada no caldo GW utilizando os mesmos parâmetros e técnicas em toda parte de triagem (figura 14 e 15). No entanto, as diferenças só foram observadas durante a etapa da curva da determinação da CIM, na qual foram utilizadas todas as 15 cepas de *N.gonorrhoeae*. Uma hipótese é que houve morte bacteriana durante a realização do experimento por ter cepas mais sensíveis às variações intra-ensaio, limitando a leitura dos dados. Outro indício é que dependendo da cepa utilizada e suas características fenotípicas e genéticas refletem na conversão da resazurina em resorufina, e, portanto, no seu metabolismo e taxa de reprodução. Foerster e colaboradores (2017) relataram que cepas com resistência à CFX e CRO utilizadas nos ensaios apresentaram resultados falso-positivos na comparação dos dados entre a metodologia de microdiluição baseada em resazurina e a metodologia utilizando E-test. Consequentemente houve uma superestimação da porcentagem de cepas consideradas

resistentes nesse estudo (58), além disso o complexo mecanismo de ação e evolução da resistência a esses antimicrobianos não são totalmente compreendidas e envolvem vários determinantes de resistência em interações multifacetadas (*penA*, *penB*, *mtrR*, fator X) (58).

Com esses dados, cepas com resistências são mais propícias a ter um crescimento maior em comparação com cepas mais sensíveis no caldo GW, conforme observa na figura 14 e 15.

Figura 14: Placa da curva da determinação da concentração inibitória mínima utilizando a cepa WHO F de *N.gonorrhoeae*.

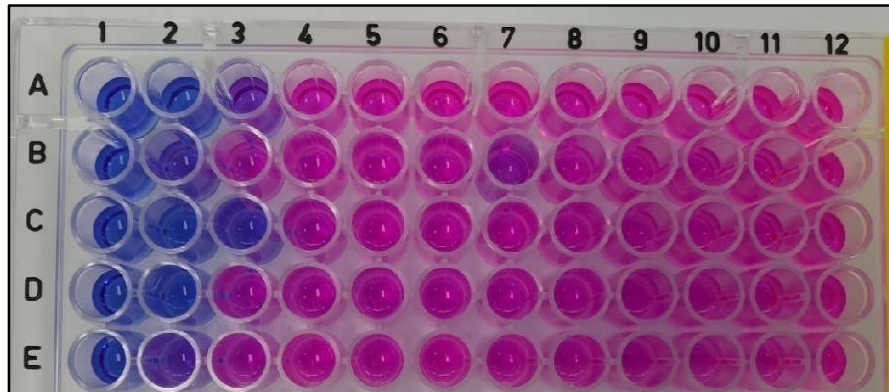


Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Legenda: Figura representa a conversão da resazurina em resorufina pela cepa WHO F de *N.gonorrhoeae*. A cor azul indica que não houve a redução do corante, e conseqüentemente, o metabolismo bacteriano. Já a cor mais próximo do rosa e/ou roxo, indica que houve redução e portanto o metabolismo bacteriano. A2 a A11 representa os concentrações utilizados do composto AP1; B2 a B11, composto AP10; C2 a C11, composto AP12; D2 a D11, composto AP16; E2 a E11, composto RR103. A coluna 1 indica o Controle positivo, sem crescimento bacteriano e a coluna 12 indica o Controle negativo (100%) viável. As concentrações finais utilizadas na placa são: Coluna 2: 100 mg/L; Coluna 3: 20 mg/L; Coluna 4: 4 mg/L; Coluna 5: 0,8 mg/L; Coluna 6: 0,16 mg/L; Coluna 7: 0,032 mg/L; Coluna 8: 0,0064 mg/L; Coluna 9: 0,00128 mg/L; Coluna 10: 0,000256 mg/L e Coluna 11: 0,000512 mg/L.

Cepa WHO F de *N.gonorrhoeae* é sensível a todos os antimicrobianos usados no tratamento da gonorreia (57)

Figura 15: Placa da curva da determinação da concentração inibitória mínima utilizando a cepa WHO L de *N.gonorrhoeae*.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Legenda: Figura representa a conversão da resazurina em resorufina pela cepa WHO L de *N.gonorrhoeae*. A cor azul indica que não houve a redução do corante, e consequentemente, o metabolismo bacteriano. Já a cor mais próximo do rosa e/ou roxo, indica que houve redução e portanto o metabolismo bacteriano. A2 a A11 representa os concentrações utilizados do composto AP1; B2 a B11, composto AP10; C2 a C11, composto AP12; D2 a D11, composto AP16; E2 a E11, composto RR103. A coluna 1 indica o Controle positivo, sem crescimento bacteriano e a coluna 12 indica o Controle negativo (100%) viável. As concentrações finais utilizadas na placa são: Coluna 2: 100 mg/L; Coluna 3: 20 mg/L; Coluna 4: 4 mg/L; Coluna 5: 0,8 mg/L; Coluna 6: 0,16 mg/L; Coluna 7: 0,032 mg/L; Coluna 8: 0,0064 mg/L; Coluna 9: 0,00128 mg/L; Coluna 10: 0,000256 mg/L e Coluna 11: 0,000512 mg/L.

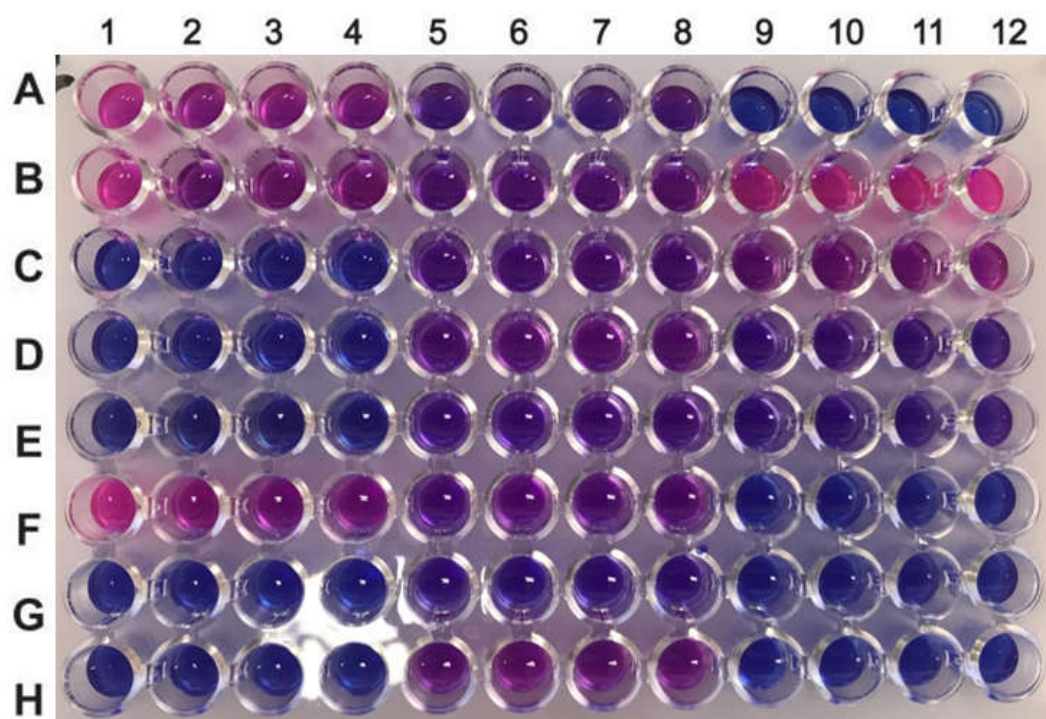
Cepa WHO L de *N.gonorrhoeae* possui resistência com alto nível para CIP, resistência moderada para AZT e resistência baixa para CRO (57).

Em relação às concentrações dos compostos utilizados, optou-se pelo uso da concentração em miligrama por litro (mg/L) tanto em compostos isolados, geralmente utilizado em μMol , quanto em extratos pelo motivo de se tratar de uma triagem inicial de um banco de conjuntos de compostos isolados ou não, e o crescimento ou não na concentração utilizada já seria, portanto, um resultado que demonstra sua atividade frente *N.gonorrhoeae* que, posteriormente, ensaios mais aprofundados de cada compostos poderiam ser feitos a partir desta triagem.

5.2 TRIAGEM DOS COMPOSTOS:

A partir da leitura realizada pelo fluorímetro (LS 55 PerkinElmer®) e análise das intensidades de fluorescências, foram calculados as médias das três leituras em dias diferentes (Figura 16), foram selecionados quatro (4) compostos naturais e um (1) composto sintético para progredirem no restante do trabalho.

Figura 16: Resultado da placa após incubação com a conversão de resazurina em resorufina.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Legenda: Resultado após incubação e a conversão de resazurina em resorufina. Coluna 1 a 4 e 5 a 8 indicam locais de testagem de cada composto em quadruplicata. A1 a A4 ; B1 a B4; C1 a C4; D1 a D4; E1 a E4; F1 a F4; G1 a G4; H1 a H4; A5 a A8; B5 a B8; C5 a C8; D5 a D8; F5 a F8; G5 a G8; H5 a H8; C9 a C12; D9 a D12; E9 a E12; F9 a F12; G9 a G12, correspondem aos compostos testados em quadruplicata. Cores próxima da tonalidade de azul, indica menos conversão e cores mais próximas do rosa, maior conversão. Posições A9 a A12 correspondem ao controle positivo, B9 a B12 controle negativo e H9 a H12 branco.

Os resultados estão apresentados nos Apêndices A e B.

Dos 119 compostos sintéticos, 7 (5,8 %) deles inibiram o crescimento bacteriano em mais de 70 % (70-96 %) e o composto RR103, com inibição de 88,6 %, foi escolhido para proceder nos estudos posteriores.

Em relação os compostos naturais, totalizando 68 compostos, 41 (60,29%) inibiram o crescimento bacteriano em mais de 70 %, entre eles, 15 (36,58%) compostos apresentaram ação inibitória de crescimento acima de 99 %.

Com esses resultados, foi optado por utilizar o grupo de isolados proveniente da alga *D. meziessi*, já que além do composto isolado AP1, outros isolados desta alga obtiveram resultados favoráveis e semelhantes entre si.

Os outros isolados são AP10, AP12 e AP16 que, em contato com a bactéria, apresentaram média de inibição de 85,5 %, 98,8 % e 86,5 % respectivamente, utilizando o inóculo WHO K de *N.gonorrhoeae*.

As escolhas de cada um deles estão relacionados às questões de disponibilidade dos compostos e pesquisa do próprio laboratório de síntese.

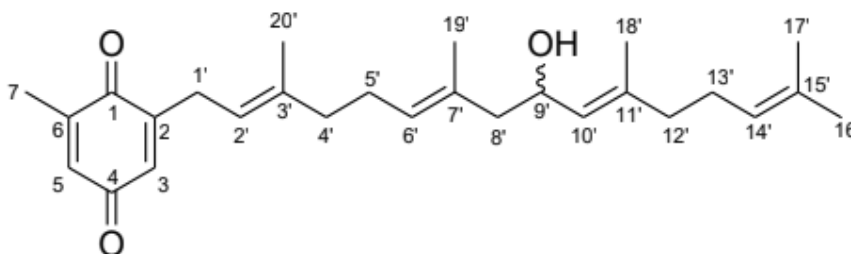
5.3 COMPOSTOS

5.3.1 AP1

A substância AP1 apresenta-se como óleo amarelo-alaranjado e foi extraída de uma amostra de *D. menziessi*, com rendimentos que somam 80,5 mg. Possui MM 410,2821 g/mol. Apresenta Rf 0,3 em CCD eluída com n-hexano e acetato de etila na proporção 8:2 (v/v), tendo característica apolar.

A estrutura do composto AP1 (9'-hidroxisargaquinona) está demonstrada na figura 17.

Figura 17: Estrutura do composto AP1 (9'-hidroxisargaquinona).

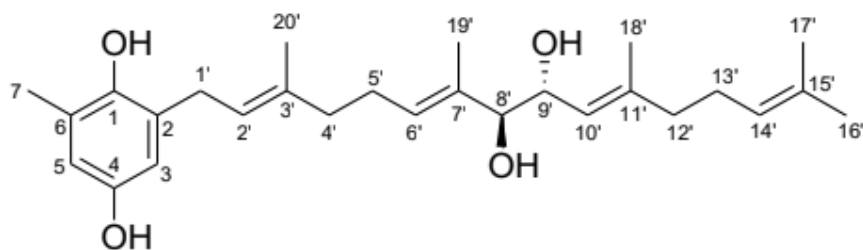


5.3.2 AP12

A substância AP12 foi isolada como um óleo amarelo-alaranjado e foi extraída de uma amostra de *D. menziessi*, com rendimento de 18,2 mg. Possui MM 428.2927 g/mol. Apresentou Rf 0,2 em CCD eluída com n-hexano e acetato de etila na proporção 7:3 (v/v) (mais polar que AP1);

A estrutura do sargatetrol está demonstrada na figura 18.

Figura 18: Estrutura do composto AP12 (sargatetraol).



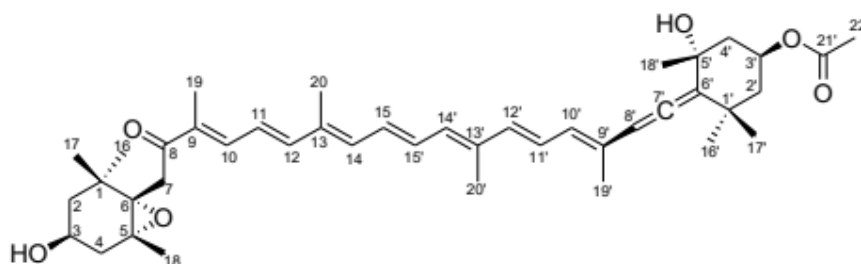
O composto sargatetraol ainda não possui relatos de atividades biológicas, o que desperta o interesse na sua investigação biológica.

5.3.3 AP10

A substância AP10 foi obtida como um óleo vermelho-alaranjado, com rendimento de 156,3 mg. Possui MM de 658,91 g/mol. Apresentou-se em Rf 0,4 na CCD em n-hexano e acetato de etila (4:6) (mais polar que AP12).

A estrutura da fucoxantina está demonstrada na figura 19.

Figura 19: Estrutura da substância AP10 (fucoxantina).



