



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

GIULIANA OLIVEIRA RUAS COSTA

**TRIAGEM FENOTÍPICA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
EXTRATOS NATURAIS E COMPOSTOS SINTÉTICOS**

FLORIANÓPOLIS

2019

Giuliana Oliveira Ruas Costa

**TRIAGEM FENOTÍPICA DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
EXTRATOS NATURAIS E COMPOSTOS SINTÉTICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Thaís Cristine Marques Sincero

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira Ruas Costa, Giuliana  
Triagem fenotípica da atividade antibacteriana de  
extratos naturais e compostos sintéticos / Giuliana  
Oliveira Ruas Costa ; orientadora, Thais Cristine Marques  
Sincero, 2019.  
101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Pathogen Box. 3. multirresistência. 4.  
atividade antibacteriana. 5. sutezolida. I. Marques  
Sincero, Thais Cristine. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Giuliana Oliveira Ruas Costa

**Triagem fenotípica da atividade antibacteriana de extratos naturais e compostos sintéticos**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Miriam de Barcellos Falkenberg, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Iara Fabrícia Kretzer, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia

---

Prof. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenadora do Programa

---

Prof. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero  
Orientadora

Florianópolis, 26 de setembro de 2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, por ser a melhor pessoa que eu conheço, por me ensinar todos os dias sobre a vida, valores de alma, me impulsionar a evoluir, a ser alguém melhor, a acreditar, confiar e amar o próximo sem receios, sempre transbordando bondade da forma mais doce. Obrigada por tudo o que você fez e faz por todos que tem a felicidade de cruzar o seu caminho e por me ser meu constante exemplo de superação e resiliência.

À minha orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, pela oportunidade, pela sabedoria e ensinamentos compartilhados. Principalmente por ser extremamente humana, ter uma energia incrível e contagiante, por ser compreensível e também pela leveza que você proporciona aos seus alunos em meio às adversidades acadêmicas e da vida. Foi um prazer compartilhar mais essa etapa com você!

Às minhas queridíssimas amigas e companheiras do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada, Caetana e Daniela - certamente os melhores presentes da Pós-Graduação – obrigada por toda a força, parceria, aprendizado e por terem sido o melhor grupo de apoio possível durante todo esse processo (e vida afora), por toda a diversão e felicidade dos dias bons e sempre transmutarem os dias ruins em coisas leves. Muito provavelmente eu não teria chegado aqui sem vocês, contem comigo para o que precisarem!

À minha família e aos integrantes do meu “potinho seleta de especiais” que, independente de onde estejam neste planeta, estão sempre por perto “far away, but close”. Grazie, Jéssica e Carolzinha, minhas soul sisters, obrigada por todo o apoio, amizade e cumplicidade pela vida inteira, vocês deixam meu coração quentinho e me ensinam sempre o valor da amizade, que distância não existe e a lembrar do que realmente importa. À Mariana por ser, ao mesmo tempo, minha cúmplice, testemunha e júri das peripécias da minha história, que sorte a minha ter uma irmã como você pra compartilhar essa vida! Ao meu “grupinho manezinho intercontinental” Sabrina, Andy, Rafa, Camila, Bea, Dan, Regina, Gui, Matt, Márblyo, Vitor, Lucas e Buss por pintarem o meu mundo com as cores do espectro visível e deixar meus dias mais felizes. À Fernanda pela amizade e a Márick que, por muitas vezes, organizou a minha desordem acadêmica e me proporcionou soluções e alternativas que tanto contribuíram para este trabalho. À Mari e a Naia por “terem voltado antes de ir”, por toda a ressignificação e lições de vida compartilhadas neste(s) ano(s) entre cafés, bons drinks e terapias no pôr do sol & lua cheia. Obrigada também pelos meus slides lindos com padrão Maioral de qualidade e por me mostrarem que as folhas caem, mas que o essencial (além de invisível aos olhos), é imortal.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia pela companhia e as conversas descontraídas durante cafés entre experimentos.

À Professora Maria Luiza Bazzo e ao professor Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk que disponibilizaram seus equipamentos para que as análises deste trabalho pudessem ser realizadas.

Ao Departamento de Análises Clínicas da UFSC pela compreensão com a flexibilidade da minha jornada de trabalho para que este mestrado pudesse ser realizado e concluído.

Aos professores Flávio Henrique Reginatto e Lilian Sibelle Campos Bernardes que gentilmente cederam compostos sintéticos e extratos naturais; E à *Medicines for Malaria Venture* por disponibilizar e fornecer os compostos do Pathogen Box® utilizados neste trabalho.

Às professoras membros da banca de defesa, Miriam de Barcellos Falkenberg e Iara Fabrícia Kretzer, pela disponibilidade e pelas contribuições que foram dadas para a revisão e futuros artigos provenientes desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e corpo docente e discente pelo conhecimento compartilhado.

E por fim, como afirmou Antoine de Saint-Exupéry: “Aqueles que passam por nós, não se vão sós e não nos deixam sós; eles deixam um pedaço de si e levam um pouco de nós”, agradeço então a todos que cruzaram o meu caminho com quem compartilhei momentos, trocas, lições e aprendizados ao longo destes anos que fizeram de mim a pessoa que sou hoje e chegar até aqui.

**Gratidão!**

## RESUMO

A resistência bacteriana representa uma crescente e preocupante ameaça à saúde pública em todo o mundo, especialmente com a emergência de microrganismos multidroga-resistentes. Nas últimas décadas, a conscientização sobre essa ameaça global aumentou consideravelmente e diversas iniciativas políticas e de pesquisas foram implementadas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Entretanto, alguns obstáculos encontrados nos âmbitos científicos, regulatórios e econômicos, tem atrasado este processo. Este estudo teve como objetivo avaliar a potencial atividade antibacteriana de compostos isoxazólicos e extratos naturais obtidos de laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina e também via plataforma *open source* Pathogen Box<sup>®</sup>, contra isolados bacterianos caracterizados e clinicamente relevante de Bacilos Gram-negativos, *S. aureus* e *Enterococcus spp.* Os compostos isoxazólicos e os extratos naturais não apresentaram atividade inibitória nas concentrações avaliadas na etapa de triagem. Os compostos do Pathogen Box<sup>®</sup> foram avaliados na concentração de 100 µM contra as cepas sensíveis: *Escherichia coli* (ATCC<sup>®</sup> 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 29213), em que 69 compostos apresentaram atividade inibitória de crescimento. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) desses compostos foi determinada contra as cepas resistentes: i) *E. coli* resistente à polimixina (MCR-1), para a qual 3 compostos apresentaram CIM ≤ 50µM (MMV004168, MMV228911 MMV675997); e ii) contra a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), para a qual 6 compostos tiveram CIM entre 25µM – 0,78µM (MMV688771, MMV020537, MMV688756, MMV687700, MMV687699, MMV021057). Os nossos resultados demonstraram promissora atividade contra *S. aureus* da sutezolida (MMV688756), independente do mecanismo de resistência apresentado pela bactéria, com baixa CIM, inferior à concentração citotóxica 50% em células HepG2 e com índice de seletividade = 8. Esses resultados preliminares de atividade antibacteriana da sutezolida são promissores e podem embasar estudos adicionais *in vitro* e *in vivo*. O Pathogen Box<sup>®</sup> demonstra ser uma excelente ferramenta *open source* que auxilia na pesquisa e investigação destas moléculas promissoras e pode ser um assistente potente nos estágios iniciais do reaproveitamento de medicamentos.

**Palavras-chave:** Pathogen Box, atividade antibacteriana, Multirresistência, sutezolida

## ABSTRACT

### Phenotypic screening of antibacterial activity of natural extracts and synthetic compounds

Bacterial resistance is an evergrowing threat to public health worldwide, especially with the emergence of multi-drug resistant microorganisms. In recent decades, an awareness of this global threat has risen considerably and several policy and research initiatives have been implemented in developing new antimicrobials. However, some obstacles faced in the scientific, regulatory and economic spheres have delayed this process. This study aimed to evaluate the potential antibacterial activity of isoxazole compounds and natural extracts obtained from laboratories of the Federal University of Santa Catarina and also via via open source platform Pathogen Box® against characterized and clinically relevant bacterial isolates of Gram-negative bacillus, *S. aureus* and *Enterococcus sp.* The isoxazole compounds and the natural extracts showed no inhibitory activity at the concentrations evaluated at the screening stage. Pathogen Box® compounds were evaluated at a concentration of 100 µM against sensitive strains: *Escherichia coli* (ATCC® 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213), in which 69 compounds showed growth inhibitory activity. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of these compounds was determined against the resistant strains: i) polymyxin resistant *E. coli* (MCR-1), where 3 compounds had MIC ≤ 50µM (MMV004168, MMV228911 MMV675997); and ii) against the methicillin resistant *S. aureus* strain (MRSA), for which 6 compounds presented MICs between 25µM – 0,78µM (MMV688771, MMV020537, MMV688756, MMV687700, MMV687699, MMV021057). Our results showed promising activity of sutezolid (MMV688756) against *S. aureus* regardless of the bacterial resistance mechanism, with low MIC, below the 50% cytotoxic concentration in HepG2 cells and with selectivity index = 8. These preliminary results concerning the antibacterial activity of sutezolid are promising and may support further in vitro and in vivo studies. Pathogen Box® proves to be an excellent open source tool that assists in the research and investigation of these promising molecules and can be a potent assistant in the early stages of drug repurposing.

**Keywords:** Pathogen Box, antibacterial activity, multiresistance, sutezolid

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. ....	20
Figura 2: Classificação dos mecanismos e sítios de ação dos antimicrobianos. ....	22
Figura 3: Classificação das $\beta$ -lactamases. ....	23
Figura 4: Distribuição quantitativa dos compostos do Pathogen Box® classificados através da patologia de origem. ....	29
Figura 5: Esquema representativo do BioMap <i>Screening</i> .....	30
Figura 6: Estrutura do Isoxazol .....	31
Figura 7: Reação de oxirredução da resazurina .....	39
Figura 8: Esquema representativo da triagem com os compostos do Pathogen Box® .....	42
Figura 9: Representação esquemática de uma microplaca utilizada no ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM .....	43
Figura 10: Representação da leitura visual de crescimento bacteriano e revelação com a resazurina da triagem de isoxazóis .....	46
Figura 11: Estruturas dos derivados 5-amino-isoxazole-4-carbonitrilas com atividade antibacteriana.....	48
Figura 12: Distribuição dos compostos que apresentaram atividade antibacteriana agrupados pela classificação determinada no Pathogen Box®. ....	50
Figura 13: Microplaca representativa do resultado obtido no ensaio para determinação de CIM dos compostos que apresentaram atividade na triagem com 100 $\mu$ M. ....	53
Figura 14: Estruturas químicas dos compostos MMV021660 e trimetoprima que possuem grupamento 2,4-diamino pirimidina .....	58
Figura 15: Estrutura química do composto MMV000858.....	59
Figura 16: Inibição de crescimento apresentado pelos 10 compostos do Pathogen Box® com potencial atividade antibacteriana .....	64
Figura 17: Perfil de inibição de crescimento % para isolados de <i>S. aureus</i> com perfis de resistência distintos contra MMV688756.....	64
Figura 18: Resultado obtido no ensaio em microplaca para determinação de CIM da sutezolida contra as cepas de <i>S. aureus</i> .....	65
Figura 19: Modelo representativo do local de atividade da vancomicina no septo divisão e as mudanças associadas com o fenótipo VISA.....	66
Figura 20: Estruturas químicas da linezolida e sutezolida .....	67
Figura 21: Histograma dos antimicrobianos utilizados e da sutezolida .....	71
Figura 22: Clusterização hierárquica dos antimicrobianos e compostos com atividade antibacteriana expressiva.....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Cepas bacterianas utilizados no estudo. ....	33
Quadro 2: Compostos isoxazólicos investigados .....	35
Quadro 3: Extratos naturais investigados .....	36
Quadro 4: Antimicrobianos utilizados neste estudo .....	38
Quadro 5: Concentração dos antimicrobianos utilizados como controle de inibição bacteriana na triagem para cada uma das cepas, representadas pelo gene de resistência. ....	39
Quadro 6: Percentual de inibição dos compostos isoxazólicos na concentração de 100 µM contra as cepas bacterianas testadas .....	47
Quadro 7: Compostos do Pathogen Box® que apresentaram atividade inibitória na triagem com as cepas sensíveis ( <i>E. coli</i> 25922 e <i>S. aureus</i> 29213), organizados pela localização dos compostos nas placas de fornecimento (Anexo 1). ....	51
Quadro 8: Compostos com atividade inibitória que foram solicitados para realizar demais análises. ....	55
Quadro 9: Dados obtidos de hits gerados por BLASTp entre alvos biológicos de diferentes microrganismos patogênicos que sofreram inibição pelos compostos do Pathogen Box .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da CIM para os compostos do Pathogen Box® com atividade antimicrobiana contra <i>E. coli</i> 25922 e <i>E. coli</i> MCR-1. ....	53
Tabela 2: Determinação da CIM para os compostos do Pathogen Box® com atividade antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> MRSA.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Pareamento de átomos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZT	zidovudina
BARDA	Autoridade Biomédica de Pesquisa e Desenvolvimento Avançado
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração
Blastp	<i>Basic Local Alignment Search Tool Protein</i>
BSA	<i>Broad Spectrum antimicrobial</i>
BuOH	Butanol
C. atb	Controle positivo de inibição de crescimento
C. cresc	Controle positivo de crescimento
C. est.	Controle de esterilidade do meio
CARB-X	<i>Combatting Bacteria Resistant Biopharmaceutical Accelerator</i>
CC50	Concentração Citolóxica 50%
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DHFR	Enzima Diidrofolato Redutase
DHODH	Enzima Diidroorotato Desidrogenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxorribonucléico
dTMP	2'-desoxitimidina-5'-monofosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ESBL	$\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido
EtOH	Etanol
FDA	Agência de Medicamentos e Alimentos dos EUA
FICI	Índice da concentração inibitória fracionária
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepático
hVISA	<i>Staphylococcus aureus</i> hetero-resistente à vancomicina
IC	Inibição de crescimento