5.3.4 AP 16

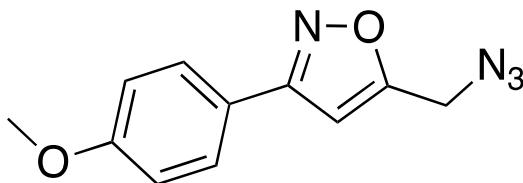
Composto sem identificação até o momento, 2020.

5.3.5 RR103

O composto sintético 5-(azidometil)-3-(4-metoxifenil)isoxazol ($C_{11}H_{10}N_4O_2$) possui MM de 230,22 g/mol e $clogP$: 3.26. O rendimento global da rota de obtenção do composto RR 103 é de 43%

A estrutura do 5-(azidometil)-3-(4-metoxifenil)isoxazol está demonstrada na figura 20.

Figura 20: Estrutura do composto RR103 (5-(azidometil)-3-(4-metoxifenil)isoxazol).

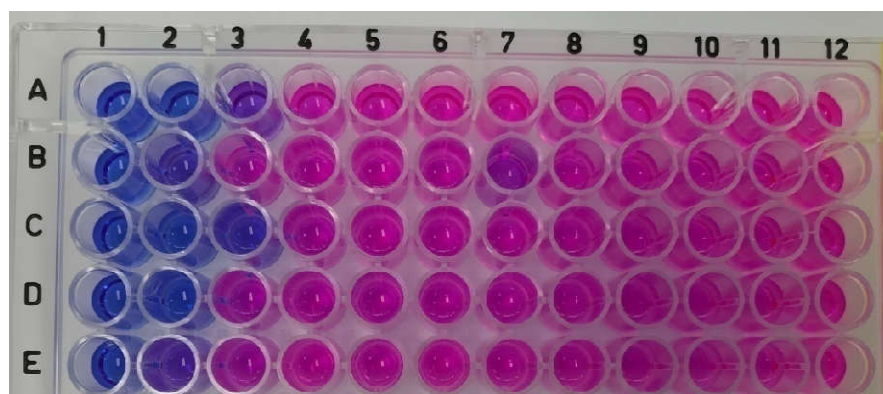


5.4 CURVA DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Após a seleção dos compostos na etapa da triagem, foi realizada a leitura qualitativa de cada cepa testada através da leitura observacional de mudança de cor, comparando visualmente a intensidade da cor, de azul para rosa; quanto mais próximo do tom de azul menor é a atividade metabólica ou menor a quantidade de bactéria viável presente. Quanto mais próximo da coloração rosa, maior é a taxa metabólica ou maior a quantidade de bactéria viável na reação (poço) (tabela 2).

Com isso, após a incubação dos inóculos bacteriano em contato com as diferentes concentrações dos compostos, a observação de mudança de cor de um poço para o outro, indica a CIM (figura 21).

Figura 21: Placa contendo os inóculos bacteriano (WHO L) em contato com as diferentes concentrações dos compostos.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: A2 a A11 representa os concentrações utilizados do composto AP1; B2 a B11, composto AP10; C2 a C11, composto AP12; D2 a D11, composto AP16; E2 a E11, composto RR103. A coluna 1 indica o Controle positivo (Triton X-100) e a coluna 12 indica o Controle negativo, PBS pH (7,4) . As concentrações finais utilizadas na placa são: Coluna 2: 100 mg/L; Coluna 3: 20 mg/L; Coluna 4: 4 mg/L; Coluna 5: 0,8 mg/L; Coluna 6: 0,16 mg/L; Coluna 7: 0,032 mg/L; Coluna 8: 0,0064 mg/L; Coluna 9: 0,00128 mg/L; Coluna 10: 0,000256 mg/L e Coluna 11: 0,000512 mg/L. Composto AP1: CIM de 20 mg/L; Composto AP10: CIM de

100 mg/L; Composto AP12: CIM de 20 mg/L, Composto AP16: CIM 100 mg/L e composto RR103: 100 mg/L.

Tabela 2: Resultado da leitura qualitativa da curva da determinação da concentração inibitória mínima das diferentes concentrações dos compostos em contato com os inóculos bacterianos de cada cepa de *N.gonorrhoeae*.

	API*	AP10*	AP12*	A16*	RR103*
WHO F	100	100	20	100	100
WHO G	20	20	4	4	100
WHO K	20	100	20	100	100
WHO L	20	100	20	100	100
WHO M	20	20	20	20	100
WHO N	100	100	100	100	20
WHO U	100	>100	20	>100	20
WHO V	4	4	4	>100	>100
WHO W	20	20	20	20	>100
WHO X	20	100	20	20	>100
WHO Y	20	100	20	20	>100
WHO Z	100	>100	20	100	>100

Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: Leitura realizada visualmente observando a mudança de cor do azul (baixa conversão da resazurina) e rosa (alta conversão de resazurina). *Concentrações (mg/L) referente às diluições finais na placa (Kasvi®) de cada composto. Observação de mudança de cor de um poço para o outro, indica a CIM.

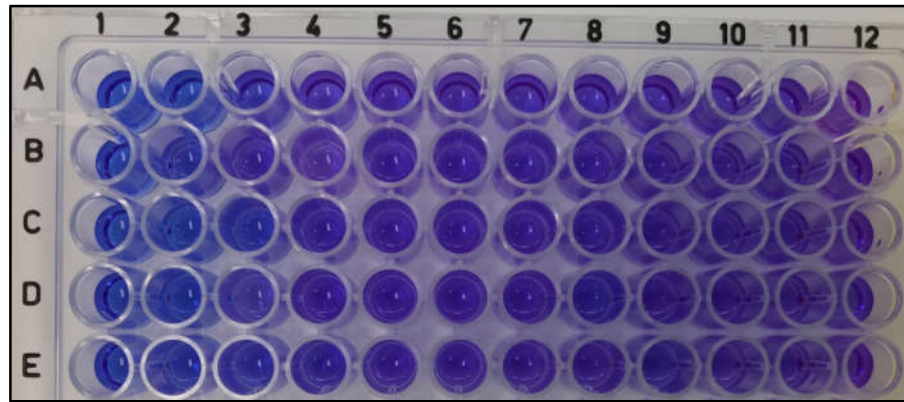
Além da leitura qualitativa, foi realizado a leitura quantitativa, estimando a porcentagem de crescimento bacteriano de cada cepa em contato com os compostos nas diferentes concentrações utilizadas.

Todas as cepas WHO de *N.gonorrhoeae* cresceram no controle negativo com exceção da ATCC e da WHO P, as quais não apresentaram crescimento satisfatório para a realização dos cálculos de viabilidade. Ao total 15 cepas foram testadas, todavia as análises dos dados e de leitura só foram possíveis em 13 cepas.

As cepas WHO O e WHO U apresentaram crescimento reduzido no controle negativo, porém foi possível estimar a porcentagem de crescimento. Visto que cada placa incubada representa um ensaio completo e as condições de crescimento foram iguais para todas as placas, sendo assim, possível realizar a comparação entre os comportamentos das outras cepas utilizadas. Portanto, o cálculo da viabilidade bacteriana foram possíveis entre as leituras das intensidades da fluorescência do controle negativo e dos inóculos em contato

com as concentrações dos compostos, assim validando rodada embora baixa intensidade de fluorescência (figura 22).

Figura 22: Placa contendo o inóculo de cepa WHO O de *N.gonorrhoeae* após incubação em estufa de CO₂ em contato com a resazurina.



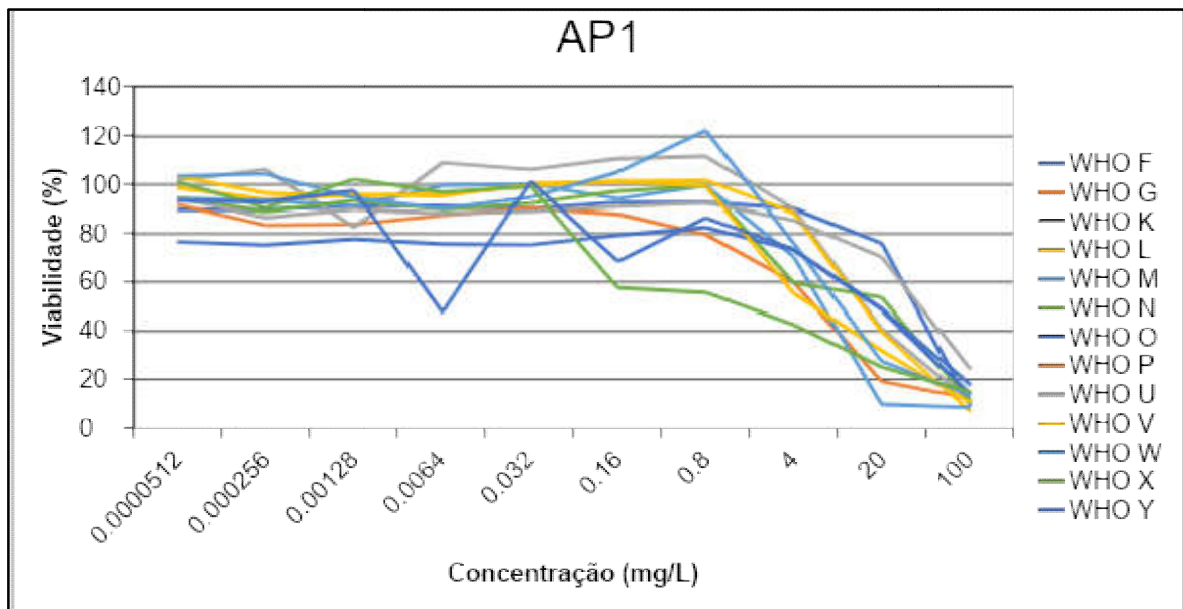
Fonte: Próprio autor, 2020.

Legenda: Observação de pouca diferença de tonalidade das cores de cada poço. A2 a A11 representa os concentrações utilizados do composto AP1; B2 a B11, composto AP10; C2 a C11, composto AP12; D2 a D11, composto AP16; E2 a E11, composto RR103. A coluna 1 indica o Controle positivo (Triton X-100) e a coluna 12 indica o Controle negativo, PBS pH (7,4). As concentrações finais utilizadas na placa são: Coluna 2: 100 mg/L; Coluna 3: 20 mg/L; Coluna 4: 4 mg/L; Coluna 5: 0,8 mg/L; Coluna 6: 0,16 mg/L; Coluna 7: 0,032 mg/L; Coluna 8: 0,0064 mg/L; Coluna 9: 0,00128 mg/L; Coluna 10: 0,000256 mg/L e Coluna 11: 0,000512 mg/L.

Nas figuras 23, 24, 25, 26 e 27 estão demonstradas as porcentagens de viabilidade de cada cepa de *N.gonorrhoeae* frente a cada composto.

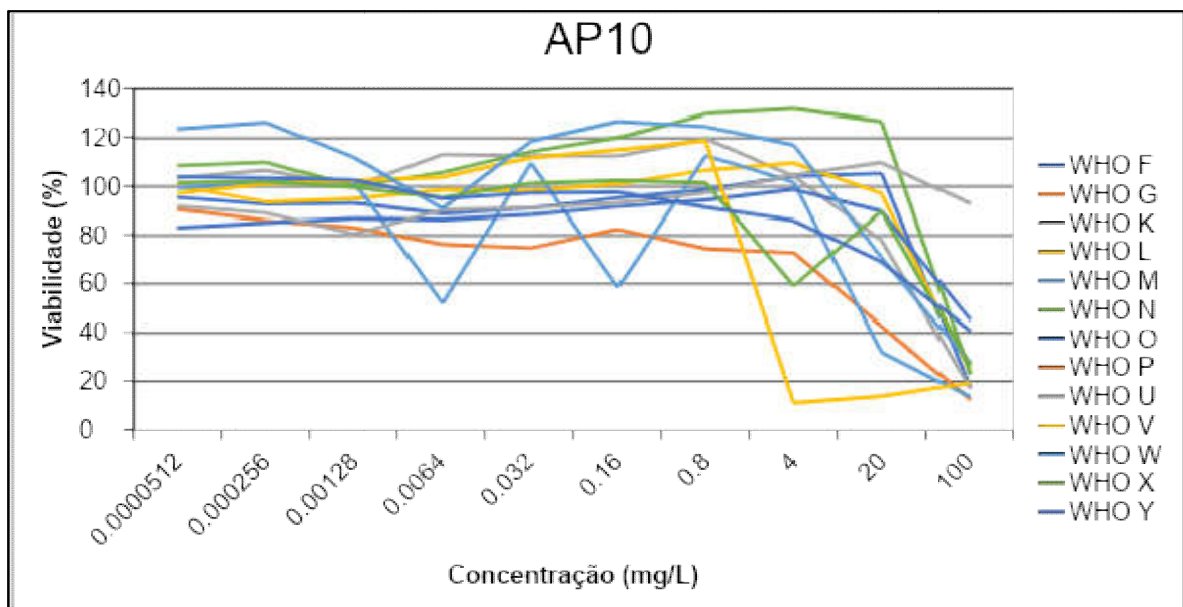
No apêndice C, estão demonstradas as porcentagens de crescimento frente a cada composto testado.

Figura 23: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de *N.gonorrhoeae* em contato com o composto AP1.



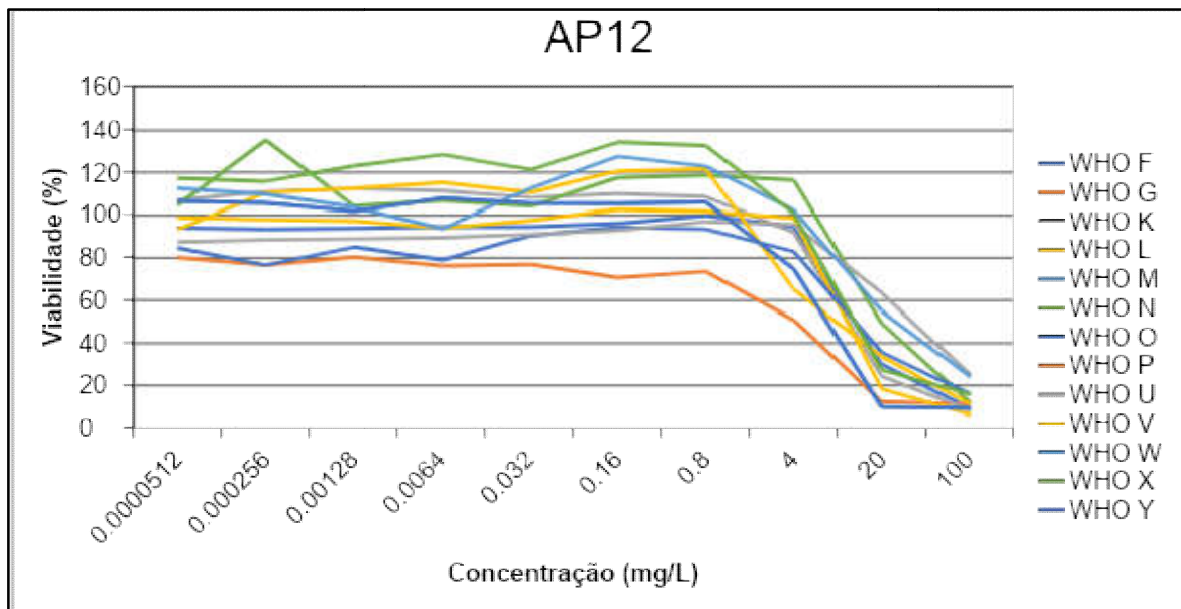
Fonte: Próprio autor, 2020.

Figura 24: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de *N.gonorrhoeae* em contato com o composto AP10.



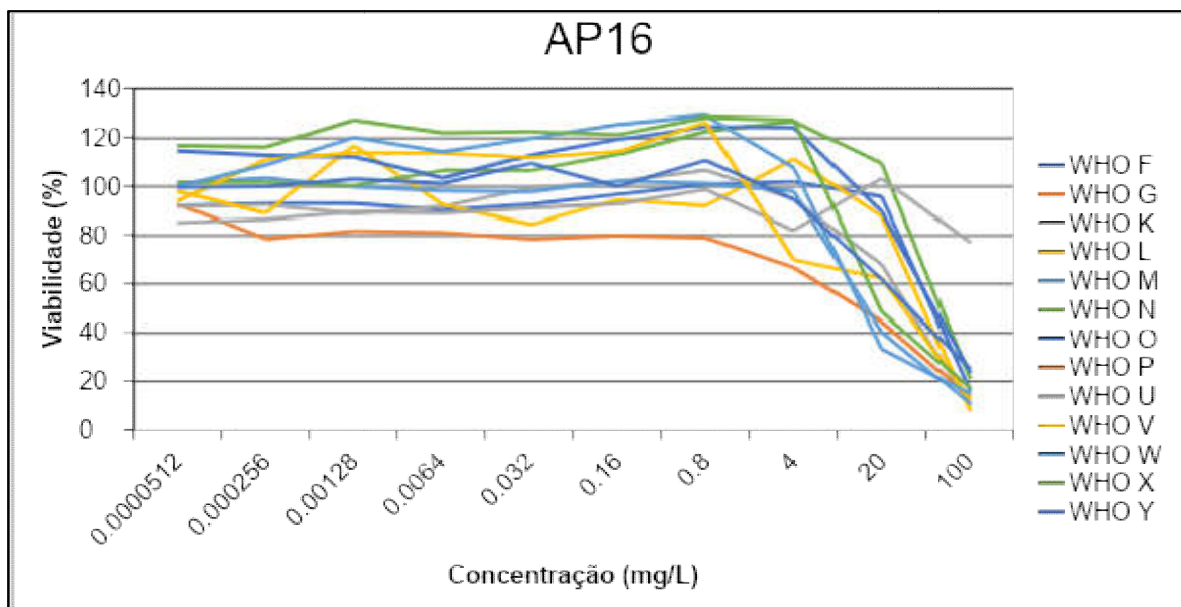
Fonte: Próprio autor, 2020.

Figura 25: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de *N.gonorrhoeae* em contato com o composto AP12.



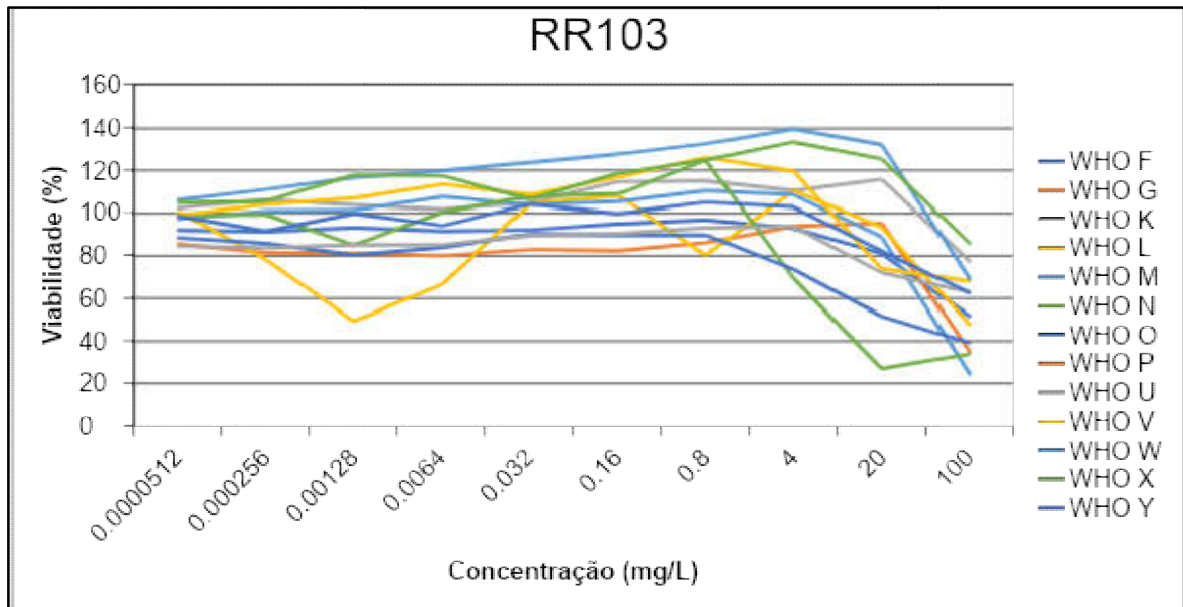
Fonte: Próprio autor, 2020.

Figura 26: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de *N.gonorrhoeae* em contato com o composto AP16.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Figura 27: Resultados da viabilidade bacteriana (%) de cada cepa de *N.gonorrhoeae* em contato com o composto RR103.



Fonte: Próprio autor, 2020.

Foi possível observar que o composto AP12 obteve a melhor atividade antimicrobiana em comparação aos compostos AP1, AP10, AP16 e RR103, com as bactérias apresentando uma taxa de crescimento inferior de 30% na concentração de 100 mg/L em todas as cepas de *N.gonorrhoeae*, até mesmo nas cepas multirresistentes como a cepa WHO W, WHO Y, WHO X e WHO Z. Desconsiderando as cepas WHO O e WHO U que obtiveram crescimento menor que as outras cepas, os inóculos bacteriano em contato com composto AP12 apresentam uma taxa de crescimento abaixo dos 20 %, ou seja, o composto apresentou capacidade de inibir o crescimento bacteriano em 80 %. Esses resultados sugerem que as atividades do AP12 não dependem dos diferentes mecanismos de resistência expressos pelas cepas testadas. Além do mais, essa diferença de resultado entre cada isolado pode estar associada à polaridade da molécula, pois há a relação de lipofilicidade e hidrofiliicidade. Isso deve-se ao fato que compostos com a mesma polaridade possuem afinidades entre si.

A membrana externa (ME) das bactérias gram-negativas, atua como uma barreira de permeabilidade eficaz contra agentes nocivos externos e o lipopolissacarídeo (LPS) é a molécula chave desta função (70). O LPS é um dos principais fatores que contribuem para a virulência de *N.gonorrhoeae* e desempenha vários papéis na patogênese da gonorreia (71). A forma contínua formada pelas moléculas de LPS fornecer um ambiente hidrofílico que

oferece uma barreira muito eficaz para compostos hidrofóbicos (72). Dadas essas informações, compostos mais hidrofílicos possuem maior ação em bactérias gram negativas, ou seja, quanto mais polar é o composto, mais facilmente atravessa a membrana bacteriana.

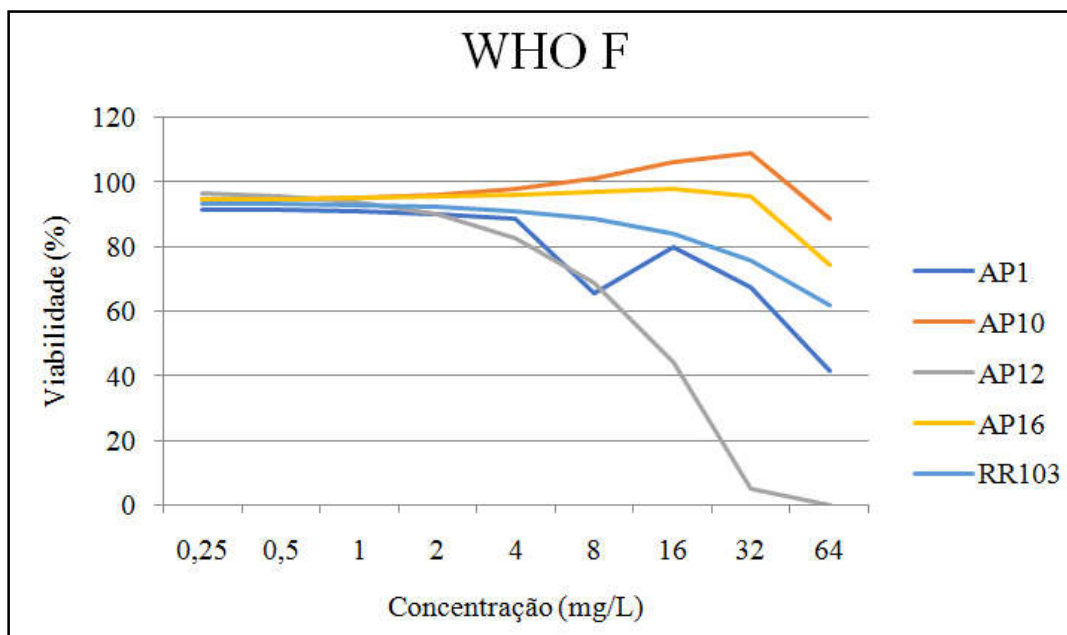
Porém, além dessas características, o tamanho do composto também influencia no transporte para dentro da célula. As porinas são canais de difusão passiva que cobrem a ME de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. São permeáveis para pequenos solutos polares com limites de exclusão em torno de 600 Da, mas excluem moléculas apolares de tamanhos comparáveis (73).

Os resultados das CIM mostram que os compostos AP1 e AP16 apresentaram capacidade de inibir o crescimento das cepas de *N.gonorrhoeae* na concentração de 100 mg/L, com exceção da cepa WHO U (figura 24 e 26).

Ao calcular a tendência linear da cepa WHO F de *N.gonorrhoeae* em relação a cada composto testado e estipular a viabilidade bacteriana utilizando outras concentrações não realizadas, observou-se que o composto AP12 é capaz de reduzir a viabilidade bacteriana em 100% concentração de 64 mg/L e de 94,8 % na concentração de 32 mg/L. AP1, AP10, AP16 e RR103 apresentaram capacidade de reduzir a viabilidade bacteriana na concentração de 64 mg/L de 58,5 %, 11,4 %, 26,0 % e 38,4 % respectivamente. Já na concentração de 32 mg/L, estipulou-se 32,3 %, 0 %, 4,4 % e 24,5 % respectivamente (figura 26).

Utilizou-se para calcular a tendência linear dos resultados da cepa WHO F de *N.gonorrhoeae* pelo motivo de ser uma cepa com características genéticas do tipo selvagem, não possuindo mutações que ocasionam resistências a nenhum tipo de antimicrobiano (57). Sendo assim, possibilitando a observação do comportamento frente aos potenciais inibidores de crescimento, não possuindo o viés de ter alguma cepa de referência possuir mecanismos de resistência que possa causar alteração da porcentagem de viabilidade frente aos compostos.

Figura 28: Resultado da viabilidade bacteriana (%) em relação a estipulação de diferentes concentrações dos compostos testados, utilizando a cepa WHO F de *N.gonorrhoeae*.



Fonte: Próprio autor, 2020.

O composto AP12 é mais polar que o composto AP1 e com massa molecular semelhante, 428,29 g/mol e 411,29 g/mol respectivamente. Ao analisar a curva da determinação da CIM, foi possível observar comportamentos diferentes entre si, mostrando uma curva de inibição mais acentuada do composto AP12 na concentração de 20mg/L em relação a 100 mg/L (figura 23 e 25). Esse resultado sugere que a diferença entre a polaridade pode interferir na permeabilidade da membrana.

Já o composto AP10 é mais polar que o composto AP12, porém possui maior massa molecular (658,91 g/mol) fato que sugere que o tamanho do composto possa interferir na sua absorção.

O composto sintético RR103 apresentou atividade antimicrobiana limitada, obtendo CIM variável dependendo da cepa o qual foi utilizada no ensaio. Na concentração de 100 mg/L o composto obteve taxa de morte bacteriana entre 14,4 % em contato com a cepa WHO X a 76,1 % em contato com a cepa WHO M. Já na concentração de 20 mg/L, o composto não apresentou atividade antimicrobiana nas cepas WHO K, WHO X e WHO W, obtendo crescimento semelhante com o controle negativo. A cepa WHO N apresentou viabilidade de 27% na concentração de 20 mg/L.

A regra dos cinco de Lipinski determina se um composto químico com uma certa atividade farmacológica ou biológica tem propriedades químicas e físicas que tornaria um

provável medicamento oralmente ativo em humanos. São utilizados quatro parâmetros físico-químicos que estão associados com medidas de permeabilidade, sendo eles: Massa molecular < 500 Da, coeficiente de partição octanol/água calculado ≤ 5 (usando o programa ClogP), número de átomos doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 (soma dos átomos O-H e N-H) e número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 (soma dos átomos O e N). Lipinski sugeriu que compostos que apresentem dois ou mais parâmetros com valores fora destas faixas de corte têm grande chance de serem pouco permeáveis (74). O composto AP12 possui massa molecular menor que 500 Da e 4 ligações de hidrogênio tanto receptoras quanto receptoras. Portanto com esses dados, este composto apresenta características que o tornam um possível medicamento por VO, favorecendo o seu acesso e uso para a população.