IC%	Percentual de inibição de concentração
IC50	Concentração inibitória de 50%
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCS	Subestrutura Comum Máxima
MDR	Bactérias Multirresistentes
MeOH	Metanol
MHBC	Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado
MIC	Microdiluição em caldo
MIMA	Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
MLRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina e linezolida
mM	Milimolar
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
MRA	Microrganismos multirresistentes
MRC5	Linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
ND4BB	<i>New Drug Medicine for Innovative Initiative</i>
NIAID	Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas
OD <sub>630</sub>	Densidade ótica 630 nm
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilinas
Pbox	<i>Pathogen Box</i> ®
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDR	Bactérias Pan-Resistentes
pEtN	Fosfoetanolamina transferase
pH	Potencial Hidroelétrico
PTC	Centro Peptidil-Transferase
RAM	Resistência Antimicrobiana
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	Cassete Cromossômico Estafilocócico mec
SMILES	Especificação de Introdução Linear Molecular Simplificada
Tc	Coefficiente de Tanimoto
TS	Enzima Timidilato sintase
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS .....	18
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	19
2.2	MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIBACTERIANOS E DE RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	21
2.3	DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIMICROBIANOS .....	24
2.4	ESTRATÉGIAS DESENVOLVIDAS PARA AUXILIAR NA INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS E MECANISMOS DE AÇÃO INÉDITOS .....	26
<b>2.4.1</b>	<b>Reposicionamento de fármacos .....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.2</b>	<b><i>Docking</i> e simulação molecular .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.3</b>	<b><i>BioMap Screening</i> .....</b>	<b>29</b>
2.5	COMPOSTOS ISOXAZÓLICOS .....	31
2.6	EXTRATOS NATURAIS .....	31
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
3.1	CEPAS UTILIZADAS .....	33
3.2	OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS/EXTRATOS.....	34
<b>3.2.1</b>	<b>Compostos Isoxazólicos .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Extratos naturais .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Compostos do Pathogen Box®.....</b>	<b>37</b>
3.3	PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS .....	37
3.4	SELEÇÃO E PREPARO DOS ANTIMICROBIANOS .....	38
3.5	ENSAIO REVELAÇÃO COM RESAZURINA .....	39
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA - TRIAGEM.....	40
<b>3.6.1</b>	<b>Triagem da atividade antibacteriana dos isoxazóis .....</b>	<b>40</b>

<b>3.6.2</b>	<b>Triagem da atividade antibacteriana dos extratos naturais .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Triagem dos compostos Pathogen Box® .....</b>	<b>42</b>
3.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	43
3.8	PESQUISA DOS COMPOSTOS EM BANCOS DE DADOS .....	44
3.9	BIOMAP SCREENING .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
4.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA - TRIAGEM.....	46
<b>4.1.1</b>	<b>Triagem de compostos isoxazólicos .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Triagem de extratos naturais.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Triagem dos compostos Pathogen Box® .....</b>	<b>50</b>
4.2	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – CIM.....	52
4.3	PESQUISA DOS COMPOSTOS EM BANCOS DE DADOS .....	56
<b>4.3.1</b>	<b><i>Escherichia coli</i> 25922 e <i>Escherichia coli</i> MCR-1 .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3.2</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....</b>	<b>60</b>
4.4	ENSAIOS COM NOVA REMESSA DE COMPOSTOS DO PATHOGEN BOX® ..	63
4.5	CITOTOXICIDADE .....	69
4.6	BIOMAP SCREENING .....	70
<b>4.6.1</b>	<b>Clusterização hierárquica .....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
	<b>APÊNDICE A - Triagem de isoxazóis e extratos naturais .....</b>	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE B – Pathogen Box.....</b>	<b>87</b>
	<b>APÊNDICE C – Ensaio de extratos naturais com interferência de coloração .....</b>	<b>88</b>
	<b>ANEXO 1 – Compostos contidos no Pathogen Box.....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXO 2 – Compostos com atividade antimicrobiana contra isolados .....</b>	<b>99</b>
	<b>ANEXO 3 – Dados de citotoxicidade dos compostos com melhor atividade antibacteriana.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A identificação da atividade antibacteriana da penicilina por Fleming em 1929 revolucionou a medicina e desencadeou a busca e a investigação por novos compostos com propriedades antimicrobianas tanto de origem natural como sintética (BEUTLER, 2009). Desde os primórdios da inserção dos antimicrobianos com finalidade terapêutica na sociedade, a preocupação com a resistência existe. Inclusive, o próprio Fleming (1945) em seu discurso no prêmio Nobel já havia afirmado sobre o uso da penicilina: “Pode haver um perigo, no entanto, na subdosagem. Não é difícil fazer micróbios resistentes à penicilina em laboratório apenas expondo-os a concentrações não suficientes para matá-los, e a mesma coisa aconteceu ocasionalmente no corpo. Pode chegar a hora em que a penicilina possa ser comprada por qualquer pessoa nas lojas. Depois, há o perigo de que o homem ignorante possa facilmente autoadministrar-se uma subdosagem e expor seus micróbios a quantidades não letais do fármaco, tornando-os resistentes”. Atualmente, podemos constatar isto globalmente, uma vez que a utilização exacerbada dos antimicrobianos tanto na clínica como na agricultura e pecuária, elevou consideravelmente a exposição e o desenvolvimento de resistência (CHANG et al., 2014). A crescente ameaça das infecções por microrganismos multirresistentes se tornou um alarmante problema a nível mundial. Com o constante aparecimento de novos mecanismos de resistência, a capacidade de combater e tratar doenças infecciosas comuns, assim como a prevenção durante procedimentos cirúrgicos, transplantes e até mesmo o controle de diabetes se tornou bastante arriscada, podendo levar a uma prolongada estadia hospitalar, incapacidade do paciente e até a óbitos (WHO, 2018).

Uma recente revisão independente, encomendada pelo governo do Reino Unido, estimou que sem novas políticas para impedir a disseminação da resistência aos antimicrobianos, as 700.000 mortes por ano de atualmente podem aumentar para cerca de 10 milhões de mortes por ano até 2050, algo em torno de um óbito a cada 3 segundos associados à resistência bacteriana. Acrescido a isto, o impacto econômico cumulativo a nível global está estimado ser em torno de 100 trilhões de dólares (O’NEILL, 2016). Apenas nos Estados Unidos, pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas anualmente por bactérias resistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento clínico, o que resulta diretamente em torno de 23.000 mortes todo ano (CDC, 2013; WHO, 2014a).

Além do aumento da resistência bacteriana aos agentes utilizados no tratamento, houve uma redução no desenvolvimento de novos antimicrobianos (BLAIR et al., 2014). A compreensão dos mecanismos de ação dos fármacos existentes e de como as bactérias se

tornaram resistentes a eles é fundamental para avançarmos na pesquisa de moléculas com mecanismos inéditos e mais eficazes. Apesar disso, a aprovação regulamentar de novos antimicrobianos declinou 90% nos últimos 30 anos nos Estados Unidos (SHLAES et al., 2013). Isso se dá, possivelmente devido às restrições da Agência de Medicamentos e Alimentos dos EUA (FDA), uma vez que os padrões e requisitos para o desenvolvimento de antimicrobianos são muito altos, além do risco de o novo medicamento ser descartado ainda no processo de desenvolvimento, o que desestimula os laboratórios a manterem suas linhas de pesquisa (HEINZERLING, 2013; WATKINS; BONOMO, 2016). Nas últimas décadas, muitas empresas farmacêuticas importantes descontinuaram seus programas de desenvolvimento de antimicrobianos (PROJAN; SHLAES, 2004), pois além do alto custo em pesquisa e desenvolvimento, a rápida evolução da resistência antimicrobiana gerou para a indústria farmacêutica uma diminuição do retorno de mercado (PAYNE et al., 2006) quando comparado com outros agentes terapêuticos. Acrescido a isto, tem-se a dificuldade de identificar novos compostos via métodos tradicionais de pesquisa e os requisitos regulatórios exigem ensaios clínicos grandes e complexos para aprovação de novos fármacos de modo geral (ECHOLS, 2012).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos (incluindo bactérias resistentes responsáveis por infecções agudas e *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente) que necessitam prioridade de financiamento e facilidade na coordenação global de estratégias de pesquisa e desenvolvimento para a descoberta de novos compostos ativos. A lista destina-se a empresas farmacêuticas que possam investir na pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos e a universidades, instituições públicas de pesquisa e parcerias público-privadas que estão se tornando cada vez mais envolvidas nesta estratégia. Paralelamente a isto, agências reguladoras como FDA e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) estão trabalhando na simplificação do caminho de aprovação de antimicrobianos para necessidades médicas não atendidas (WHO, 2017).

Nesse contexto, este estudo tem como objetivo investigar a possível atividade antibacteriana de extratos naturais e compostos sintéticos produzidos na Universidade Federal de Santa Catarina, assim como de compostos obtidos via plataforma Pathogen Box®.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Realizar a triagem da potencial atividade antibacteriana de extratos naturais e compostos isoxazólicos frente a bactérias sensíveis e multirresistentes.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a triagem da atividade antibacteriana de compostos isoxazólicos sintéticos;
- Realizar a triagem da atividade antibacteriana de extratos naturais;
- Realizar a triagem da atividade antibacteriana dos compostos do Pathogen Box®;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos que apresentaram atividade antibacteriana;
- Verificar potencial do Pathogen Box® como uma ferramenta no auxílio para o reposicionamento de fármacos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

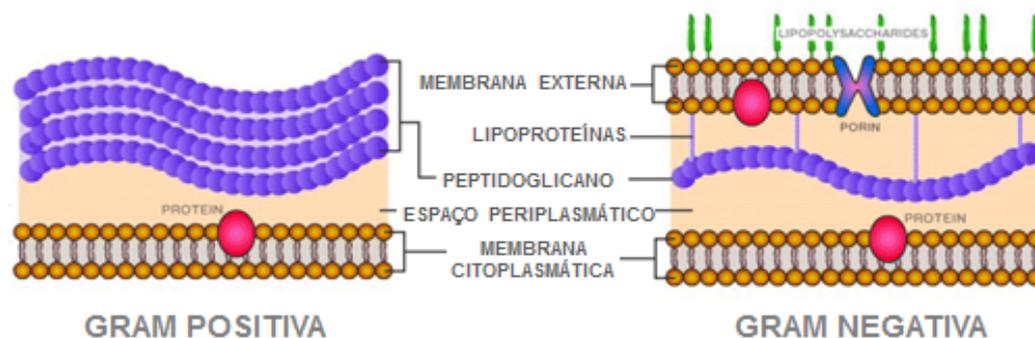
### 2.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Pela definição oficial da Organização Mundial de Saúde (OMS), resistência antimicrobiana (RAM) é a capacidade que um microrganismo apresenta de impedir que um antimicrobiano exerça sua atividade contra ele. Desta forma, mesmo em tratamento com terapia antimicrobiana estes microrganismos conseguem se desenvolver, e isto acarreta a ineficácia de tratamentos padrões, infecções persistentes que podem levar a óbito, ou se espalhar para outros indivíduos e para o meio ambiente (WHO, 2018). O termo “resistência a antimicrobianos” abrange diferentes microrganismos (bactérias, vírus, parasitas) e classes de fármacos como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários.