Em 2006, Silva e colaboradores (75) utilizando o método de diluição em ágar avaliou o efeito antimicrobiano do extrato de *Terminalia macropteral*, uma planta nativa africana utilizada para tratar a gonorreia, contra nove cepas referências de *N.gonorrhoeae*, incluindo cepas resistentes à penicilina e à tetraciclina. Foi demonstrado que o extrato das folhas possui atividade antimicrobiana contra todas as cepas e as CIM entre 100 mg/L e 200 mg/L e após a utilização do método de partição líquido-líquido para dividir o extrato de *T. macropteral* em cinco frações, foi demonstrado que todas as frações apresentaram atividade antimicrobiana e a mais ativa foi identificada com aquela que contém a ligação éter dietílico, apresentando valores de CIM entre 25 mg/L e 50 mg/L contra todas as cepas. Por tratar-se de uma fração, a concentração dos compostos presentes e a porcentagem não são conhecidos, podendo conter baixas concentrações de cada isolado. Sabendo disso, estudos de cada componente isolado são necessários, pois avaliam se há sinergismo ou antagonismo entres os componentes da fração e se há um isolado com maior potencial, além de fornecer dados de rendimento de cada componente da fração que são avaliados na fase pré-clínica do desenvolvimento de um novo medicamento (76).

No estudo de Shokeen e colaboradores (25), que avaliou estudos preliminares sobre a atividade extratos de *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia* e *Annonas quamosa* contra *N.gonorrhoeae*, foi utilizada a metodologia de disco difusão em que foram impregnados com a concentração de 1000 µg/disco, exceto os extratos de sementes de *A. squamosa*, que estavam em forma de óleo, dos quais 10 µL foram usados por disco. Além disso o teste foi feito com discos de outros antibióticos. A inibição percentual de *N.gonorrhoeae* pelos extratos foi calculada considerando a inibição de cada uma com penicilina (0,5 UI) e CIP (1 µg) como 100% e depois foi calculada a inibição percentual correspondente pelos extratos.

Com as porcentagens de inibição, feita a partir da comparação entre os halos de inibição, foi feita uma separação em resistente (sem inibição de crescimento), menos sensível (1% a 50% de inibição), sensível (51% a 99% de inibição) e altamente sensível (maior ou igual a 100% de inibição). Nesse estudo, todas as seis cepas WHO testadas eram sensíveis aos extratos de todas as três plantas. Os extratos dessas três plantas mostraram alta inibição de cepas de *N.gonorrhoeae* WHO e de isolados clínicos, mais ainda com cepas de *N.gonorrhoeae* multirresistentes.

No presente estudo, utilizando a classificação usada pelo Skokeen e colaboradores (25), algumas cepas de *N.gonorrhoeae* seriam consideradas sensíveis e somente WHO U seria considerada menos sensível na concentração de 20 mg/L e todas sensíveis com a concentração 100 mg/L. Porém esse estudo foi feito com extratos em uma concentração 10 vezes maior que a maior concentração utilizada na curva determinação da concentração inibitória mínima. Isso deve ser considerado, pois um extrato, assim como uma fração, possui mais de um composto e em concentrações variáveis.

Atendo a isso, no trabalho publicado pelo mesmo autor, em 2008, foi demonstrado que o composto isolado extraído das folhas de *Ocimum sanctum*, eugenol (164,21 g/mol), é um antisséptico natural obtendo uma concentração inibitória mínima entre 85 mg/L e 256 mg/L. Em vista de sua eficácia, o eugenol foi considerado uma molécula potencialmente adequada a ser avaliada clinicamente em resposta a isolados resistentes emergentes de *N.gonorrhoeae*. (77).

No Canadá, Ruddock e colaboradores (78) avaliaram a atividade antimicrobiana de 19 produtos naturais derivados do alho e mais cinco extratos aquosos em diferentes tempos de extração contra a cepa WHO V de *N.gonorrhoeae*. Foi utilizada a metodologia de microdiluição nas concentrações entre 0,1 e 100 mg/mL e avaliou-se a concentração de alicina (alil-2-propenotiosulfonato), constituinte primário associado à atividade antimicrobiana. A CIM foi determinada por leitura de densidade óptica na absorção de 595 nm. O melhor extrato avaliado apresentou CIM de 0,1 mg/mL, todavia o estudo adverte que há divergência do nível de alicina entre os produtos naturais. Além disso, no estudo, por tratar-se de extratos, a comparação com outros estudos referentes a produtos derivados do alho foi dificultada e os autores sugerem que o nível de alicina interfere na atividade antimicrobiana. Diferente do estudo de Shokeen (25) ,não houve critérios de nível de resistência e somente foi avaliada a inibição completa de crescimento, isso deve-se às metodologias utilizadas nos estudos e a forma de avaliação através dos controles. Na metodologia de disco difusão há a possibilidade de avaliar na mesma placa de petri

diferentes compostos simultaneamente, e também há disponível no mercado discos em concentrações padronizadas de antimicrobianos utilizados atualmente. Já na metodologia de microdiluição, a quantidade de crescimento nos poços ou tubos contendo o antimicrobiano deve ser comparada com a quantidade de crescimento nos poços ou tubos de controle de crescimento (sem antimicrobiano) usada em cada conjunto de testes ao determinar os pontos finais de crescimento (79). É uma técnica sensível, de alto rendimento, na qual possibilita a análise de pequenas amostras sendo esta uma das principais vantagens da sua utilização quando se refere a amostras vegetais (80). Mesmo que existam alguns inconvenientes, tais como precipitação de compostos presentes em alguns extratos e a coloração do extrato em concentração alta que poderão interferir na análise, essa técnica é a mais adequada (80).

No mesmo ano de 2005, o mesmo grupo de pesquisadores da Universidade de Ottawa avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do peptídeo sintético HE2 α , baseado da sequência terminal C da proteína HE2 α (81). Essa proteína é expressa predominantemente no trato reprodutor masculino, sítio primário da infecção de *N.gonorrhoeae*. Utilizou-se a metodologia de tempo e dose dependente com 6 cepas de *N.gonorrhoeae* nas concentrações de 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L e 12,5 mg/L e tempo de incubação de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. Após cada tempo de incubação, a referente concentração foi plaqueada, utilizando uma alíquota, em placa de ágar e incubou-se novamente por mais 24 horas e após realizada a contagem de colônias. A CIM foi entre 25 e 100 g/L e em 12,5 mg/L não houve atividade. Apesar do nosso estudo não apresentar dados sobre o tempo e dose dependente, a CIM desse composto isolado está comparável com o composto AP12 que obteve CIM entre 20 e 100mg/L.

Outro estudo de Ruddock e colaboradores (82), avaliou a atividade antimicrobiana de flavanoides derivados de extratos de 19 plantas da Colômbia, dos quais são utilizados na cultura local para infecção cutânea. A metodologia foi por disco difusão e 71% dos extratos apresentaram atividade antimicrobiana, em particular o extrato de *Piper lanceaefolium* em que após a comprovação a atividade do seu extrato, foram isolados compostos: 5,7-dihydroxiflavanona (pinocembrina) e 2'-4'-6'-trihydroxicalconona (calconapinocembrina). Pinocembrina e calconapinocembrina apresentaram 100% de inibição de crescimento na concentração de 64 mg/L e 128 mg/L respectivamente. Esse estudo evidencia que a diversidade de metabólitos secundários achados nas plantas naturais representa uma fonte alternativa de recursos de potencial antimicrobiano, assim como na caso do composto AP1 e derivados.

Jacobsson e colaboradores (22), investigaram as atividades *in vitro* das novas moditromicina dos biciletólidos (EDP-420, EP-013420, S-013420) e EDP-322 contra as cepas de *N.gonorrhoeae* e comparadas com antimicrobianos recomendados para o tratamento da gonorreia utilizando a metodologia de ágar diluição e Etest. A faixa de CIM de moditromicina e EDP-322 foram 0,004 - 256 mg/L e 0,008-16 mg/L, respectivamente. As atividades de moditromicina e EDP-322 foram principalmente superiores às da AZT e de antimicrobianos adicionais investigados, porém também foi observado uma resistência cruzada com cepas resistentes à AZT.

Recentemente foi demonstrado que a solitromicina, primeiro fluorocetolídeo, possui atividade bactericida contra cepas resistentes de *N.gonorrhoeae*, incluindo outros microorganismos (*Staphylococcus Aureus*, *Listeria Monocytogenes* e *Legionella Pneumophila*) (83), devido ao alto acúmulo intracelular, e está bem distribuída nos tecidos extracelulares. Também é bem absorvida por VO, com altos níveis plasmáticos e distribuição tecidual, possui longo efeito pós-antimicrobiano e propriedades anti-inflamatórias e parece segura e bem tolerada em altas doses (dose única de 1,6 g) (84). Além disso, possui melhor atividade e estabilidade em meio ácido em comparação com a AZT (48). No estudo de Fase II, Hook e colaboradores (49) comprovou que a solitromicina VO em dose única, em doses de 1000 mg e 1200 mg, foi 100% eficaz no tratamento da gonorreia comprovada por cultura nos locais genital, oral e retal da infecção e foi considerado um novo agente promissor para o tratamento da gonorreia. Porém no estudo de Fase III, onde há um número maior de participantes (n=261), a solitromicina em dose única de 1000 mg não foi uma alternativa adequada à CRO mais AZT como tratamento de primeira linha para gonorreia. Isso deve-se a um maior percentual de pacientes que relataram efeitos adversos gastrointestinais e taxas de cura inferiores ao tratamento atual. A possível causa relatada é que a duração insuficiente da exposição à solitromicina no local da infecção em um subconjunto de indivíduos foi o motivo das falhas no tratamento, o qual pode ser tratado adequadamente com o ajuste da dose. No entanto, quaisquer outros ensaios com doses mais longas precisam considerar o risco potencial de efeitos gastrointestinais e elevação das enzimas hepáticas (51).

Em resposta a esse trabalho, Fernandes e Craft (85) fizeram algumas considerações em relação a metodologia do estudo. Primeiro é em relação a comparação entre um monoterapia de dose única com um novo macrolídeo, solitromicina, com a combinação de duas drogas o qual um deles também é um macrolídeo. Outro ponto é a população de estudo o qual a maioria eram HSH (94%) onde não foi realizada o controle dos parceiros,

isso fornece margem para não ter certezas de foram falhas de tratamento ou reinfecção. Além disso, 11 (8%) dos pacientes do grupo da solitromicina vivem com HIV e esse medicamento é metabolizada pela CYP3A4, enzima que também é induzida pelo ritonavir. Com isso, a possibilidade da interferência em relação a biodisponibilidade é maior. A AZT também é metabolizada pela mesma enzima, porém há a CRO que garante a proteção contra a infecção gonocócica (85).

O Zoliflodacino é um medicamento bactericida com baixa frequência de resistência e potente atividade antibacteriana contra *N.gonorrhoeae*, incluindo cepas multirresistentes (CIM variando de $\leq 0,002$ a 0,25 mg/L) (27), que no estudo de Fase Clínica II obteve 97% de sucesso no tratamento em infecções urogenital, mas infecções na faringe não está estabelecido (86). Solitromicina obteve 100% de taxa de cura na fase clínica II (cultura negativa – Urogenital, orofaringe e reto) (49). Foerster e colaboradores (87) afirmaram que o zoliflodacino sozinho ou em combinação com antimicrobianos terapêuticos para infecções sexualmente transmissíveis, mata rapidamente os gonococos. O zoliflodacino permanece promissor para a monoterapia oral para gonorreia e como parte da terapia antimicrobiana dupla com baixo potencial de emergência de resistência. Um estudo de Fase III para avaliar a eficácia e a segurança do zoliflodacino no tratamento da gonorreia não complicada foi realizado em 2019.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Dos 68 compostos naturais, 41 (60,29%) inibiram o crescimento bacteriano em mais de 70 %, entre eles, os compostos derivados da alga *D. menziessi* AP1, AP10, AP12 e AP16, com inibição de crescimento bacteriano de 91,1%, 85,5%, 98,8% e 86,5% respectivamente.
- O composto natural AP12 apresentou a CIM de 100 mg/L para todas as cepas de referência de *N.gonorrhoeae* utilizadas.
- O composto sintético RR103 apresentou taxa variável de morte bacteriana frente às cepas de *N.gonorrhoeae*. Na concentração de 100 mg/L o composto obteve taxa de morte bacteriana de 14,4 % em contato com a cepa WHO X e de 76,1 % em contato com a cepa WHO M. Já na concentração de 20 mg/L, o composto não apresentou atividade antimicrobiana nas cepas WHO K, WHO X e WHO W, obtendo leituras de intensidade de fluorescência semelhantes com o controle negativo. A cepa WHO N apresentou a menor viabilidade na concentração de 20 mg/L, sendo de 27 %.
- A utilização do painel de 15 cepas de referência de *N.gonorrhoeae* permitiu a observação do comportamento de cada uma delas. Algumas cepas mais sensíveis as variações intra-ensaios apresentaram pouco crescimento no caldo GW (WHO O e WHO U).
- A tendência linear permitiu estipular a viabilidade bacteriana da cepa WHO F de *N.gonorrhoeae* em relação a cada composto e concentrações não realizadas, sugerindo que o composto AP12 é capaz de inibir a viabilidade bacteriana em 100% na concentração de 64 mg/L e de 94,8 % na concentração de 32 mg/L.
- O composto natural AP12 mostrou-se ser um potencial candidato para futuros estudos de desenvolvimento de novos medicamentos, por demonstrar sua atividade sem depender dos diferentes mecanismos de resistência expressos pelas diferentes cepas testadas, além de possuir características químicas que possibilitam a ser um composto por via oral, favorecendo o seu acesso e uso para a população.

7. REFERÊNCIAS

- 1 HILL, S. A.; MASTERS, T. L.; WACHTER, J. Gonorrhea - An Evolving Disease of the New Millennium. **Microb Cell**, v. 9, n. 3, p. 371-389, 2016. doi: 10.15698/mic2016.09.524.
- 2 ROWLEY, J. *et al.* Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bull World Health Organ**, v. 97, n. 8, p. 548-562, Agosto 2019.
- 3 PENNA, G. O.; HAJJAR, L. A.; BRAZ, T. M. Gonorréia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. n, p. 451-464, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000000500007>.
- 4 G.MCSHEFFREY, G.; D.GRAY-OWEN, S. *Neisseria gonorrhoeae*. **Molecular Medical Microbiology (Second Edition)**. 2ª Edição. ed. Toronto: [s.n.], v. 3, 2014. Cap. 82, p. 1471-1485. doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00082-2.
- 5 BAZZO, M. L. *et al.* First Nationwide Antimicrobial Susceptibility Surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015-16. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 7, p. 1854-1861, Julho 2018. doi: 10.1093/jac/dky090..
- 6 DIAHV. **NOTA INFORMATIVA Nº 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/.DIAHV/SVS/MS**. Brasília: [s.n.]. 2018. p. 2.
- 7 COSTA-LOURENÇO *et al.* Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 617-628, 2017. doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.001.
- 8 WHO. **WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae***. Geneva: [s.n.], 2016. 50 p.
- 9 CDC. **Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015**. 3. ed. Atlanta: MMWR Recomm Rep, v. 64, 2015.

- 10 OHNISHI, M. *et al.* s *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone. **Antimicrob Agents Chemother**, Japão, v. 55, p. 3538-3545, Julho 2011. doi: 10.1128/AAC.00325-11.
- 11 DEGUCHI, T. *et al.* New Clinical Strain of *Neisseria gonorrhoeae* with Decreased Susceptibility to Ceftriaxone, Japan. **Emerg Infect Dis.**, Japão, v. 22, n. 1, p. 142-144, Janeiro 2016.
- 12 CÁMARA, J. *et al.* Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Espanha, v. 67, n. 8, p. 1858-1860, Agosto 2012.
- 13 LAHRA, M. M.; RYDER, N.; WHILEY, D. M. A New Multidrug-Resistant Strain of *Neisseria gonorrhoeae* in Australia. **N Engl J Med**, v. 19, n. 371, p. 1850-1851, Novembro 2014.
- 14 UNEMO, M. *et al.* High-Level Cefixime- and Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* in France: Novel penA Mosaic Allele in a Successful International Clone Causes Treatment Failure. **Antimicrob Agents Chemother.**, França, v. 3, n. 56, p. 1273-1280, Março 2012.
- 15 CDC. **2013 AR Threats Report**. [S.l.]: [s.n.]. 2013. p. 114.
- 16 WHO, W. H. O. Global Action Plan to Control the Spread and Impact Of *Neisseria gonorrhoeae*. **Department of Reproductive**, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501>>. Acesso em: 28 Junho 2020.
- 17 BIEDENBACH, D. J. *et al.* Activity of JNJ-Q2, a novel fluoroquinolone, tested against. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 74, n. 2, p. 204-206, Outubro 2012.

18 KAZAMORI, D. *et al.* *In vitro* activity of WQ-3810, a novel fluoroquinolone, against multidrug-resistant and fluoroquinolone-resistant pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 443-449, Novembro 2014.

19 ZHANG, Y.-Y. *et al.* *In vitro* activities of tigecycline against clinical isolates from Shanghai, China. **In vitro activities of tigecycline against clinical isolates from Shanghai, China**, v. 50, n. 4, p. 267-281, Dezembro 2004. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.007.

20 FUJIMOTO, K. *et al.* Novel Carbapenem Antibiotics for Parenteral and Oral Applications: *In vitro* and In Vivo Activities of 2-Aryl Carbapenems and Their Pharmacokinetics in Laboratory Animals. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 697-707, Novembro 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01051-12>.

21 GOLPARIAN, D. *et al.* *In Vitro* Activity of the New Fluoroketolide Solithromycin (CEM-101) against a Large Collection of Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Isolates and International Reference Strains, Including Those with High-Level Antimicrobial Resistance: Potential Treatment Opt. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2739-2742, Fevereiro 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00036-12>.

22 JACOBSSON, S. *et al.* *In vitro* activities of the novel bicyclics modithromycin (EDP-420, EP-013420, S-013420) and EDP-322 against MDR clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and international reference strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 173-177, Janeiro 2015.

23 MANCUSO, A. M.; GANDHI, M. A.; SLISH, J. Solithromycin (CEM-101): A New Fluoroketolide Antibiotic and Its Role in the Treatment of Gonorrhea. **Journal Of Pharmacy Practice**, v. 31, n. 2, p. 195-201, Maio 2017. <http://dx.doi.org/10.1177/0897190017708073>.

24 STEFAN RIEDEL, J. E. R. *et al.* Determination of Disk Diffusion and MIC Quality Control Guidelines for Solithromycin, a Novel Fluoroketolide Antibacterial, against *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 3888-3890, Novembro 2015. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02250-15>.

- 25 SHOKEEN *et al.* Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. **Sex Transm Dis.**, v. 2, n. 32, p. 106-111, 2005. [10.1097/01.olq.0000152821.23777.90](https://doi.org/10.1097/01.olq.0000152821.23777.90).
- 26 JACOBSSON, S. *et al.* *n vitro* activities of the novel bicyclics modithromycin (EDP-420, EP-013420, S-013420) and EDP-322 against MDR clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and international reference strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 173-177, Janeiro 2015. <https://doi.org/10.1093/jac/dku344>.
- 27 BRADFORD, P. A. *et al.* Zoliflodacin: An Oral Spiropyrimidinetrione Antibiotic for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*, Including Multi-Drug-Resistant Isolates. **ACS Infect. Dis.**, v. 6, n. 6, p. 1332-1345, Abril 2020. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00021>.
- 28 UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 587-613, Junho 2014.
- 29 BERNARDINI, G. *et al.* Proteome analysis of *Neisseria meningitidis* serogroup A. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 2893-2926, 2004.
- 30 MARRI, P. R. *et al.* Genome Sequencing Reveals Widespread Virulence Gene Exchange among Human *Neisseria* Species. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010. [doi:10.1371/journal.pone.0011835](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011835).
- 31 HARRISON, O. B. *et al.* Genomic Analyses of *Neisseria gonorrhoeae* Reveal an Association of the Gonococcal Genetic Island With Antimicrobial Resistance. **J Infect**, v. 73, n. 6, p. 578-587, 2016. [doi:10.1016/j.jinf.2016.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.08.010).
- 32 BRATCHER, H. B. *et al.* A gene-by-gene population genomics platform: de novo assembly, annotation and genealogical analysis of 108 representative *Neisseria meningitidis* genomes. **BMC Genomics** volume, v. 15, p. 1138, Dezembro 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1138>.

- 33 QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* Host Adaptation and Pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 226-240, 2018. doi: 10.1038/nrmicro.2017.169.
- 34 BIGNELL; UNEMO. 2012 European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults. **International Journal of STD & AIDS**, v. 24, n. 2, p. 85-92, Fevereiro 2013. <https://doi.org/10.1177/0956462412472837>.
- 35 ISON, C. A.; DEAL, C.; UNEMO, M. Current and Future Treatment Options for Gonorrhoea. **Sex Transm Infect**, p. 89 Suppl 4:iv52-iv56., Dezembro 2013. doi:10.1136/sextrans-2012-050913.
- 36 MCSHEFFREY; RAY-OWEN. *Neisseria gonorrhoeae*. **Elsevier**, 2014.
- 37 KIRKCALDY, R. D. *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility Surveillance — The Gonococcal Isolate Surveillance Project, 27 Sites, United States, 2014. **Surveillance Summaries**, v. 65, n. 7, p. 1-19, Julho 2016.
- 38 BARBEE, L.; DOMBROWSKI, J. Control of *Neisseria gonorrhoeae* in the Era of Evolving Antimicrobial Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 723-737, Dezembro 2013. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.08.001>.
- 39 MORAN, J.; LEVINE, W. Drugs of Choice for the Treatment of Uncomplicated Gonococcal Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, Abril 1995.
- 40 BRASIL. **Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis**. Ministério da Saúde. Brasília. 1999.
- 41 BRASIL. **Departamento de Atenção Básica. HIV/Aids, hepatites e outras DST / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde**. Ministério da Saúde. Brasília. 2006.

42 SILVA, R. C.; JÚNIOR, G. G. D. S. GONORRHEA AND ITS RESISTANCE TO ANTIBIOTICS: A LITERATURE REVIEW. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 29, n. 1, p. 124-132, Outubro 2019.

43 JALIL, E. M. *et al.* prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 30, n. 12, p. 614-619, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032008001200005>.

44 BARBOSA, M. J. *et al.* Prevalência de *Neisseria gonorrhoeae* e infecção pela Chlamydia trachomatis em homens atendidos em clínicas de DST no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 5, p. 500-503, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000500005>.

45 LIMA, Y. A. R. D. *et al.* Sexually Transmitted Bacterial Infections Among Young Women in Central Western Brazil. **Int J Infect Dis**, p. 16-21, Agosto 2014. doi:10.1016/j.ijid.2014.03.1389.

46 EYRE, D. *et al.* Gonorrhoea Treatment Failure Caused by a *Neisseria gonorrhoeae* Strain With Combined Ceftriaxone and High-Level Azithromycin Resistance, England, February 2018. **Euro Surveill**, v. 23, n. 27, Julho 2018. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.27.1800323.

47 RIEDEL, S. *et al.* Determination of Disk Diffusion and MIC Quality Control Guidelines for Solithromycin, a Novel Fluoroketolide Antibacterial, Against *Neisseria gonorrhoeae*. **J Clin Microbiol**, p. 3888-3890, Dezembro 2015. doi:10.1128/JCM.02250-15.

48 MALLEGOL, J. *et al.* Determination of *In vitro* Activities of Solithromycin at Different pHs and Its Intracellular Activity against Clinical Isolates of *Neisseria gonorrhoeae* from a Laboratory Collection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 9, p. 4322-4328, Setembro 2013. doi: 10.1128/AAC.00564-13.

49 HOOK, E. W. *et al.* A Phase 2 Trial of Oral Solithromycin 1200 Mg or 1000 Mg as Single-Dose Oral Therapy for Uncomplicated Gonorrhoea. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 7, p. 1043-1048, Outubro 2015. DOI: 10.1093/cid/civ478.

50 CLINICALTRIALS.GOV. Efficacy and Safety Study of Oral Solithromycin Compared to Intramuscular Ceftriaxone Plus Oral Azithromycin in the Treatment of Patients With Gonorrhoea (SOLITAIRE-U): NCT02210325., 2014. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02210325>>. Acesso em: 29 Junho 2020.

51 CHEN, M. Y. *et al.* Solithromycin Versus Ceftriaxone Plus Azithromycin for the Treatment of Uncomplicated Genital Gonorrhoea (SOLITAIRE-U): A Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial. **Lancet Infect Dis**, v. 19, n. 8, p. 833-842, Agosto 2019. doi:10.1016/S1473-3099(19)30116-1.

52 PAPP, J. R. *et al.* *In vitro* Growth of Multidrug-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolates Is Inhibited by ETX0914, a Novel Spiropyrimidinetrione. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 3, p. 328-330, Setembro 2016. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.05.018.

53 VALLI, M. *et al.* Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, n. 11, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100036>.

54 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs Over the 30 Years From 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-335, Março 2012. DOI: 10.1021/np200906s.

55 SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, Dezembro 2015. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.031.

56 WADE, J. J.; GRAVER, M. A. A Fully Defined, Clear and Protein-Free Liquid Medium Permitting Dense Growth of *Neisseria gonorrhoeae* From Very Low Inocula. **FEMS Microbiol Lett**, v. 273, n. 1, p. 35-37, Agosto 2007.

57 UNEMO, M. *et al.* The Novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* Reference Strains for Global Quality Assurance of Laboratory Investigations: Phenotypic, Genetic and Reference Genome Characterization. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 11, p. 3096-3108, Novembro 2016. DOI: 10.1093/jac/dkw288.

58 FOERSTER, S. *et al.* A New Rapid Resazurin-Based Microdilution Assay for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 1, p. 1961-1968, Julho 2017. DOI: 10.1093/jac/dkx113.

59 PRÄBST, K. *et al.* Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: _____ **Methods in Molecular Biology**. [S.l.]: [s.n.], 2017. p. 1-17. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1.

60 WESELSKY. Ueber die Azoverbindungen des Resorcins, Junho 1871. <https://doi.org/10.1002/cber.18710040230>.

61 TWIGG. Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. **Nature**, v. 155, p. 401-402, Março 1945. <https://doi.org/10.1038/155401a0>.

62 O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, Outubro 2000.

63 GONG, X. *et al.* A resazurin-based, nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold-based 3D culture process. **Regenerative Biomaterials**, v. 7, n. 3, p. 271-281, Junho 2020. <https://doi.org/10.1093/rb/rbaa002>.

64 FOERSTER, S. *et al.* The First Wide-Scale Drug Repurposing Screen Using the Prestwick Chemical Library (1200 Bioactive Molecules) Against *Neisseria gonorrhoeae* Identifies High *in vitro* Activity of Auranofin and Many Additional Drugs. **APMIS**, v. 128, n. 3, p. 242-250, Março 2020. DOI: 10.1111/apm.13014.

65 VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 54, p. 10-14, 2011.

66 MORSE, S. A.; BARTENSTEIN, L. Factors Affecting Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 145, n. 4, p. 1418-1421, 1974. <https://doi.org/10.3181/00379727-145-38025>.

67 MORSE; HEBELER. Effect of pH on the Growth and Glucose Metabolism of *Neisseria gonorrhoeae*. **Infect Immun**, Portland, v. 1, n. 21, p. 87-95, Julho 1978.

68 MORSE, S. *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 6, n. 1, p. 28-37, Janeiro 1979. <http://dx.doi.org/10.1097/00007435-197901000-00009>.

69 SPENCE, J. M.; WRIGHT, L.; CLARK, V. L. Laboratory Maintenance of *Neisseria gonorrhoeae*. **Current protocols in Microbiology**, Fevereiro 2008. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc04a01s8>.

70 VAAR, M.; NURMINEN, M. Outer Membrane Permeability Barrier in *Escherichia coli* Mutants That Are Defective in the Late Acyltransferases of Lipid A Biosynthesis. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 43, n. 6, p. 1459-1462, 1999. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1459>.

71 HORMAECHE, R. D. *et al.* Alterations of the LPS determine virulence of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea-pig subcutaneous chambers. **Microbial Pathogenesis**, v. 11, n. 3, p. 159-170, Setembro 1991. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(91\)90046-D](https://doi.org/10.1016/0882-4010(91)90046-D).

72 SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 2, n. 5, Maio 2010. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.

73 SCHMID, B. *et al.* Porin Mutants With New Channel Properties. **Protein Sc**, v. 7, n. 7, p. 1603-1611, 1998. doi:10.1002/pro.5560070714.

74 PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. D. Virtual screening of bioactive compounds: concepts and applications. **Química Nova**, Março 2018.

75 SILVA, O. *et al.* *In vitro* anti-*Neisseria gonorrhoeae* activity of *Terminalia macroptera* leaves. **FEMS Microbiology Letters**, Janeiro 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11225.x>.