Os antimicrobianos são organizados em classes pelo mecanismo e sítio de ação no organismo alvo. A resistência a um fármaco pode acarretar resistência a outros antimicrobianos de classes relacionadas pelas semelhanças entre eles ou entre as estruturas e locais onde exercem atividade nas bactérias (WHO, 2014a).

A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca é decorrente de uma característica inata da bactéria, seja por sua morfologia ou fisiologia, que a torna naturalmente resistente a um antimicrobiano. O principal exemplo desta, é a presença da membrana externa nas bactérias Gram-negativas (Figura 1); esta funciona como uma barreira física que restringe a permeabilidade de diversos fármacos eficazes contra bactérias Gram-positivas que, por não conseguirem transpor esta camada, ficam impossibilitadas de atingir seu alvo de ação. É o caso da vancomicina, um antibiótico glicopeptídeo que não consegue penetrar a célula bacteriana devido ao seu alto peso molecular e assim, exercer sua atividade inibindo a síntese da parede bacteriana (NELSON, 1999; BLAIR et al., 2014). A membrana externa também pode expressar grande quantidade de bombas de efluxo inespecíficas que expulsam o antimicrobiano de dentro da célula, reduzindo assim sua concentração intracelular (NIKAIDO, 1994; ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017). Já a daptomicina atua na membrana citoplasmática por despolarização nos fosfolipídios aniônicos em um processo mediado por  $\text{Ca}^{2+}$ ; como as bactérias Gram-negativas apresentam uma proporção muito inferior destes fosfolipídios aniônicos, o potencial de ação da daptomicina é reduzido em relação às bactérias Gram-positivas (RANDALL et al., 2012).

Figura 1: Diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: adaptado de: BYJU'S. **Diferenças entre bactérias Gram positivas e Gram negativas.** Disponível em: <https://byjus.com/biology/difference-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>.

Já resistência adquirida esta relacionada à capacidade das bactérias em adquirir ou desenvolver resistência a antibacterianos por mutações espontâneas que podem ser transmitidas para gerações subsequentes via transmissão vertical, ou através da aquisição de material genético via elementos genéticos móveis como plasmídeos (pequenas sequências de DNA circular bacteriano capazes de se auto replicar), integrons (sistemas de aquisição de material genético capaz de capturar, integrar e expressar genes externos) e transposons (sequências lineares de DNA capazes de se movimentar dentro do mesmo genoma de uma bactéria) em um processo conhecido como transferência horizontal de genes. Esta troca entre bactérias pode ocorrer por meio de conjugação (coordenada por plasmídeos), transformação (aquisição de material genético proveniente da lise celular de outra bactéria) e transdução (aquisição de material por meio de bacteriófagos) (BLAIR, 2014; OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016). A resistência pode se manifestar por diferentes mecanismos como: alteração na permeabilidade celular que reduz a concentração intracelular do antimicrobiano, como bombas de efluxo e porinas; alterações nos alvos de ação dos antibacterianos por mutação genética e inativação do fármaco por hidrólise, como é o caso das penicilinas (BLAIR et al., 2014; ALI; RAFIQ; RATCLIFFE, 2018).

Os microrganismos resistentes estão presentes no meio ambiente e podem circular entre populações de animais, seres humanos, sendo também encontrados em alimentos destinados ao consumo humano. Entre alguns fatores descritos que promovem a resistência bacteriana aos antimicrobianos temos: não adesão às melhores práticas no controle de infecção em ambiente hospitalar; uso excessivo de antimicrobianos na agricultura; longa permanência de pacientes imunocomprometidos em ambiente hospitalar; turismo e viagens pelo mundo que podem facilitar a transferência de genes de resistência; saneamento básico deficiente e sistemas de água contaminada que podem levar à disseminação de bactérias

resistentes pelo esgoto; prescrição inadequada e excessiva de antimicrobianos de amplo espectro que podem exercer pressão seletiva sobre bactérias comensais (NIAID, 2014).

No entanto, o uso de antimicrobianos é, isoladamente, o fator mais importante na evolução da resistência antimicrobiana ao redor do mundo. Esses estão entre os medicamentos mais prescritos na medicina humana, sendo que mais de 50% destas prescrições não são necessárias ou são prescritos em doses inadequadas, como nos casos de infecções virais do trato respiratório, no uso de fármacos de amplo espectro para tratar infecções simples (CDC, 2013) e no uso disseminado de antimicrobianos na agricultura para prevenir infecções e como promotores de crescimento (CHANG et al., 2014). O uso de antimicrobianos na saúde humana e animal tem contribuído para a seleção e o desenvolvimento de bactérias multirresistentes (MDR), não suscetíveis a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos, ou até mesmo de bactérias pan-resistentes (PDR), que apresentam resistência a todos os agentes de todas as classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012; VENTOLA, 2015).

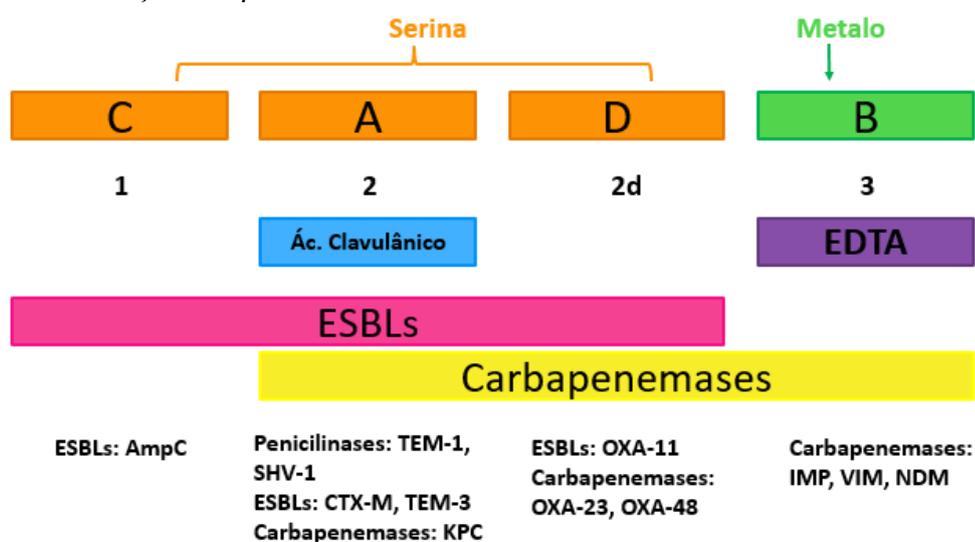
## 2.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIBACTERIANOS E DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os antimicrobianos atuais são categorizados em classes de acordo com seu sítio e mecanismo de ação principal (Figura 2). **Os inibidores da síntese de parede celular**, como os  $\beta$ -lactâmicos, agem ao interferir nas enzimas necessárias para formar a camada de peptidoglicano, as proteínas de ligação à penicilina (PBP) ou então através da ligação aos resíduos finais - D-Ala-D-Ala - da camada recém-formada de peptidoglicano, o que a impede de se estabilizar, manter forma e função (glicopeptídeos). **Os inibidores da síntese da membrana celular** (lipopeptídeos) agem pela despolarização e aumento de permeabilidade da membrana celular que acarreta lise e morte da bactéria. **Inibidores de síntese de DNA** inibem enzimas como as DNA girase e topoisomerase IV, essenciais no processo de replicação bacteriano que acarretam na quebra do DNA (fluoroquinolonas). **Inibidores de via metabólica** bloqueiam a via do ácido fólico, crucial para a síntese do DNA, por inibição competitiva da enzima que catalisa sua síntese (sulfonamidas) exercendo um efeito bacteriostático. **Inibidores de síntese protéica** se ligam às subunidades ribossomais bacterianas 30S (aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina) e 50S (cloranfenicol) bloqueando a síntese proteica (OLIPHANT, 2015; TENOVER, 2006; WONG; OLIVER; LININGTON, 2012).



(EDTA) mas não pelo ácido clavulânico. A classe C (cefalosporinas) tem como principal representante a enzima AmpC, que confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos carbapenêmicos, hidrolisando também as cefalosporinas de 3ª geração. As enzimas da classe D (oxacilinas) como OXA-23 e OXA-48, que são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, hidrolisam oxacilina e conferem resistência à penicilina, oxacilina e meticilina. (WATKINS; BONOMO, 2016; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Figura 3: Classificação das  $\beta$ -lactamases.



Fonte: Adaptado de Munita e Arias, 2016

- **A resistência à meticilina em *S. aureus* (MRSA):** resulta da aquisição de um gene extracromossomal, geralmente o gene *mecA*, que se localiza em um cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Este gene codifica a PBP2a, uma PBP alterada que possui baixa afinidade aos  $\beta$ -lactâmicos, tornando a maioria destes fármacos ineficazes contra MRSA, sendo necessárias terapias alternativas, como a vancomicina, para combater infecções graves (MUNITA; ARIAS, 2016).

- **A resistência à vancomicina em *S. aureus* (VRSA / VISA):** o fenótipo VRSA apresenta resistência mediada por genes presentes no cromossomo bacteriano e/ou adquiridos por plasmídeos, como *vanA*, *vanB* e *vanC*, que produzem precursores de peptidoglicano modificados com aminoácidos diferentes daqueles aos quais os glicopeptídeos conseguem se ligar, diminuindo assim a afinidade de ligação e a atividade antimicrobiana da vancomicina (VAN HOEK et al., 2011).

- **A resistência mediada pelo gene *mcr-1* em bactérias Gram-negativas:** confere resistência às polimixinas através da alteração do lipídeo A, que é o constituinte da membrana citoplasmática onde as polimixinas se ligam para exercer sua atividade antibacteriana. O gene *mcr-1* é o primeiro relato de resistência às polimixinas mediada por plasmídeos; ele codifica uma fosfoetanolamina transferase (pEtN) que adiciona uma pEtN a porção do lipídeo A e reduz a afinidade do fármaco a seu sítio de ação (LIU et al., 2016; TIETGEN et al., 2018)

### 2.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

Apesar da constante disseminação da resistência antimicrobiana como uma potente ameaça à morbidade e mortalidade a nível mundial, a pesquisa farmacêutica e desenvolvimento não conseguiu atender à necessidade clínica de novos antibacterianos. Tanto que nos últimos 20 anos, apenas duas classes de antimicrobianos, as oxazolidinonas e os lipopeptídeos, tiveram êxito em todas as etapas de desenvolvimento e foram aprovadas pelas agências regulatórias internacionais de medicamentos, sendo ambas para bactérias Gram-positivas. Para Gram-negativas, as alternativas terapêuticas estão cada vez mais escassas e nos últimos 10 anos esta preocupação se intensificou com o surgimento da resistência aos carbapenêmicos, a principal classe de tratamento para bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (LUEPKE et al., 2016). A aprovação regulamentar de novos antibacterianos declinou 90% nos últimos 30 anos nos Estados Unidos (SHLAES et al., 2013). Isto se dá possivelmente devido às restrições da FDA, uma vez que os padrões e requisitos para o desenvolvimento de novos fármacos são muito altos. Além disso, há o risco de o novo medicamento ser descartado ainda no processo de desenvolvimento, o que desestimula os laboratórios pela falta de retorno financeiro (HEINZERLING, 2013; WATKINS; BONOMO, 2016). De cada 5-10 mil compostos promissores, apenas cinco chegarão à fase I e destes, apenas um será aprovado pelo FDA; tudo isso em um processo que leva entre 10 a 15 anos desde seu potencial antimicrobiano ser descoberto. No momento, existem 14 antibacterianos em ensaios clínicos com potencial para tratar bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE de prioridade crítica (PEW, 2019).