76 LIMA, L. Modern Medicinal Chemistry: challenges and Brazilian contribution. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

77 SHOKEEN, P. *et al.* *In vitro* Activity of Eugenol, an Active Component From *Ocimum Sanctum*, Against Multiresistant and Susceptible Strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 2, p. 174-179, Agosto 2008. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.03.018.

78 RUDDOCK, P. S. *et al.* Garlic Natural Health Products Exhibit Variable Constituent Levels and Antimicrobial Activity Against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus Aureus* and *Enterococcus Faecalis*. **Phytother Res**, v. 19, n. 4, p. 327-334, Abril 2005. DOI: 10.1002/ptr.1667.

79 NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Sixth Edition. ed. Pennsylvania : [s.n.], 2003.

80 ROZATTO, M. R. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Arrabidaea brachypoda*. UNESP, 2012. Disponível em: <<https://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/CienciasFarmaceuticas/MARIANA%20RODRIGUES%20ROZATTO.pdf>>.

Acesso em: 29 Junho 2020.

81 LIAO, M. *et al.* Cationic Peptide of the Male Reproductive Tract, HE2alpha, Displays Antimicrobial Activity Against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus Aureus* and *Enterococcus Faecalis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 5, p. 957-961, Novembro 2005. DOI: 10.1093/jac/dki350.

82 RUDDOCK, P. S. *et al.* Antimicrobial Activity of Flavonoids From *Piper Lanceaefolium* and Other Colombian Medicinal Plants Against Antibiotic Susceptible and Resistant Strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sex Transm Dis**, v. 38, n. 2, p. 82-88, Fevereiro 2011. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e3181f0bdbd.

83 LEMAIRE, S.; BAMBEKE, F. V.; TULKENS, P. M. Cellular Accumulation and Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activity of CEM-101, a Novel Fluoroketolide, Against *Staphylococcus Aureus*, *Listeria Monocytogenes*, and *Legionella Pneumophila* in Human THP-1 Macrophages. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 9, p. 3734-3743, Setembro 2009. doi: 10.1128/AAC.00203-09.

84 STILL, J. G. *et al.* Pharmacokinetics of Solithromycin (CEM-101) After Single or Multiple Oral Doses and Effects of Food on Single-Dose Bioavailability in Healthy Adult Subjects. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 5, p. 1997-2003, Maio 2011. doi: 10.1128/AAC.01429-10.

85 FERNANDES, P.; CRAFT, J. C. Phase 3 Trial of Treating Gonorrhoea With Solithromycin. **Lancet Infect Dis**, v. 19, n. 9, p. 928, Setembro 2019. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30430-X.

86 TAYLOR, S. N. *et al.* Single-Dose Zoliflodacin (ETX0914) for Treatment of Urogenital Gonorrhoea. **N Engl J Med**, v. 379, p. 1835-1845, 2018. DOI: 10.1056/NEJMoa1706988.

87 FOERSTER, S. *et al.* *In vitro* antimicrobial combination testing of and evolution of resistance to the first-in-class spiropyrimidinetrione zoliflodacin combined with six therapeutically relevant antimicrobials for *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 12, p. 3521-3529, Dezembro 2019. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz376>.

APÊNDICE A: Informações dos compostos sintéticos e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de *N. gonorrhoeae*, após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.

(continua)

Código	PM (g mol⁻¹)	Massa (mg)	DMSO (µL) para estoque de 10mg/mL	% Cresc. 1^a Leitura	% Cresc. 2^a Leitura	% Cresc. 3^a Leitura	Média	Desvio padrão
SRL101	358,41	2,24	224	32,9	9,5	20,4	23,9	9,6
SRL102	378,83	2,5	250	39,3	35,1	44,4	39,5	3,8
SRL103	362,38	2,19	219	29,5	43,6	17,5	30,0	10,7
SRL104	389,38	2,29	229	22,8	16,7	38,6	25,2	9,2
SRL105	282,32	3,4	340	7	5,9	5,5	6,4	0,6
SRL106	388,84	2,44	244	90,5	102,1	82,4	91,4	8,1
SRL107	408,86	2,33	233	96	100,2	71,8	91,0	12,5
SRL108	392,4	3,12	312	12,3	10,7	6,7	10,5	2,4
SRL109	372,4	2,59	259	12,9	48,9	40,9	28,9	15,4
SRL110	403,37	2,52	252	24	11,8	12,5	18,1	5,6
SRL111	376,36	1,99	199	42	35,1	37,7	39,2	2,8
SRL112	392,81	2,8	280	37,8	51	30,9	39,4	8,3
SRL113	328,38	2,09	209	54,6	101,6	48,6	64,9	23,7
SRL114	359,37	3,17	317	99,9	102,5	85	96,8	7,7
SRL117	419,4	1,91	191	113,1	102,4	46,5	93,8	29,2
SRL118	373,38	2,03	203	41	105,6	19,4	51,8	36,6
SRL119	404,35	1,14	114	50,7	110,3	46,3	64,5	29,2
SRL120	377,35	1,4	140	68,2	107,6	48	73,0	24,7
SRL121	393,8	1,05	105	71,5	103,1	53,3	74,9	20,6
RR101	175,06	3,29	329	71,8	93,4	44,5	70,4	20,0
RR102	205,07	2,36	236	39,5	87,3	30,5	49,2	24,9
RR103	230,22	3,76	376	17,1	9,2	2,2	11,4	6,1
RR104	251,18	2,34	234	91,3	99,5	18,3	75,1	36,5
RR106	189,17	1,38	138	88,3	102,4	31,4	77,6	30,7
RR108	281,31	2,44	244	73	108,3	47,6	75,5	24,9
RR109	311,33	2,67	267	82,5	108,2	13	71,6	40,2
RR111	296,28	2,3	230	71,6	95,1	58,5	74,2	15,1
RR112	193,17	2,24	224	72,4	92,6	15	63,1	32,9
RR113	269,27	2,05	205	86,5	92,9	10,5	69,1	37,4
RR114	235,24	6,77	677	67,9	87,8	5,5	57,3	35,1
RR115	219,19	2,08	208	57,2	84	48,3	61,7	15,2
RR116A	505,47	2,44	244	79,7	102,7	44,4	76,6	24,0
RR116B	337,32	2,76	276	86	91,6	22,7	71,6	31,2
RR117A	549,48	2,26	226	79,6	87,3	17,7	66,1	31,2
RR117B	381,33	2,29	229	78,1	89,9	27,8	68,5	26,9
RR118	295,29	1,36	136	74,3	98,9	9,4	64,2	37,8
RR119	337,32	1,1	110	87,4	95,3	5,1	68,8	40,8
RR120	278,3	2,62	262	71,6	73,7	72,7	72,0	0,5

APÊNDICE A: Informações dos compostos sintéticos e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de *N. gonorrhoeae*, , após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.

(continua)

Código	PM (g mol⁻¹)	Massa (mg)	DMSO (µL) para estoque de 10mg/mL	% Cresc. 1^a Leitura	% Cresc. 2^a Leitura	% Cresc. 3^a Leitura	Média	Desvio padrão
RR121	336,38	1,1	110	104,9	78,7	72,2	94,0	16,4
RR122	279,29	2,07	207	90,6	57,3	51,3	77,5	19,7
RR123	280,27	2,34	234	78	45,5	45,5	67,2	16,3
RR124	313,73	2,19	219	76,6	39,8	42,8	65,3	16,9
RR125	221,25	2,06	206	92,8	57,7	60,3	82,0	16,3
AL61	286,29	2,3	230	73	28,9	80,4	63,8	22,7
Al62	347,37	2,12	212	96,8	150,1	100,1	111,0	24,4
LM10	362,38	2,45	245	94,1	93,8	99,7	95,4	2,7
LM13	362,38	2,32	232	95,8	134	99,5	106,3	17,2
LM14	332,36	2,25	225	97	141,6	100	108,9	20,4
LM20	346,38	2,44	244	99,9	135,9	102,1	109,5	16,5
LM21	374,44	2,19	219	94	98,2	102,8	97,3	3,6
LM22	362,38	2,66	266	103,5	115,9	103,3	106,6	5,9
LM23	392,41	2,2	220	98,8	96,2	108,1	100,5	5,1
LM24	376,41	2,36	236	98,2	106,9	102,4	101,4	3,6
LM25	360,41	2,61	261	95,3	86,3	96,9	93,5	4,7
LM26	416,35	2,36	236	93,2	144,4	100,2	107,8	22,7
LM31	377,35	2,33	233	90,4	147,7	97,5	106,5	25,5
LM32	350,35	2,29	229	99,6	108,5	96,8	101,1	5,0
LM35	375,42	2,26	226	103,1	108,6	99,1	103,5	3,9
LM36	412,44	2,1	210	104,8	128,4	108,6	111,7	10,3
LM37	402,49	2,52	252	99,1	108,1	103,6	102,5	3,7
LM47	616,57	2,02	202	96,6	96,1	94,5	96,0	0,9
LM59	316,31	2,34	234	64,3	48,5	71,3	62,1	9,5
LM60	392,41	2,1	210	100,9	100,9	98,1	100,2	1,3
LM61	392,41	2,16	216	100,6	105,9	97,6	101,2	3,4
LM62	362,38	2,14	214	104	54,9	58,5	87,6	24,6
LM63	376,41	2,02	202	101,8	113	110,8	106,9	4,8
LM64	404,46	2,2	220	97,9	76,3	96,7	92,2	9,9
LM65	392,41	2,2	220	102,6	92,7	95,7	98,4	4,1
LM66	422,43	2,17	217	104,2	75,3	95,5	94,8	12,1
LM69	406,43	2,19	219	100,9	94,5	98,3	98,7	2,6
LM70	390,44	2,16	216	106,6	107,7	99,1	105,0	3,8
LM71	446,39	2,37	237	106,4	105,7	100,1	104,7	2,8
LM72	407,38	2,2	220	107	119,5	102,7	109,1	7,1
LM73	380,37	2,6	260	101,5	107,6	104,7	103,8	2,5
LM74	442,47	2,05	205	103,3	104,2	101,3	103,0	1,2
LM75	432,51	2,21	221	96,2	106,4	96,8	98,9	4,7
LM79	377,4	1,08	108	98,3	71	91,3	89,7	11,6

APÊNDICE A: Informações dos compostos sintéticos e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de *N. gonorrhoeae*, , após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.

(continua)

Código	PM (g mol ⁻¹)	Massa (mg)	DMSO (µL) para estoque de 10mg/mL	% Cresc. 1 ^a Leitura	% Cresc. 2 ^a Leitura	% Cresc. 3 ^a Leitura	Média	Desvio padrão
LM80	405,45	2,19	219	100,8	74,5	97,4	93,4	11,7
LM81	646,6	2,29	229	101,5	85	88,9	94,2	7,0
LM203	256,26	1,05	105	73,6	78,5	94,7	80,1	9,0
LM204	332,36	0,5	50	84,3	116,3	97,2	95,5	13,1
LM205	332,36	2	200	83,3	81,1	99,6	86,8	8,3
LM206	302,33	1,5	150	94,6	103,9	98,1	97,8	3,8
LM207	316,36	2,28	228	79,8	105,9	96,6	90,5	10,8
LM208	344,41	2,15	215	102,8	100,5	97,4	100,9	2,2
LM209	332,36	2,23	223	97,5	100,1	99,1	99,6	0,5
LM210	362,38	2,4	240	65,1	61,2	61,2	61,2	0,0
LM215	300,27	1,52	152	74,4	80,2	109,7	84,7	15,5
LM216	376,37	2,12	212	97,4	79,5	105,6	95,0	10,9
LM217	376,37	1,27	127	95,1	83,8	98,4	93,1	6,3
LM218	430,34	2,22	222	97	87,4	98	94,9	4,8
LM219	391,34	0,4	40	96,4	67	93,6	88,4	13,2
LM220	346,38	2,08	208	102,3	67,3	92,8	91,2	14,8
LM221	330,38	2,01	201	94,3	86,1	94,1	92,2	3,8
LM222	386,33	2,22	222	106,7	90,9	95,1	99,9	6,7
LM223	347,33	2,32	232	101,9	108,4	106,4	104,7	2,7
LM224	320,32	2,5	250	99,5	100,5	105,7	101,3	2,7
LM225	372,46	2,21	221	99,2	87,1	99,3	96,2	5,7
LM232	382,41	2,28	228	97,1	96,3	100	97,6	1,6
LM233	345,4	2,5	250	93,9	87,6	95,8	92,8	3,5
LM234	586,55	1,5	150	103,8	81,9	88,9	94,6	9,1
LM235	317,34	0,6	60	106,2	91,4	90,3	98,5	7,2
LM241	346,34	2,26	226	104,1	105,6	96,7	102,6	3,9
LM242	360,37	2,09	209	98,9	102,7	97,2	99,4	2,3
LM243	388,42	2,16	216	97,4	96,2	93,7	96,2	1,5
LM244	376,37	2,01	201	64,8	92	90,8	78,1	12,5
LM245	406,39	1,42	142	102,4	88,9	87,5	95,3	6,7
LM246	390,39	2,33	233	104,1	92,8	87,3	97,1	7,0
LM247	374,39	1,03	103	106,8	93,6	89,7	106,8	0,0
LM248	416,47	2,26	226	63	135,4	110,8	93,1	30,1
LM249	426,42	0,96	96	41,8	136,3	106,9	81,7	39,5
LM251	364,33	2,08	208	52,9	147,6	102,2	88,9	38,7
LM252	389,41	1,89	189	125,5	144,3	97,7	123,3	19,1
LM253	361,36	1,23	123	85	156,1	101,9	107,0	30,3
LM254	630,56	1,93	193	84,4	142	98,2	102,3	24,6

APÊNDICE A: Informações dos compostos sintéticos e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de *N. gonorrhoeae*, , após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.

								(conclusão)	
Código	PM (g mol⁻¹)	Massa (mg)	DMSO (µL) para estoque de 10mg/mL	% Cresc. 1^a Leitura	% Cresc. 2^a Leitura	% Cresc. 3^a Leitura	Média	Desvio padrão	
LD68B	462,41	2,24	224	58,4	126,1	102,4	86,3	28,0	
LD27B	418,4	2,05	205	11,8	99,4	104,8	57,0	42,6	
LD25B	434,4	2,03	203	12,6	103,9	107,5	59,2	43,9	
LM26B	478,17	2,26	226	8,9	90,7	99,4	52,0	40,8	

APÊNDICE B: Informações dos compostos naturais e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de *N. gonorrhoeae*, após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.