Na última década muitas empresas farmacêuticas importantes descontinuaram seus programas de desenvolvimento de antimicrobianos (PROJAN; SHLAES, 2004), pois além do alto custo em pesquisa e desenvolvimento, a rápida evolução da resistência antimicrobiana gerou para a indústria farmacêutica uma diminuição do retorno de mercado (PAYNE et al., 2006) quando comparados com outros agentes terapêuticos para diabetes, hipertensão e

doenças crônicas. Acrescido a isto, tem-se a dificuldade em identificar novos compostos via métodos tradicionais de pesquisa e os requisitos regulatórios exigem, de modo geral, ensaios clínicos grandes e complexos para aprovação (ECHOLS, 2012).

O Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID), e a Autoridade Biomédica de Pesquisa e Desenvolvimento Avançado (BARDA) são os dois principais programas de governo dedicados a estabelecer parcerias com empresas públicas e privadas com a finalidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos. Em 2015, o presidente americano Barack Obama lançou o programa nacional de ação para o combate de bactérias resistentes e redirecionou mais de 600 milhões de dólares para o desenvolvimento de pesquisas de antibacterianos por via deste programa (LUEPKE et al., 2016). O NIAID colabora com o FDA na pesquisa e no desenvolvimento nas fases iniciais, e após aprovação de fase I, os ensaios das fases subsequentes de antibacterianos passam a ser desenvolvidos pelo BARDA ou indústrias farmacêuticas (CARB, 2017).

Em 2017, a OMS publicou uma lista de patógenos que necessitam prioridade de financiamento e facilidade na coordenação global de estratégias de pesquisa e desenvolvimento para a descoberta de novos compostos ativos contra bactérias resistentes responsáveis por infecções agudas e tuberculose multirresistente. A lista destina-se a empresas farmacêuticas que possam investir na pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, mas também a universidades, instituições públicas de pesquisa e parcerias público-privadas. Nos últimos anos surgiram alguns destes novos modelos de colaboração entre empresas farmacêuticas e universidades como o *Broad Spectrum antimicrobial (BSA)*, o *Combating Bacteria Resistant Biopharmaceutical Accelerator (CARB-X)* e o *New Drug Medicine for Innovative Initiative (ND4BB)*. Paralelamente a isto, agências reguladoras como a Agência de Medicamentos e Alimentos dos EUA (FDA) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) estão trabalhando na simplificação do caminho de aprovação de antimicrobianos para necessidades médicas não atendidas (WHO, 2017). Segundo dados obtidos pela Pew Charitable Trusts (2019), desde 2014 dez antimicrobianos foram aprovados, e 15 foram descontinuados. Entre os aprovados no último ano estão as tetraciclina Nuzyra® (omadaciclina) e Xerava® (eravaciclina); e outros cinco que foram submetidos para licença de comercialização: iclaprima, uma 2,4-diaminopirimidina com ação na enzima diidrofolato redutase; cefiderocol (S-649266), uma cefalosporina com ação nas PBP; imipeném/cilastatina + relebactam (MK-7655A), uma associação tripla entre um carbapenêmico + inibidor dehidropeptidase + inibidor de  $\beta$ -lactamase com alvo nas PBP e  $\beta$ -lactamases; lascufloxacino (KRP-AM1977) uma fluoroquinolona com ação na Topoisomerase II; e lefamulin (BC-3781),

uma pleuromutilina com ação na subunidade 50S ribossomal no centro peptidil-transferase (PTC). Entretanto, nenhum desses novos compostos ou combinações apresenta um mecanismo de ação inovador.

## 2.4 ESTRATÉGIAS DESENVOLVIDAS PARA AUXILIAR NA INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS E MECANISMOS DE AÇÃO INÉDITOS

### 2.4.1 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento (ou reaproveitamento) de medicamentos é uma estratégia promissora adotada a fim de contornar algumas dificuldades encontradas nas fases iniciais do desenvolvimento de um novo fármaco. Uma vez que a certificação para administração em humanos e/ou animais já é conhecida, existem informações detalhadas de farmacologia, formulação, dose e potencial toxicidade disponíveis (ASHBURN; THOR, 2004); assim, os custos e duração do processo de licenciamento podem ser drasticamente reduzidos. Esta abordagem consiste em selecionar medicamentos existentes que estão aprovados ou em fases finais de ensaios clínicos para uso em uma finalidade e investigar seus possíveis potenciais terapêuticos ao serem empregados com êxito no tratamento de uma indicação clínica diferente (PUSHPAKOM et al., 2018; PEYCLIT; BARON; ROLAIN, 2019).

Existem diversos casos de sucesso de redirecionamento de fármacos para outras patologias com liberação regulamentada para uso, como é o caso da sildenafil, desenvolvida para angina e através de uma análise clínica retrospectiva foi descoberto seu potencial para a disfunção erétil, a finalidade para qual este medicamento é comercializado atualmente (ASHBURN; THOR, 2004). Porém, para antimicrobianos ainda não existe um caso de sucesso aprovado. Os medicamentos até apresentam atividade bactericida, porém a CIM tem valores elevados que dificilmente serão alcançados clinicamente sozinhos, sendo uma alternativa o uso associado a outros medicamentos por efeito sinérgico (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2017).

Para identificar e selecionar um medicamento potencial existem recursos modernos disponíveis para aumentar o nível de confiança, como abordagens computacionais e experimentais que podem funcionar de modo sinérgico nesse redirecionamento (PUSHPAKOM et al., 2018). A triagem inicial pode se dar por métodos computacionais através de uma pesquisa por estruturas e possíveis mecanismos e ação em bancos de dados virtuais, pelas propriedades e similaridades com subsequente análise de acoplamento

molecular, em busca de interações alvo-receptor (PEYCLIT; BARON; ROLAIN, 2019). No escopo da investigação da atividade antimicrobiana, os ensaios fenotípicos são realizados pela triagem de bibliotecas de compostos em ensaios de microdiluição para detectar atividade antibacteriana. Nos casos positivos, é realizada a quantificação da atividade potencial com determinação da CIM seguindo diretrizes internacionais (SUN et al., 2016). Posteriormente, são realizados estudos e revisão na literatura das propriedades da molécula e das informações toxicológicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas para avaliar possibilidade de uso como monofármaco ou necessidade de associação. Uma vez finalizada essa avaliação prévia, os fármacos podem ir para os ensaios clínicos de desenvolvimento de fase III para validação de atividade, obtenção de registro e comercialização (PEYCLIT; BARON; ROLAIN, 2019).

Especificamente para bactérias MDR, existem diversos estudos realizados com o objetivo de avaliar novas opções terapêuticas com as mais diversas classes de medicamentos. A sertralina e a levopromazina, um antidepressivo e um antipsicótico respectivamente, apresentaram efeito sinérgico em associação com polimixina B contra bactérias Gram-negativas do grupo ESKAPE (OTTO et al., 2019). Compostos naturais como o pterostilbeno, que possui ação anticancerígena e antioxidante, demonstrou sinergismo ao restaurar o efeito antibacteriano da polimixina em isolados MCR-1, com redução de CIM em até 8 vezes (ZHOU et al., 2018). Younis, Thangamani e Seleem (2015) identificaram dois fármacos não antibióticos, ebseleno (EB) e 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdUrd), que apresentaram potente atividade contra VRSA, VISA, MRSA e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e linezolida (MLRSA). A concentração inibitória mínima na qual 90% de todos os isolados de *S. aureus* resistentes avaliados foram inibidos (CIM90) foi 0,25 mg/L para Ebselen, e 0,0039 mg/L para FdUrd. Ambos os fármacos também prolongaram consideravelmente a sobrevivência de ratos em ensaio de septicemia. Em outro estudo, Hu, Liu e Coates (2018) avaliaram a eficácia *in vitro* e *in vivo* da zidovudina (AZT), um medicamento atualmente empregado no tratamento do HIV, em associação com a colistina. Para isso, realizaram um ensaio de *checkerboard* entre estes fármacos contra 74 cepas de Enterobactérias. Os autores obtiveram Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI)  $\leq 0,5$  para 61% das cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL, 87% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, 100% das cepas produtoras de NDM-1 e 92% das resistentes à colistina (MCR-1). Este índice indica se a associação de dois ou mais fármacos apresenta atividade sinérgica ( $\leq 0,5$ ), antagônica ( $\geq 4,0$ ) ou indiferente (0,5 - 4,0) em relação ao fármaco empregado em monoterapia (ODDS, 2003).

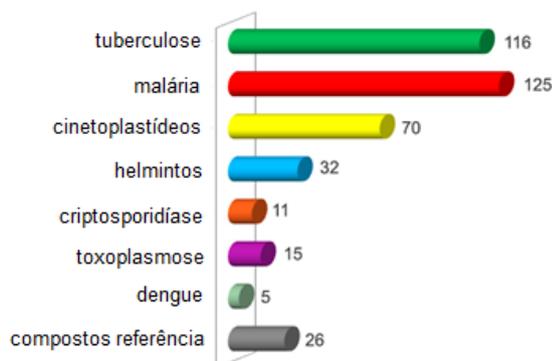
Esta associação também se mostrou promissora no modelo de infecção peritoneal murina visando tratar infecções por Enterobactérias resistentes.

#### 2.4.1.1 Pathogen Box®

O Pathogen Box® é uma iniciativa da “Medicines for Malaria Venture” (MMV), uma organização que tem como missão reduzir os malefícios da malária em países onde ela é endêmica através do descobrimento, desenvolvimento e entrega de novos e efetivos fármacos antimaláricos. Foi idealizada com o intuito de fornecer um conjunto de compostos já pré-investigados, assim como moléculas análogas a essas, com atividades para doenças negligenciadas como malária, esquistossomose, leishmaniose entre outras. A partir de uma biblioteca inicial de quatro milhões de compostos, 400 que apresentaram maior potencial em ensaios fenotípicos foram selecionados para compor o kit. Desde 2015 ele é distribuído gratuitamente para pesquisadores ao redor do mundo, com o compromisso de que todos os dados obtidos sejam publicados em domínio público dentro de dois anos da obtenção dos resultados. O objetivo é gerar um banco de dados mundial em plataforma *open source* alimentado com as informações e dados obtidos pela comunidade acadêmica na investigação de possíveis atividades terapêuticas destes compostos para diferentes patógenos. Isto pode ser realizado em parceria com especialistas da química medicinal e especialistas em doenças negligenciadas para que se obtenha um ponto de partida concreto para novos projetos de desenvolvimento de medicamentos. Espera-se que os resultados possam auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, maximizando a exploração destas moléculas a fim de ampliar e manter o direcionamento de pesquisa para doenças negligenciadas. Os compostos são fornecidos já com dados completos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, sendo que os resultados foram obtidos por parceiros acadêmicos e de indústrias farmacêuticas interessados nestas doenças.

Este projeto é uma continuidade do Malaria Box, desenvolvido no ano de 2012 e financiado pela Fundação Bill & Melinda Gates, com a mesma finalidade, sendo pioneiro na validação do conceito de descoberta de fármacos via *open source*. No Pathogen Box®, foram incluídos compostos conhecidos por serem ativos para uma ampla variedade de doenças negligenciadas (Figura 4) e a expectativa é que o alcance e o impacto nessas patologias sejam muito maiores (WHO, 2014b; MMV, 2019).

Figura 4: Distribuição quantitativa dos compostos do Pathogen Box® classificados através da patologia de origem.