(continua)

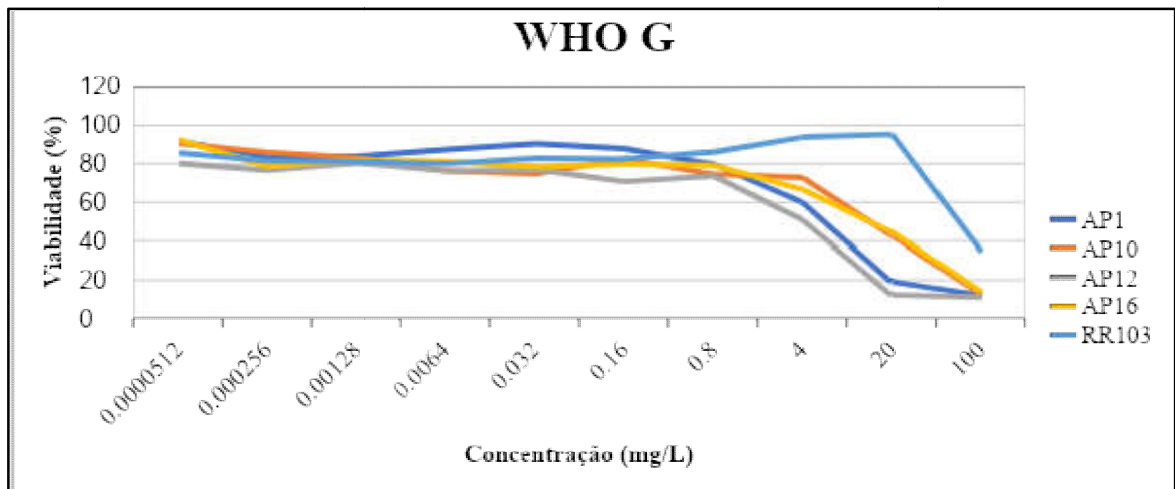
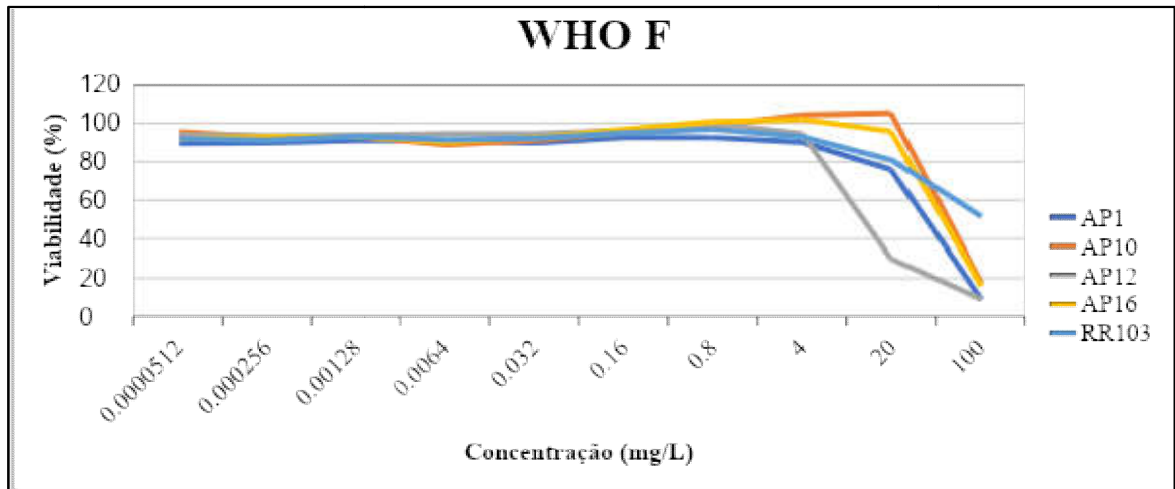
Código	PM (g mol ⁻¹)	Massa (mg)	DMSO (µL) para estoque de 10mg/mL	% Cresc. 1 ^a Leitura	% Cresc. 2 ^a Leitura	% Cresc. 3 ^a Leitura	Média	Desvio padrão
DI1	-	15,8	1580	94,6	109,1	94,9	98,3	6,8
DP7	-	5,44	544	0,7	58,4	0,5	15,1	27,2
DP8	-	3,95	395	0,6	29,5	0,4	7,8	13,7
DP9	-	8,69	869	5,2	11,5	1,5	5,9	4,1
D1	-	7,88	788	4,8	6,6	0,2	4,1	2,7
D2	-	12,5	1250	15,1	49	61,9	35,3	19,7
D3	-	8,3	830	3,5	49,2	24,7	20,2	18,7
D4	-	4,39	439	7,1	42,1	59,8	29,0	21,9
D5	-	2,56	256	22,9	57,3	71,8	43,7	20,5
DD1	-	7,2	720	28	107,6	95,6	64,8	35,0
DD2	-	4,23	423	63,1	67,9	5,3	49,9	28,4
DD3	-	4,89	489	13,9	36,2	30,6	13,9	0,0
DD4	-	4,61	461	89,1	52,2	101,4	83,0	20,9
DD5	-	5,6	560	83,3	59,2	99,4	81,3	16,5
GE1	252,14	4,21	421	-0,2	-0,3	0	-0,2	0,1
GE2	208,11	5,9	590	-0,5	-0,3	-0,3	-0,4	0,1
JA1	426,6	2,58	258	0,1	0	-0,3	0,0	0,2
LCT3	443,95	1,5	150	91,2	77,4	96,3	89,0	8,0
LICA	-	24,9	2490	0	1	0,4	0,4	0,4
DJ1	-	7,44	744	0,5	2,7	3,9	1,9	1,4
DJ2	-	17,01	1701	44,1	23	76,1	46,8	21,8
DJ3	-	10,97	1097	61,6	39	81,4	60,9	17,3
DJ4	-	11,82	1182	51,3	39,7	61,7	51,0	9,0
DJ5	-	8,04	804	60,4	37,8	75,4	58,5	15,5
DJ6	-	8,21	821	43,8	27,6	64,4	44,9	15,1
DJ7	-	5,46	546	59,4	24,2	67,2	52,6	18,7
DJ8	-	5,96	596	28,5	12,2	32,3	25,4	8,7
DJ9	-	7,37	737	68,1	45,3	71,5	63,3	11,6
DJ10	-	5,21	521	70,8	42	84,9	67,1	17,9
DP1	-	18,46	1846	33,9	19	43,6	32,6	10,1
DP2/4	-	8,41	841	27,9	14,7	62,1	33,2	20,0
DP3	-	9,52	952	-0,2	0,8	0,5	0,2	0,4
DP5	-	5,02	502	2	2,6	1,6	2,1	0,4
DP6	-	4,16	416	0,4	0,6	0,8	0,6	0,2
AP1	411,29	4,2	420	5,2	0	25	8,9	10,8
AP2	412,37	2,8	280	98,54	95,24	96,16	97,1	1,4
AP10	658,42	2,5	250	11,66	19,1	15,65	14,5	3,0
AP12	428,29	2,6	260	1,67	1,6	0	1,2	0,8

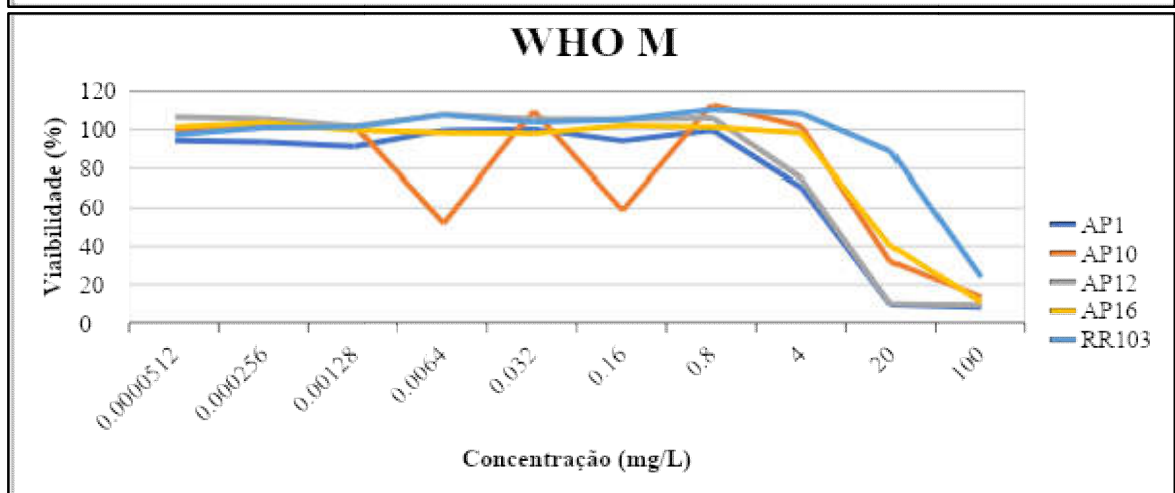
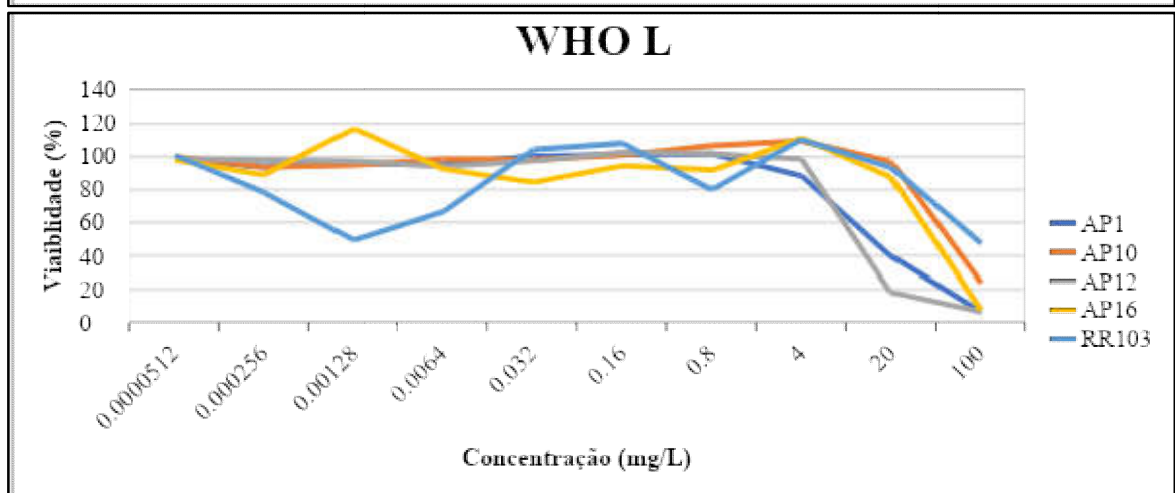
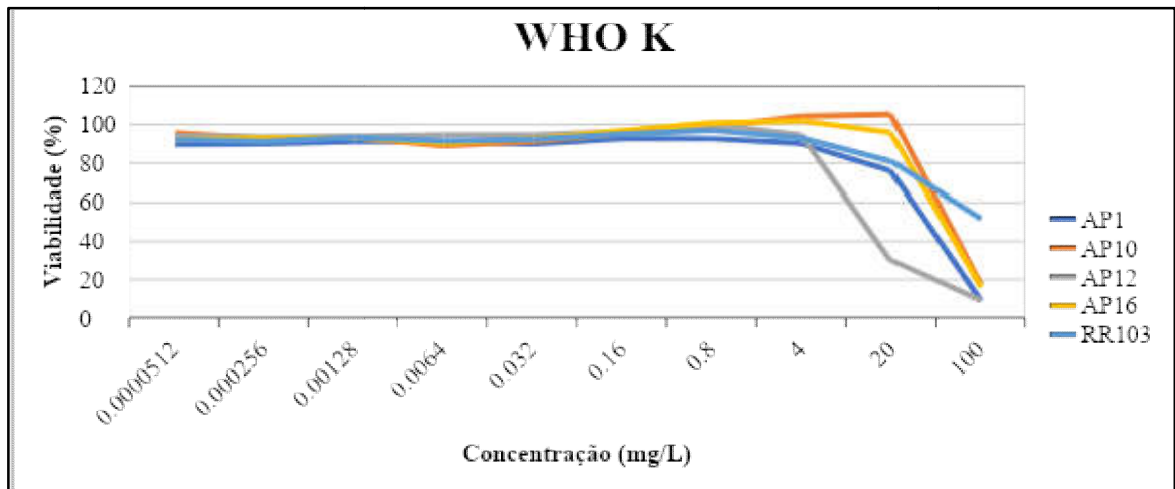
APÊNDICE B: Informações dos compostos naturais e porcentagem de crescimento de cada leitura utilizando o cepa WHO K de *N. gonorrhoeae*, após incubação a 35±1 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 6 horas em contato com o caldo GW e mais 1 horas de incubação em contato com a resazurina.

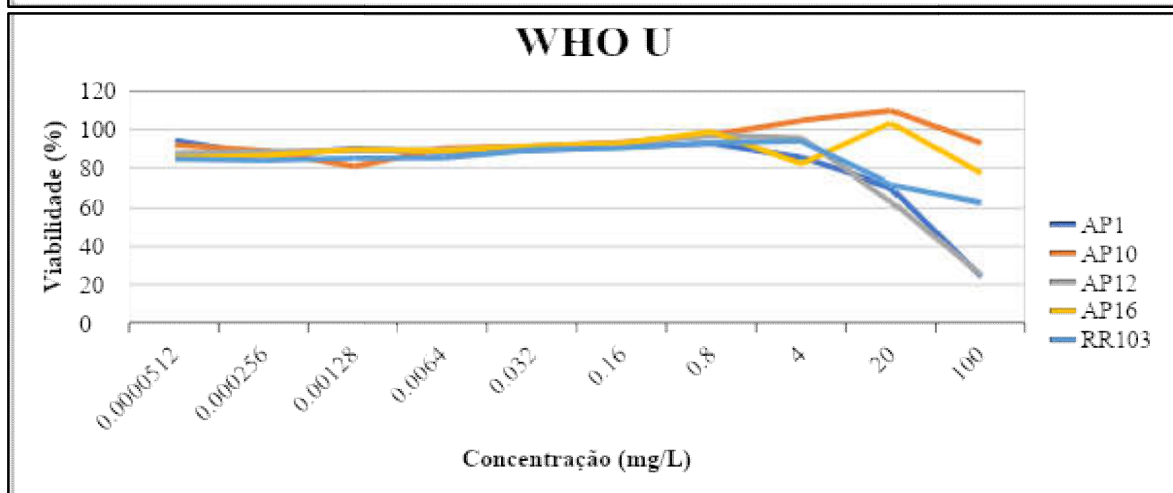
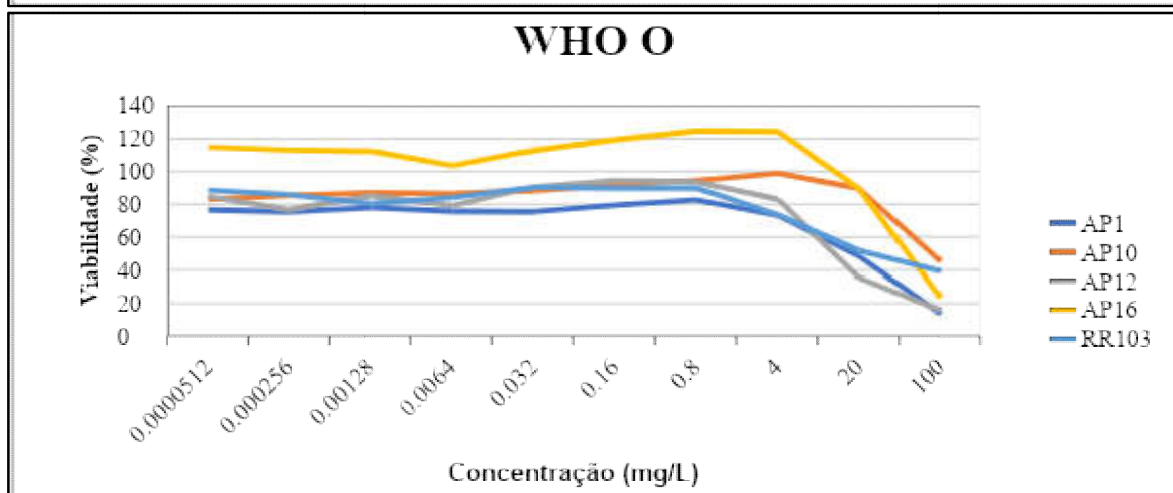
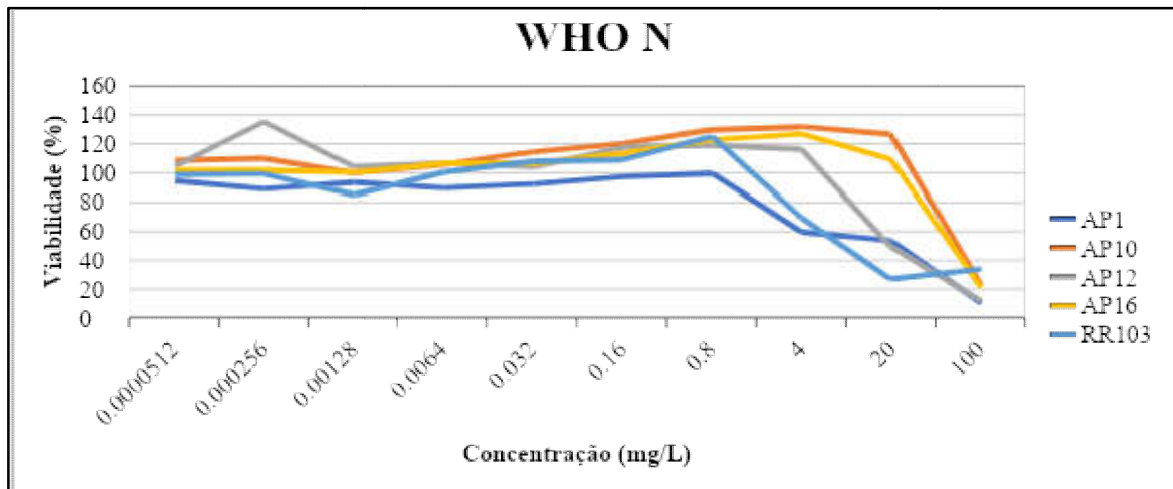
(conclusão)

Código	PM (g mol ⁻¹)	Massa (mg)	DMSO (µL) para estoque de 10mg/mL	% Cresc. 1 ^a Leitura	% Cresc. 2 ^a Leitura	% Cresc. 3 ^a Leitura	Média	Desvio padrão
AP16	424,4	2,8	280	18,08	16,97	1,03	13,5	7,8
AP18	196,1	2,5	250	97,52	95,77	59,54	87,6	17,5
AP24	456,28	2,5	250	58,22	69,37	17,31	50,8	22,4
AP27	-	19	1900	7,4	1,4	20,8	9,3	8,1
AP39	-	8,2	820	4,5	0	20	7,3	8,6
AP47	-	18,1	1810	1	-0,4	4,6	1,6	2,1
ADMPP	-	9,1	910	2,3	0	8,8	3,4	3,7
ADMPP3	-	7,3	730	2,3	-0,3	43,7	12,0	20,2
ADMPP4	-	4,1	410	-0,3	-0,5	6,2	1,3	3,1
ADMPP5	-	4,6	460	-0,4	-0,4	-0,2	-0,4	0,1
ADMPP6	-	5,3	530	-0,5	-0,1	0,1	-0,3	0,2
ADMPP7	-	10,5	1050	-0,1	-0,7	3	0,5	1,6
A4	-	3,8	380	0,4	0,1	0,5	0,4	0,2
A6	-	2,4	240	0	-0,5	0,1	-0,1	0,3
A7-12	-	11,1	1110	22,4	44,5	82,8	43,0	25,0
A16	-	7,2	720	38,4	90	84,2	62,8	23,1
A17	-	5,3	530	68,8	83,1	63,2	71,0	8,4
M3	-	2	200	0,3	-0,2	0,1	0,1	0,2
F11	397,98	2	200	9,6	3,5	100,5	30,8	44,4
AAM	-	4,9	490	92,2	58,5	95,5	84,6	16,7
ADA	-	15,7	1570	2,5	0,4	18,2	5,9	7,9
APD	-	8,6	860	31,9	17,3	22,7	26,0	6,0
ADMHM	-	11,7	1170	0,8	-0,2	14,4	4,0	6,7
ADMIE	-	4	400	0,8	1,6	0,5	0,9	0,5
LCT1	427,95	7,9	790	1,6	0,5	0,2	1,0	0,6
LCT2	443,95	4,5	450	6,2	0,4	1	3,5	2,6
LDAC7	414,6	7,8	780	1,5	10,7	0,8	3,6	4,5
LDT2	413,97	2	200	1,6	35,3	4,7	10,8	15,2
AC2	304,24	4,62	462	2,6	21,8	3,1	7,5	8,9

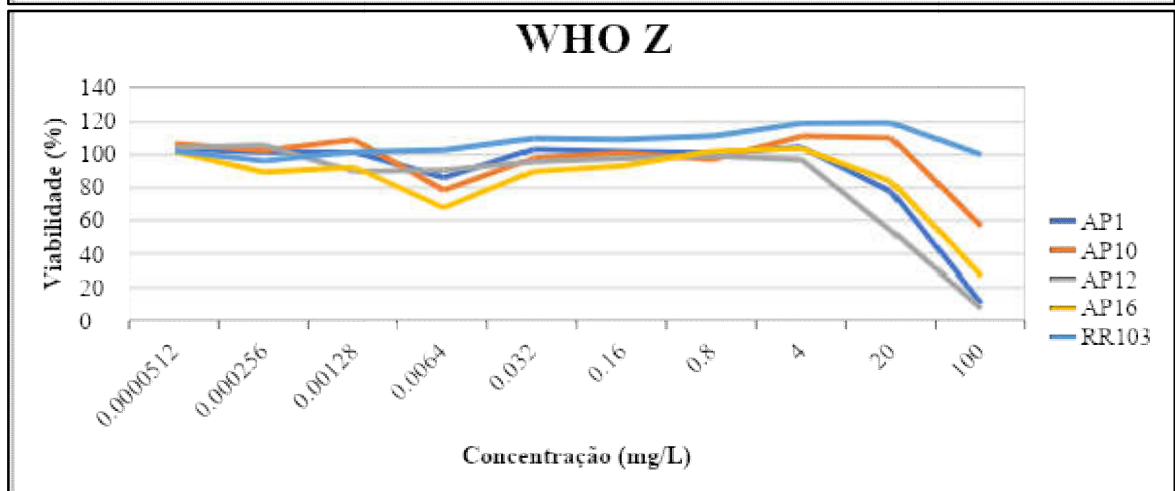
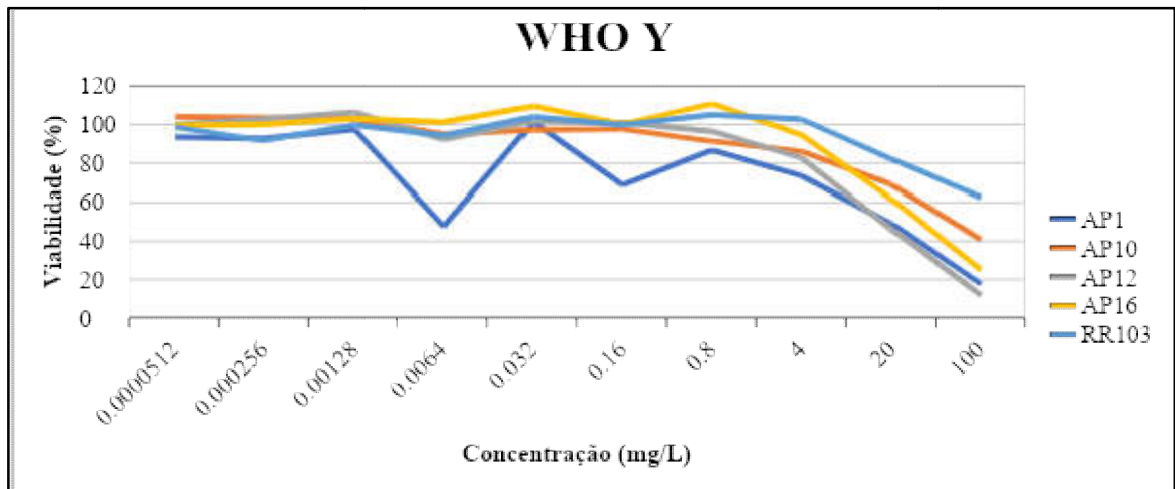
APÊNDICE C - Gráfico da porcentagem de crescimento referente a cada cepa de *N.gonorrhoeae*











ANEXO A - Perfil de sensibilidade e resistência das cepas de referência WHO de *N.gonorrhoeae* (n=14)

Características	WHO F	WHO G	WHO K	WHO L	WHO M	WHO N	WHO O	WHO P	WHO U	WHO V	WHO W	WHO X	WHO Y	WHO Z
β-Lactamase	-	-	-	-	Pos	Pos	Pos	-	-	Pos	-	-	-	-
Penicilina G (0,032 – >32)^a	S (0,032)	I (0,5)	2	2	≥32	≥32	≥32	I (0,25)	I (0,125)	>32	4	4	I (1)	2
Ampicilina (0,032 – >256)^a	0,032	0,25	2	2	8	4	24	0,064	0,125	>256	2	2	0,5	2
Temocilina (0,064 – 32)^a	0,064	1	16	4	1	1	4	1	0,5	4	8	32	8	8
Cefuroxima(0,032– 16)^a	0,064	0,5	16	8	0,5	0,25	1	0,125	0,032	1	8	8	8	8
Cefixima (<0,016 – 4)^a	S (<0,016)	S (<0,016)	BNR (0,25)	S (0,125)	S (<0,016)	S (<0,016)	S (0,016)	S (<0,016)	S (<0,016)	S (<0,016)	BNR (0,25)	ANR (4)	ANR (2)	HRL(2)
Ceftriaxona (<0,002 – 2)^a	S (<0,002)	S (0,008)	S (0,064)	BNR (0,25)	S (0,016)	S (0,004)	S (0,032)	S (0,004)	S (0,004)	S (0,064)	S (0,064)	ANR (2)	ANR (1)	BNR (0,5)
Ertapenem (0,004 – 0,125)^a	0,004	0,008	0,125	0,032	0,016	0,008	0,032	0,008	0,004	0,0125	0,064	0,064	0,008	0,032
Eritromicina (0,5 – >256)^a	0,5	1	1	2	1	0,5	1	4	>256	>256	2	2	2	4
Azitromicina (0,125 – >256)^a	S (0,125)	S (0,25)	S (0,25)	I (0,5)	S (0,25)	S (0,25)	S (0,25)	R (4)	R (4)	ANR (>256)	I (0,5)	I (0,5)	R (1)	R (1)
Ciprofloxacino(0,004 – >32^a	S (0,004)	BNR(0,125)	ANR (>32)	ANR (>32)	R (2)	R (4)	S (0,008)	S (0,004)	S (0,004)	ANR (>32)	ANR (>32)	ANR (>32)	ANR (>32)	ANR (>32)
Gemifloxacino (0,004 – 16)^a	0,004	0,125	16	8	0,5	1	0,008	0,016	0,008	4	16	16	2	8
Moxifloxacino (0,004 – 16)^a	0,004	0,064	8	16	1	1	0,016	0,032	0,008	8	8	8	4	8
Espectinomicina (8 – >1024)^a	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	ANR (>1024)	S (8)	S (8)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)	S (16)
Gentamicina (4 – 8)^a	4	4	4	4	4	4	4	4	4	8	4	4	8	4
Tetraciclina (0,25 – 32)^a	S (0,25)	32	R (2)	R (2)	R (2)	16	R (2)	I (1)	I (1)	R (4)	R (4)	R (2)	R (4)	R (4)
Rifampicina(0,125 – >32)^a	0,125	0,5	0,5	0,5	>32	>32	0,25	>32	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5
Sulfametoxazol (16 – >1024)^a	64	512	128	16	128	256	128	64	32	>1024	64	128	64	128
Solitromicina (0,064 – 32)^a	0,064	0,064	0,064	0,125	0,064	0,064	0,125	0,5	0,25	32	0,064	0,064	0,125	0,125
Zoliflodacino (0,032 – 0,125)^a	0,032	0,064	0,064	0,064	0,064	0,125	0,064	0,125	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064

Fonte: Adaptado de Unemo *et al.*, 2016

Legenda: S, sensível; I, resistência intermediária; R, resistente; BNR, baixo nível de resistência; ANR, alto nível de resistência.

^aFenótipo de resistência baseado na CIM (mg/L).