Fonte: Adaptado de MMV, 2019 Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/about-pathogen-box>

#### 2.4.2 Docking e simulação molecular

*Docking* é uma das abordagens computacionais que utiliza a estrutura dimensional para prever as possíveis interações e afinidades de ligação entre um composto e o sítio de ação, receptor ou alvo. Pode-se partir tanto do alvo em busca de moléculas que possam vir a exercer atividade nele, como na pesquisa por um novo fármaco para tratamento alvo-específico, ou inibidor-competitivo. Outra opção é partir de um composto e testar diferentes alvos aos quais ele apresente um potencial de interação, o chamado acoplamento reverso (PUSHPAKOM et al., 2018). De maneira geral, o *docking* explora o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação da proteína alvo. Existem diversos softwares e bancos de dados virtuais onde é possível obter estruturas 2D, 3D, cristalografias de raio-X, espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras ferramentas desenvolvidas para auxiliar no desenvolvimento de fármacos e dezenas de outras funcionalidades da quimioinformática e biotecnologia (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

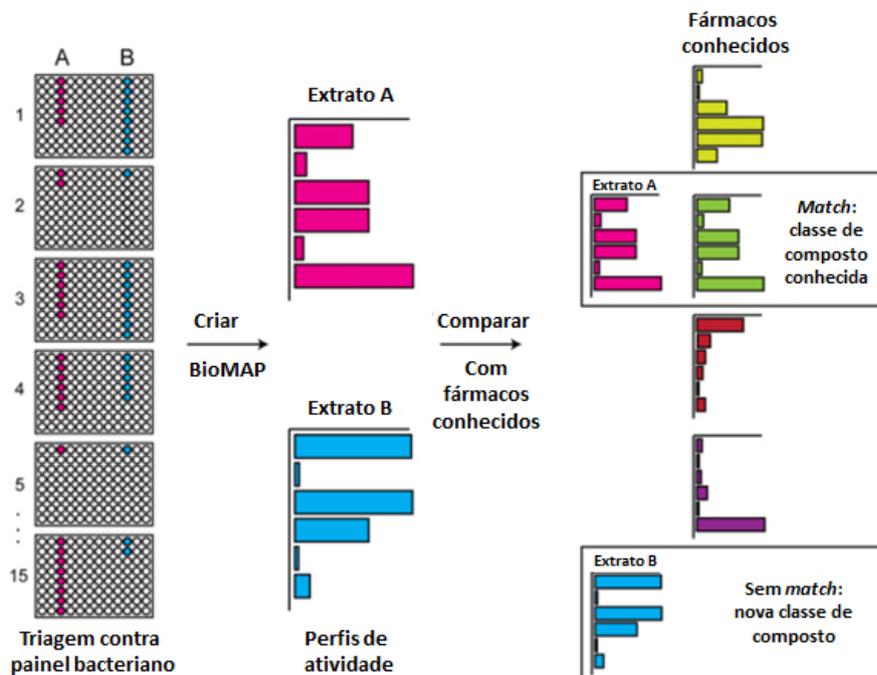
#### 2.4.3 BioMap Screening

No intuito de otimizar a busca por novos antibacterianos, Wong, Oliver e Linington desenvolveram em 2012, uma metodologia que visa estabelecer um perfil de atividade antibacteriana, esta utiliza um painel de cepas bacterianas clinicamente relevantes para criar impressões digitais biológicas únicas para todas as principais classes de antibacterianos, chamada de *BioMap Screening*. Desenvolvido na Universidade da Califórnia, em Santa Cruz, esta metodologia baseia-se na hipótese de que os antimicrobianos de mesma classe estrutural

possuem perfis de atividade biológica similar, contra um painel de bactérias patogênicas, sendo que este perfil poderia ser usado para agrupar compostos desconhecidos por classe estrutural. O modelo do teste se baseia na criação de perfis de atividade de cepas bacterianas com diferentes mecanismos de resistência frente a antibacterianos com diferentes mecanismos de ação, empregando a análise da CIM em um intervalo de tempo. Estes valores são normalizados para estimativa de uma razão de atividade independente da concentração e consequente determinação de perfis de atividade de cada fármaco contra cepas com diversos mecanismos de resistência, conforme representado abaixo na Figura 5 (WONG; OLIVER; LININGTON, 2012).

Como a estratégia do BioMap classifica os compostos baseados em seus perfis de atividade ao invés de suas características químicas, ele é capaz de identificar tanto compostos com características idênticas aos padrões usados, bem como compostos estruturalmente relacionados que não estão representados nos fármacos padrões (WONG; OLIVER; LININGTON, 2012).

Figura 5: Esquema representativo do BioMap *Screening*



Fonte: Adaptado de Wong, Oliver e Linington, 2012

## 2.5 COMPOSTOS ISOXAZÓLICOS

Isoxazóis são uma classe de compostos azólicos que contém átomos de oxigênio e nitrogênio lado a lado (posição 1,2) no anel heterocíclico de cinco membros (PUBCHEM, 2018) (Figura 6). Existe na literatura uma ampla gama de estudos que demonstram sua atividade farmacológica em diversas frentes, como: antileptospirose (ILANGO VAN et al., 2017), na inibição da replicação do HIV (LOH et al., 2010), antituberculose (TANGALLAPALLY et al., 2007; NAIDU et al., 2016), antifúngica (SOWMYA et al., 2018), antimicrobiana (LAVANYA et al., 2014; POREBA et al., 2015; BANO et al., 2015), antiparasitária (ROSA et al., 2017) e antiplaquetária (GUTIÉRREZ et al., 2013).

Figura 6: Estrutura do Isoxazol



Fonte: Pubchem, 2018

Entre os estudos disponíveis sobre atividade antimicrobiana, ainda não avaliaram se os isoxazóis possuem atividade contra bactérias multirresistentes ou se o mecanismo de ação é inédito em relação aos fármacos disponíveis no mercado.

## 2.6 EXTRATOS NATURAIS

A investigação de recursos naturais como solo, bactérias e fungos é uma etapa primordial na descoberta de novas entidades químicas (NCE), a partir dos quais novos fármacos podem ser desenvolvidos e licenciados para uso clínico (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Compostos derivados de plantas são de extrema importância para o combate de diversas patologias. Além de sua abundante disposição na natureza, eles apresentam atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica e inúmeras outras. Eles são classificados de acordo com suas estruturas químicas em uma ampla gama de grupos, como alcaloides, terpenóides e polifenóis (KHAMENEH et al., 2019). Uma revisão realizada por Newman e Cragg (2007) compilou os produtos naturais que serviram de fontes para novos medicamentos entre 1981 até 2006, em que se destacaram os antimicrobianos, antivirais, anti-

hipertensivos e anti-inflamatórios que, juntos, representam mais de 50 medicamentos aprovados para uso clínico. Foi também apontado que entre as aprovações de NCEs, os produtos naturais estão envolvidos em aproximadamente 50% de todas as moléculas pequenas entre os anos 2000-2006, sendo destes, 31,4% de uso biológico.

A atividade antimicrobiana dos extratos de plantas se dá através de seus metabólitos secundários que, são isolados frequentemente e apresentam atividade promissora (LI; VEDERAS, 2009). Alguns exemplos mais famosos de metabólitos isolados utilizados no tratamento de diferentes classes terapêuticas são: os alcaloides da vinca, utilizados no tratamento do câncer; digitoxina para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva; e a quinina, um alcaloide utilizado no combate à malária. O processo para isolar estes metabólitos secundários ativos é bastante complexo, uma vez que a quantidade do composto ativo é praticamente residual e exige diversas etapas como extração, separação, purificação com fracionamento, elucidação de estrutura com técnicas hifenadas e ensaios biológicos (SINGH; BARRETT, 2006; BEUTLER, 2009). Entre os antimicrobianos desenvolvidos e utilizados atualmente, a maioria é de origem natural. Entre 2001 a 2005, cinco derivados de produtos naturais foram aprovados pelo FDA; telitromicina, ertapeném, daptomicina, doripeném e tigeciclina. As plantas, de modo geral, apresentam uma grande reserva de compostos que não só apresentam atividade contra os microrganismos, como também estruturas químicas complexas, podendo ser menos susceptíveis aos mecanismos de resistência microbiana (KHAMENEH et al., 2019).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CEPAS UTILIZADAS

Para este estudo, foram utilizadas cepas provenientes de banco de células referência e isolados clínicos bacterianos já caracterizados que apresentaram diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos. As cepas clínicas foram isoladas no laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina situado na cidade de Florianópolis/SC, e outras foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cristina Gales do Laboratório Alerta, especializado em projetos de pesquisa de investigação de mecanismos moleculares de resistência bacteriana a antimicrobianos da UNIFESP/SP. Essas cepas (Quadro 1) estão armazenadas a -20°C no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada da UFSC, em caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart infusion Broth* - BHI) com 20% de glicerol.

As espécies estudadas incluem os bacilos Gram-negativos: *Klebsiella pneumoniae* KPC positiva, *K. pneumoniae* CTX-M-1 positiva, *K. pneumoniae* OXA-48, *K. pneumoniae* NDM-1, *Acinetobacter baumannii* OXA-23, *Escherichia coli* ATCC® 25922, CTX-M1 e MCR-1, *Pseudomonas aeruginosa* IMP-1 e *P. aeruginosa* SPM-1; e os cocos Gram-positivos: *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina VRE, *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 *S. aureus* MRSA, *S. aureus* Mu50 (VISA ATCC® 700699), *S. aureus* Mu3 (hVISA ATCC® 700698). A escolha dessas cepas foi feita por carregarem os principais genes de resistência encontrados no cenário clínico epidemiológico do país, requerendo maior atenção no manejo da terapia antimicrobiana, e também por serem patógenos prioritários segundo a OMS para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (WHO, 2017).

Quadro 1: Cepas bacterianas utilizados no estudo.

IDENTIFICAÇÃO	PERFIL DE RESISTÊNCIA	MICROORGANISMO	ORIGEM
ATCC® 25922	----	<i>Escherichia coli</i>	ATCC®
MCR-1	Ampicilina Ampicilina + sulbactam Polimixina	<i>Escherichia coli</i>	HU/UFSC-SC
CTX-M15	Cefalosporinas <sup>i</sup> Monobactâmicos	<i>Escherichia coli</i>	Alerta/UNIFESP-SP
KPC	Cefalosporinas <sup>i</sup> Carbapenêmicos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HU/UFSC-SC
OXA-48	Cefalosporinas <sup>i</sup> Carbapenêmicos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alerta/UNIFESP-SP

IDENTIFICAÇÃO	PERFIL DE RESISTÊNCIA	MICROORGANISMO	ORIGEM
NDM-1	Cefalosporinas <sup>i</sup> Cefamicinas Carbapenêmicos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alerta/UNIFESP-SP
OXA-23	Cefalosporinas <sup>i</sup> Carbapenêmicos	<i>Acinetobacter baumannii</i>	HU/UFSC-SC
IMP-1	Cefalosporinas <sup>i</sup> Cefamicinas Carbapenêmicos*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alerta/UNIFESP-SP
SPM-1	Cefalosporinas <sup>i</sup> Cefamicinas Carbapenêmicos*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alerta/UNIFESP-SP
VRE	vancomicina	<i>Enterococcus faecalis</i>	HU/UFSC-SC
ATCC® 700699	metilina / oxacilina Resistência intermediária à vancomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50; VISA)	ATCC®
ATCC® 700698	metilina / oxacilina Sensibilidade heterogênea à vancomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (Mu3; hVISA)	ATCC®
MRSA	metilina / oxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i>	HU/UFSC-SC
ATCC® 29213	----	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC®

i: Cefalosporinas de amplo espectro. \*Exceto monobactâmicos. Fonte: Elaborado pela autora

### 3.2 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS/EXTRATOS

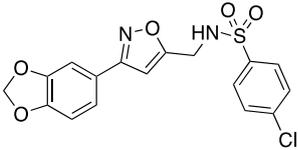
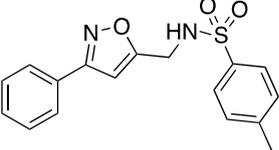
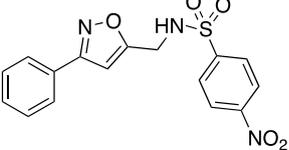
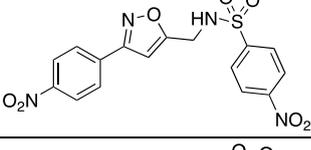
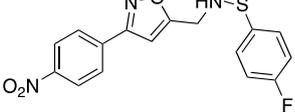
Os compostos e extratos utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos por dois laboratórios de pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, o Laboratório de Química Farmacêutica e o Laboratório de Farmacognosia. Os demais compostos foram obtidos via Pathogen Box® através de solicitação virtual no site: <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/request-pathogen-box>.

#### 3.2.1 Compostos Isoxazólicos

Os compostos cedidos pelo laboratório de Química Farmacêutica são derivados isoxazólicos de sulfonamidas, inéditos, sintetizados sob supervisão da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lílian Sibelle Campos Bernardes (ROSA et. al., 2017). O laboratório trabalha na construção de uma biblioteca dessa classe de compostos, com base na atividade antibacteriana ou antifúngica que estes derivados podem vir a apresentar. Para este estudo, foram cedidos 16 compostos representados no Quadro 2.

Quadro 2: Compostos isoxazólicos investigados

ID	ESTRUTURA QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR
S1		$C_{18}H_{19}N_2O_4S$
S2		$C_{17}H_{15}ClN_2O_4SNa$
S3		$C_{17}H_{15}FN_2O_4SNa$
S4		$C_{17}H_{16}N_3O_6S$
S5		$C_{18}H_{18}N_3O_7S$
S6		$C_{19}H_{20}N_2O_5SNa$
S7		$C_{18}H_{18}ClN_2O_5S$
S8		$C_{18}H_{17}FN_2O_5SNa$
S9		$C_{18}H_{17}N_2O_5S$
S10		$C_{17}H_{14}N_3O_7S$
S11		$C_{17}H_{13}FN_2O_5SNa$

ID	ESTRUTURA QUÍMICA	FÓRMULA MOLECULAR
S12		$C_{17}H_{13}ClN_2O_5SNa$
S13		$C_{17}H_{16}N_2O_3SNa$
S14		$C_{16}H_{14}N_3O_5S$
S15		$C_{16}H_{13}N_4O_7S$
S16		$C_{16}H_{12}FN_3O_5SNa$

Fonte: Elaborado pela autora, estruturas cedidas juntamente com os compostos.

### 3.2.2 Extratos naturais

Os extratos naturais e frações fornecidos pelo laboratório de Farmacognosia sob supervisão do Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, foram obtidos de 11 diferentes espécies por extração em diferentes solventes, sendo eles: água, metanol (MeOH), butanol (BuOH), etanol (EtOH) e acetato de etila, totalizando 25 extratos avaliados (Quadro 3).

Quadro 3: Extratos naturais investigados

AMOSTRA	NOME POPULAR	ESPÉCIE (MARCA COMERCIAL)	EXTRATO/FRAÇÃO	DILUENTE	[ ]TESTE
1	Embaúba	<i>Cecropia pachystachya</i>	Extrato aquoso	Água	20 mg/mL
2	Embaúba	<i>Cecropia pachystachya</i>	Fração MeOH	DMSO	200 µg/mL
3	Embaúba	<i>Cecropia pachystachya</i>	Fração BuOH	DMSO	200 µg/mL
4	Embaúba	<i>Cecropia pachystachya</i>	Fração aquosa	Água	20 mg/mL
5	Amora	<i>Morus celtidifolia</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL
6	Pitanga vermelha	<i>Eugenia uniflora</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL
7	Pitanga roxa	<i>Eugenia uniflora</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL
8	Framboesa	<i>Rubus idaeus</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL
9	Morango	<i>Fragaria spp</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL

AMOSTRA	NOME POPULAR	ESPÉCIE (MARCA COMERCIAL)	EXTRATO/FRAÇÃO	DILUENTE	[ ]TESTE
10	Araçá amarelo	<i>Psidium cattleianum</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL
11	Araçá vermelho	<i>Psidium cattleianum Sabine</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL
12	Mirtilo	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Extrato MeOH	DMSO	200 µg/mL
13	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Schneider)	Extrato aquoso (ut)	Água	20 mg/mL
14	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Schneider)	Extrato aquoso(i)	Água	20 mg/mL
15	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Schneider)	Extrato EtOH(i)	Água	20 mg/mL
16	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Schneider)	Extrato EtOH(ut)	Água	20 mg/mL
17	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Madrugada)	Extrato aquoso(ut)	Água	20 mg/mL
18	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Madrugada)	Extrato aquoso(i)	Água	20 mg/mL
19	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Madrugada)	Extrato EtOH(i)	Água	20 mg/mL
20	Erva-mate*	<i>Ilex paraguariensis</i> (Madrugada)	Extrato EtOH(ut)	Água	20 mg/mL
21	Esponja marinha	<i>Petromica citrina</i>	Fração MeOH	DMSO	200 µg/mL
22	Esponja marinha	<i>Petromica citrina</i>	Extrato EtOH	Água	20 mg/mL
23	Esponja marinha	<i>Petromica citrina</i>	Extrato aquoso	Água	20 mg/mL
24	Esponja marinha	<i>Petromica citrina</i>	Fração BuOH	DMSO	200 µg/mL
25	Esponja marinha	<i>Petromica citrina</i>	Fração acetato	DMSO	200 µg/mL

Legenda: (ut) = ultra-turrax, (i) = infusão, (\*) = Erva-mate obtida de marcas comerciais. Fonte: Elaborado pela autora

### 3.2.3 Compostos do Pathogen Box®

Os 400 compostos são acondicionados em 5 microplacas de 96 poços, sendo 80 compostos em cada uma delas distribuídos conforme demonstrado no Apêndice B. Cada um dos poços destacados contém 10 µL de composto dissolvido em solução de dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mM. A relação completa de todos os compostos, suas informações químicas e dados experimentais podem ser encontradas no anexo 1.

### 3.3 PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS

Cada uma das cepas selecionadas foi cultivada individualmente em placas de ágar Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich Lote: BCBS3107V) com auxílio de alça bacteriológica estéril e incubadas em estufa bacteriológica a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para obtenção de colônias puras e isoladas. A partir destas, foram preparadas em solução de salina estéril 0,9%, suspensões bacterianas na escala 0,5 de McFarland, que corresponde a aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC.mL<sup>-1</sup>), obtida com o auxílio do equipamento DensiCHEK™ Plus (bioMérieux). Para avaliar a potencial atividade inibitória do crescimento

bacteriano e a CIM pelo método de microdiluição em caldo (MIC), aplicou-se as orientações do CLSI (CLSI, 2018). A suspensão foi então diluída 1:10 ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e o volume de 10 uL de inóculo bacteriano foi utilizado nos ensaios realizados.

### 3.4 SELEÇÃO E PREPARO DOS ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos utilizados (Quadro 4) para realização dos ensaios de triagem, CIM, controles de qualidade de inibição e obtenção de perfis de atividade, foram selecionados na tentativa de abranger as principais classes de fármacos disponíveis e utilizados atualmente na clínica contra microrganismos multirresistentes.

Quadro 4: Antimicrobianos utilizados neste estudo

ANTIMICROBIANO	LOTE	MARCA	CLASSE
Ampicilina	LRAA9179	Sigma-Aldrich	β-lactâmicos
Cefoxitina	048M4898V	Sigma-Aldrich	β-lactâmicos
Ceftriaxona	LRAA9170	Sigma-Aldrich	β-lactâmicos
Cefepima	LRAA9570	Sigma-Aldrich	β-lactâmicos
Azitromicina	LRAB3758	Sigma-Aldrich	Macrolídeos
Eritromicina	LRAA8967	Sigma-Aldrich	Macrolídeos
Gentamicina	SLBG7734V	Sigma-Aldrich	Aminoglicosídeo
Tetraciclina	LRAC0159	Sigma-Aldrich	Tetraciclinas
Ciprofloxacino	LRAA6508	Sigma-Aldrich	Quinolonas
Sulfametoxazol	LRAC0232	Sigma-Aldrich	Sulfas
Nitrofurantoína	BCBT0937V	Sigma-Aldrich	Nitrofuranos
Rifampicina	SZBE070XV	Sigma-Aldrich	Rifamicinas
Vancomicina	1935302	Teuto	Glicopeptídeos
Polimixina B	066M4012V	Sigma-Aldrich	Lipopeptídeos
Imipeném	LRAB7177	Sigma-Aldrich	Carbapenêmicos
Meropeném	BCBS4983V	Sigma-Aldrich	Carbapenêmicos

Fonte: Elaborado pela autora

Os fármacos foram solubilizados e diluídos conforme orientações do CLSI (2018). Para cada antimicrobiano preparou-se uma solução estoque 10x mais concentrada que a maior concentração a ser utilizada em cada teste.

Para o controle positivo de inibição de crescimento (C. Atb) utilizou-se antimicrobianos com atividade conhecida sobre os diferentes isolados e padronizou-se o uso de uma concentração três vezes acima do valor de corte indicativo de resistência preconizado pelo CLSI (2018), conforme demonstrado no Quadro 5.



### 3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA - TRIAGEM

Foi realizada uma triagem inicial da potencial atividade antibacteriana de cada um dos extratos/compostos, na maior concentração comum possível de se estabelecer entre todos. Para fins didáticos, devido às diferentes características de propriedades, solventes e momento de recebimento para análise, os desenhos experimentais, assim como apresentação de metodologias e resultados dos compostos de diferentes locais de obtenção, serão apresentados separadamente.

#### 3.6.1 Triagem da atividade antibacteriana dos isoxazóis

Os 16 compostos isoxazólicos foram fornecidos na apresentação de pó, individualmente acondicionados em microtubos com quantidade de massa em torno de 2 mg previamente pesada, para serem solubilizados em DMSO. Por serem inéditos, ainda não existem valores padronizados para ensaios de resistência e sensibilidade destas substâncias. Segundo o CLSI (2018), para ensaios antimicrobianos, os compostos dissolvidos em DMSO precisam ser diluídos 1:100 diretamente no meio de cultura para que a concentração final de DMSO do ensaio não ultrapasse 1% pois o próprio DMSO pode apresentar potencial atividade inibitória em concentrações maiores. Deste modo, a maior concentração final comum entre os compostos possível de ser obtida para realização dos testes com DMSO 1%, foi de 100  $\mu\text{M}$ . Cada um dos compostos foi, então, diluído diretamente em Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHBC) até a concentração de 100  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano contendo  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi adicionado.

As triagens foram realizadas conforme representado no apêndice A em microplacas de poliestireno fundo redondo com 96 poços. Para o controle de qualidade do método, cada uma delas obrigatoriamente contém:

- Controle positivo de crescimento bacteriano (C+ cresc): Para certificar que o isolado bacteriano é viável e garantir que o próprio DMSO utilizado para solubilizar o composto não interfere no crescimento, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura MHBC com 1% de DMSO + 10  $\mu\text{L}$  inóculo.
- Controle de inibição do crescimento bacteriano (C. atb): Para atestar a eficácia dos antimicrobianos e existência da sensibilidade da bactéria, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura MHBC já com antimicrobiano diluído na concentração pré-determinada (Quadro 5) + 10  $\mu\text{L}$  inóculo.

- Controle de esterilidade do meio de cultura (C. meio): utilizado para verificar a esterilidade do meio e certificar que nenhum microrganismo esteja presente como possível contaminante ou interferente do ensaio. Para este controle, utiliza-se apenas 100 µL do meio de cultura MHBC.

Após preparo das microplacas, estas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura visual de crescimento bacteriano, verificada pela presença de turvação nos poços, e em seguida foi realizada a leitura pontual de absorvância a 600 nm no leitor de placas *Infinite® 200 PRO Series Multimode Reader* (Tecan), seguido da adição de 30 µL de resazurina 0,01%.

### **3.6.2 Triagem da atividade antibacteriana dos extratos naturais**

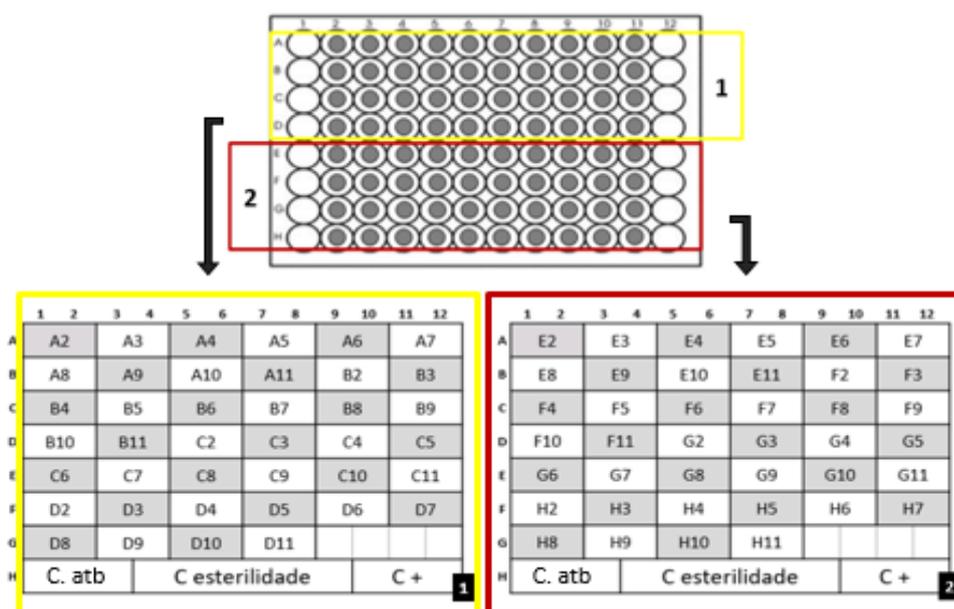
Os 25 extratos foram fornecidos ou na forma de pó acondicionados em microtubos ou extratos acondicionados em frasco de vidro âmbar com diferentes quantidades de massa previamente pesada. Aqueles que possuíam extrato etanólico ou aquoso foram dissolvidos/diluídos com água estéril e foi estabelecida como concentração de teste 20mg/mL. Já os demais extratos, foram solubilizados em DMSO, no dia do ensaio, até obtenção de uma solução estoque de 20 mg/mL 100% DMSO, que para realização da triagem, foi diluída 100x com o meio de cultura para atingir a concentração de uso 0,2 mg/mL em 1% DMSO. As concentrações de teste e solventes utilizados para cada extrato estão representadas no Quadro 3.

O procedimento experimental e os controles utilizados para realizar a triagem dos extratos naturais foi igual à triagem para isoxazois descrita no tópico 3.6.1.

### 3.6.3 Triagem dos compostos Pathogen Box®

Os 400 compostos do Pathogen Box® foram recebidos acondicionados em 5 placas de 96 poços identificadas de A até E, cada uma delas contendo 80 compostos, sendo que, cada composto vem dissolvido em DMSO a 10 mM, distribuídos em poços individuais (10 µL/composto). O desenho experimental desta triagem foi idealizado de maneira a preservar a mesma estrutura e organização visual entre todas as placas. Para isso, a placa do Pathogen Box® foi dividida em 2 microplacas com 40 compostos triados em cada uma delas. A microplaca de triagem 1 compreende os compostos localizados nas linhas A-D (compostos A2 até D11); e a microplaca de triagem 2 que compreende os compostos localizados nas linhas E-H (compostos E2 até H11), a triagem foi feita com duplicata biológica, totalizando 10 microplacas (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1, E2) para cada isolado bacteriano (Figura 8).

Figura 8: Esquema representativo da triagem com os compostos do Pathogen Box®



Os 400 compostos do Pathogen Box foram triados para as cepas *S. aureus* 29213 e *E. coli* 25922 B: cada placa do Pbox foi dividida em duas para realizar a triagem em duplicata, cada uma com 40 compostos. Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme descrito anteriormente, o volume total de cada um dos compostos fornecidos é de 10 µL, dissolvido em solução pura de DMSO na concentração de 10 mM. Devido ao limite máximo permitido deste solvente em ensaios microbiológicos ser de 1%, a concentração máxima possível de aplicar nesta triagem foi de 100 µM para todos os

compostos. E em razão do pequeno volume final disponível, foi necessário reduzir o painel bacteriano para apenas 4 cepas. Os critérios de seleção empregados para a seleção, além da relevância para a clínica, foram: i) ter uma espécie Gram-negativa e uma Gram-positiva; ii) ter a possibilidade de avaliar e estabelecer uma comparação entre as concentrações inibitórias mínimas entre cepas sensíveis e resistentes de uma mesma espécie. Foram selecionadas então duas cepas de *Escherichia coli*: *E. coli* ATCC® 25922 (sensível) e *E. coli* MCR-1 (resistente) representantes dos bacilos Gram-negativos; e duas cepas de *Staphylococcus aureus*: *S. aureus* ATCC® 29213 e *S. aureus* MRSA representante dos cocos Gram-positivos (Quadro 1).

### 3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Para os compostos que apresentaram atividade inibitória na triagem (100  $\mu\text{M}$ ), foi realizada a microdiluição em caldo em triplicata biológica para obtenção da CIM. Em cada microplaca de triagem foi possível avaliar 4 compostos em 7 diluições seriadas (50  $\mu\text{M}$  a 0,78  $\mu\text{M}$ ) em triplicatas, para um único isolado bacteriano (Figura 9).

Figura 9: Representação esquemática de uma microplaca utilizada no ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM

		Composto 1			Composto 2			Composto 3			Composto 4		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50 $\mu\text{M}$	A												
25 $\mu\text{M}$	B												
12,5 $\mu\text{M}$	C												
6,25 $\mu\text{M}$	D												
3,125 $\mu\text{M}$	E												
1,56 $\mu\text{M}$	F												
0,78 $\mu\text{M}$	G												
	H	C. Atb			Controle esterilidade			C. cresc.					

A: Os compostos foram distribuídos em triplicatas, na fileira A e diluídos em série até a fileira G. Na fileira H temos os controles: H1-3 = controle de inibição do crescimento pelo antimicrobiano; H 4-9 = controle de esterilidade do meio de cultura; H10-12 = controle de crescimento bacteriano. Fonte: Elaborado pela autora.

A microdiluição em caldo foi realizada conforme recomendação preconizada pelo CLSI (CLSI, 2018), com preparo de meio de cultura MHBC 2x concentrado para permitir a realização da diluição seriada da fileira A, que é a de maior concentração, para as subsequentes (B até G). O controle de qualidade dos testes está na fileira H e foi realizado como descrito nas etapas de triagem anteriores, com controle de crescimento bacteriano (C.

cresc.), controle de esterilidade do meio (controle esterilidade) e controle de inibição por antimicrobiano (C. Atb.).

Após adição do inóculo bacteriano, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas, no final deste período realizou-se a leitura visual de crescimento bacteriano verificada pela presença de turvação nos poços, seguida de leitura das absorvâncias a 630 nm no leitor de placas *LX-96 (LanX)*, e por fim, adição de 30  $\mu\text{L}$  de resazurina 0,01% nos poços para revelação.

### 3.8 PESQUISA DOS COMPOSTOS EM BANCOS DE DADOS

Para os compostos que apresentaram atividade antibacteriana expressiva, foi realizada busca nos sítios eletrônicos e bancos de dados: PubMed, Google Scholar, ChemSpider, PubChem e ChEMBL, de artigos que relatam possível atividade terapêutica e mecanismos de ação empregando como chave de busca o código de identificação determinado pela MMV (ex: MMV687700) de cada compostos, assim como, o nome IUPAC, sinônimos e CID de banco de dados químicos encontrados para cada um deles (ex: MMV021057, methyl (Z)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl]oxyphenyl]-3-methoxyprop-2-enoate, azoxystrobin, CID PubChem = 6537969) no período de Maio/2019 a Agosto/2019. A partir disto, investigou-se a presença de proteínas homólogas entre o organismo relatado e o de interesse com pesquisa nos bancos de dados: Uniprot, Protein Data Bank (PDB) e Blastp NCBI para obtenção da sequência fasta destas proteínas do organismo de origem que, subsequentemente, foram alinhadas no Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) contra a espécie bacteriana de interesse. Através dos *hits* gerados foi possível verificar percentual de identidade entre elas e a função exercida nos respectivos organismos.

### 3.9 BIOMAP SCREENING

Os compostos que apresentaram atividade antimicrobiana na etapa de triagem foram submetidos ao *BioMap Screening* empregando os valores obtidos das leituras no ensaio de CIM.

A normalização dos dados e a criação dos perfis de *BioMap* foram realizados conforme descritos por Wong, Oliver e Linington (2012):

- Os isolados bacterianos para as quais os compostos-teste deram inativos, foram removidos do cálculo;

- Os valores de CIM remanescentes foram divididos pelo maior valor da série para criar uma razão de atividade concentração-independente;

- A recíproca de cada valor foi então multiplicada por 10 e convertida em escala logarítmica;

- Os valores resultantes foram novamente divididos pelo maior valor da série para normalizar o maior valor para 1, e 0 será introduzido como o valor de todas as bactérias para as quais os compostos foram inativos;

- Os histogramas de cada isolado foram plotados versus o valor de *BioMap*;

A clusterização hierárquica foi realizada com o software *Chemmine tools*, para aplicar a correlação de similaridade e visualização dos resultados com árvore filogenética para avaliar as similaridades entre os compostos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

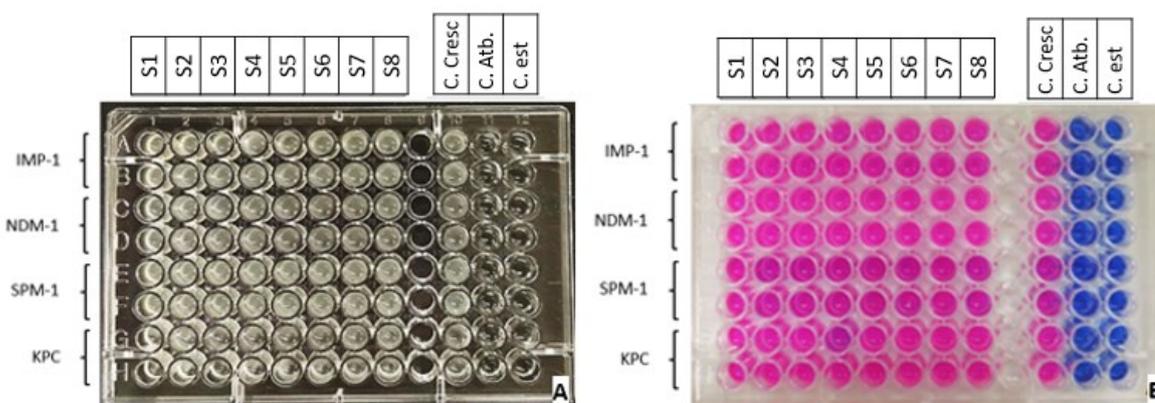
### 4.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA - TRIAGEM

#### 4.1.1 Triagem de compostos isoxazólicos

Para cada experimento, terminado o período de incubação, foi realizada a leitura visual das microplacas para verificar se ocorreu crescimento bacteriano (presença de turvação) e inibição do crescimento nos controles de inibição pelo antimicrobiano e no controle de esterilidade do meio (ausência de turvação). Houve crescimento bacteriano em todos os poços de compostos e nos controles não houve turvação, ou seja, os controles empregados funcionaram adequadamente (Figura 10).

Após realizar a leitura pontual das absorvâncias, adicionou-se resazurina em todos os poços da microplaca que continham meio de cultura para revelação depois de quatro horas de incubação. Nenhum dos isoxazois testados apresentou atividade inibitória de crescimento bacteriano nas concentrações testadas. No apêndice A, é possível visualizar o perfil visual obtido em todas as microplacas; assim como na leitura visual de turvação, o crescimento de todos os isolados é nitidamente visível na presença de cada um dos compostos testados. Este crescimento é evidenciado pela coloração rosa-fluorescente nos poços correspondentes, o que condiz com o controle positivo de crescimento. A coloração azul indica a ausência de crescimento dos isolados nos controles de inibição e de esterilidade do meio, o que demonstra que não ocorreu nenhuma contaminação cruzada durante a execução da técnica.

Figura 10: Representação da leitura visual de crescimento bacteriano e revelação com a resazurina da triagem de isoxazois



Microplaca 1B, compostos S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8. 13. 8A: Representação da leitura visual de crescimento bacteriano pela presença de turvação do meio de cultura entre as colunas 1-8 (uma para cada composto testado) e as fileiras A-H (as 4 cepas em duplicata) com um aspecto igual à coluna 10, o controle

positivo de crescimento. Nas colunas 11 (controle de inibição com antibiótico) e 12 (controle de esterilidade do meio) não houve turvação. 8B: Todas as cepas conseguiram se multiplicar na presença dos compostos revelados na cor rosa (compostos 1-8; controle positivo de crescimento, coluna 10), os controles de esterilidade do meio e controle de inibição pelo antimicrobiano estão representados em azul (colunas 11 e 12). Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.1.1 Análise dos resultados da absorbância

Foi calculado para os compostos isoxazólicos a média das absorbâncias obtidas e os respectivos percentuais de inibição de crescimento (Quadro 6).

Quadro 6: Percentual de inibição dos compostos isoxazólicos na concentração de 100  $\mu$ M contra as cepas bacterianas testadas

	OXA-23	OXA-48	CTX-M1	MCR-1	IMP-1	NDM-1	SPM-1	KPC	29213	MRSA	Mu50
<b>C -</b>	0,048	0,047	0,049	0,048	0,049	0,047	0,047	0,047	0,048	0,048	0,048
<b>C +</b>	0,570	0,591	0,434	0,467	0,678	0,506	0,463	0,596	0,289	0,327	0,294
<b>C atb.</b>	0,047	0,047	0,058	0,048	0,048	0,047	0,049	0,048	0,047	0,047	0,049
<b>% inib.</b>	92%	92%	87%	90%	93%	91%	89%	92%	84%	86%	83%
<b>S1</b>	-3%	5%	6%	13%	11%	3%	4%	24%	-29%	-9%	-26%
<b>S2</b>	-5%	6%	-4%	17%	16%	14%	4%	31%	-16%	-11%	-39%
<b>S3</b>	1%	12%	4%	13%	10%	13%	4%	21%	-14%	-34%	-52%
<b>S4</b>	4%	10%	10%	11%	10%	8%	5%	17%	-23%	-14%	-31%
<b>S5</b>	20%	10%	0%	16%	9%	-2%	-7%	15%	-34%	-29%	-16%
<b>S6</b>	-6%	-4%	1%	-6%	11%	-3%	1%	32%	-48%	-32%	-34%
<b>S7</b>	0%	2%	4%	-3%	15%	-3%	6%	26%	-19%	-29%	-25%
<b>S8</b>	2%	6%	19%	9%	17%	12%	6%	22%	4%	-2%	-3%
<b>S9</b>	-3%	-3%	12%	5%	1%	-1%	-13%	7%	-26%	-7%	-47%
<b>S10</b>	0%	6%	9%	12%	2%	4%	-15%	-11%	-53%	-27%	-37%
<b>S11</b>	-2%	1%	28%	-2%	10%	12%	-6%	1%	-38%	-13%	-26%
<b>S12</b>	-1%	1%	13%	3%	9%	5%	0%	7%	-43%	-18%	-38%
<b>S13</b>	2%	3%	0%	7%	6%	-4%	1%	13%	-15%	-25%	-41%
<b>S14</b>	-2%	0%	-6%	-4%	8%	-8%	-2%	2%	-19%	-29%	-15%
<b>S15</b>	-3%	0%	7%	-5%	4%	-1%	3%	0%	-32%	-27%	-14%
<b>S16</b>	-2%	2%	-21%	-2%	12%	5%	5%	10%	-45%	-42%	-35%

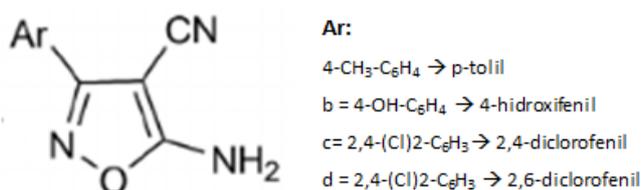
No quadro estão representados os percentuais de inibição de cada um dos isoxazóis contra as cepas bacterianas. Os valores em negativo (-) apresentaram uma atividade antagonista na inibição do crescimento. Na primeira coluna estão os compostos: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16. Na primeira linha estão representadas as cepas avaliadas: *Acinetobacter baumannii* OXA-23, *K. pneumoniae* OXA-48, *K. pneumoniae* CTX-M1 positiva, *E. coli* MCR-1, *P. aeruginosa* IMP-1, *K. pneumoniae* NDM-1, e *P. aeruginosa* SPM-1, *K. pneumoniae* KPC positiva, *S. aureus* 29213, *S. aureus* MRSA, *S. aureus* VISA.

C-: valor de absorbância dos controles negativos de crescimento de cada placa; C+: valor de absorbância dos controles positivo de crescimento para cada uma das cepas; C atb.: valor de absorbância dos controles positivos de inibição com antimicrobianos para cada cepa; % inib.: percentual de inibição de crescimento dos antimicrobianos (controle positivo de inibição) para cada cepa. Fonte: Elaborado pela autora

Ao final da triagem nenhum dos isoxazóis apresentou atividade inibitória significativa (IC50%) nas concentrações utilizadas (100  $\mu$ M). Em pesquisa na literatura foram encontrados isoxazóis com atividade antibacteriana; Poreba e colaboradores (2015) sintetizaram uma série

de compostos isoxazólicos sulfonamida e obtiveram compostos com atividade contra *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações entre 250 µg – 500 µg por disco difusão. Já Beyzaei et al. (2018) desenvolveram um método eficiente e ecológico para sintetizar derivados 5-amino-isoxazole-4-carbonitrilas com potente atividade antibacteriana, e avaliaram por microdiluição em caldo a CIM deles contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Dos compostos avaliados, quatro apresentaram atividade de amplo espectro com CIM variando entre 32 – 1024µg/mL, tendo como substituintes na posição 3 do anel isoxazol (figura 4), p-tolil, 4-hidroxifenil, 2,4-diclorofenil e 2,6-diclorofenil (figura 11).

Figura 11: Estruturas dos derivados 5-amino-isoxazole-4-carbonitrilas com atividade antibacteriana



Fonte: Adaptado de Beyzaei e colaboradores, 2018

#### 4.1.2 Triagem de extratos naturais

Para cada experimento, terminado o período de incubação, foi realizada a leitura visual das microplacas para verificar se alguma atividade inibitória ocorreu evidenciado pela turvação do meio de cultura. Alguns extratos apresentaram uma coloração bastante escura, impossibilitando a leitura do resultado, tanto pela presença ou ausência de turvação, como pela cor da reação no ensaio da resazurina. Entre os 25 extratos naturais investigados, 15 apresentaram crescimento bacteriano na concentração testada, demonstrando ausência de atividade inibitória pelos extratos. Os 10 restantes, apresentaram a formação de coloração escura que acarretou interferência na leitura dos testes, são eles: 1, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20. Os extratos 1 e 4, são extrato e fração aquosa, respectivamente de *Cecropia pachystachya*, popularmente conhecida como embaúba, já os extratos 13 a 20, são de *Ilex paraguariensis*, a erva-mate.

Todos os extratos escuros estavam em meio aquoso na concentração de 20 mg/mL, na tentativa de reverter o interferente colorimétrico, foi realizado então mais um ensaio com duas novas diluições para cada um deles, sendo a primeira de 2 mg/mL (a), e a segunda de 200 µg/mL (b). Cada uma das diluições foi avaliada em triplicata biológica e para controle da

produção de cor e interferência na leitura, adicionou-se na placa também o extrato nas respectivas diluições puro, sem adição de inóculo bacteriano. Após leitura de todas as placas, podemos constatar que nenhum dos 25 extratos naturais apresentou atividade inibitória bacteriana, sendo todos os resultados negativos, tanto para leitura de crescimento visual por turvação, como no ensaio de revelação com resazurina. Além destes, foi realizado também para cada uma das microplacas, com auxílio de um repicador, o repique dos 96 poços em uma placa de 150 mm de ágar Mueller-Hinton, para verificar se realmente a turvação se deu por crescimento bacteriano ou por possível precipitação dos extratos. Após incubação *overnight* em estufa bacteriológica, todas as placas reproduziram o mesmo perfil, confirmando os resultados obtidos nos ensaios anteriores. Todas as etapas desta triagem estão representadas no Apêndice C.

Para os extratos naturais obtidos por diferentes extrações e solventes não observamos nenhum que tenha apresentado potencial atividade inibitória de crescimento bacteriano nas concentrações avaliadas. Em pesquisa na literatura da atividade dos extratos, Costa e Hoscheid (2018) investigaram atividade antibacteriana de extrato etanólico de embaúba 100 mg por disco difusão e obtiveram uma baixa atividade inibitória para *S. aureus*. Um outro estudo avaliou a atividade antibacteriana de extrato etanólico e frações metanólicas das folhas e caule de embaúba na concentração de 1024 µg/mL, assim como um possível sinergismo com aminoglicosídeos contra linhagens bacterianas sensíveis e multirresistentes. Encontraram atividade mais expressiva na associação com a neomicina que previamente avaliada sozinha, apresentou CIM = 312,5 µg/mL e, ao ser associada ao extrato etanólico e a fração metanólica das folhas sofreu uma redução para 39,06 µg/mL; já em associação com a fração metanólica e extrato etanólico obtidos do caule reduziu para 78,13 µg/mL (SOUZA et al., 2014).

Biasi, Grazziotin e Hofmann Junior (2009) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos, folhas e ramos de erva-mate por disco difusão nas concentrações de 50 e 100 mg/mL contra *Candida albicans*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Os autores encontraram inibição entre 10 e 21 mm para todas as bactérias, exceto *E. coli*. Estes resultados são concordantes com Martin e colaboradores (2013) em que os extratos metanólico e etanólico da erva-mate inibiram todos os microrganismos avaliados, exceto *E. coli*. O extrato etanólico produziu as maiores zonas de inibição e a menor CIM em *S. aureus* e *S. enteritidis*. Por estes estudos, é possível ver que a atividade antibacteriana é baixa para as cepas deste trabalho e as concentrações de extrato utilizadas nos testes são bem mais elevadas. Além disso, as variáveis técnicas e a taxa de recuperação da fração de interesse da planta apresenta muita variação no rendimento.

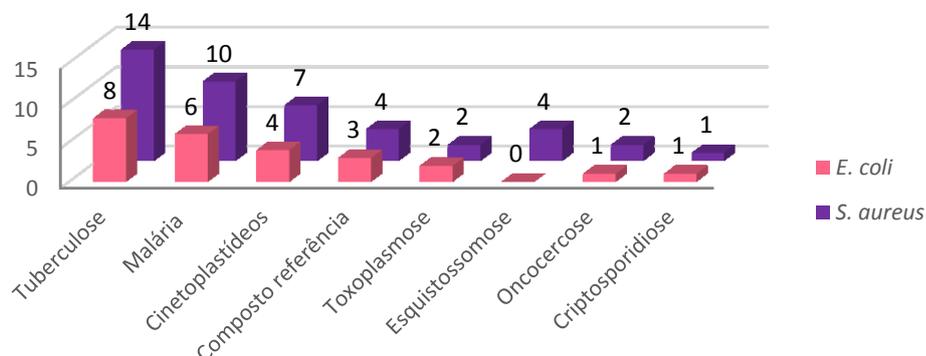
### 4.1.3 Triagem dos compostos Pathogen Box®

Conforme abordado na metodologia, devido ao escasso volume de amostra disponível de cada composto, o painel de isolados bacterianos precisou ser reduzido. Para aumentar a probabilidade de encontrar mais compostos com possível atividade para os diferentes mecanismos e sítios de ação de cada uma das espécies, o fluxograma de triagem (Apêndice B) dos 400 compostos em uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  se deu primeiramente com os dois isolados sensíveis, *E. coli* 25922 e *S. aureus* 29213, para que houvesse volume suficiente para realizar ensaio de CIM nos isolados resistentes das respectivas espécies.

A investigação dos compostos fornecidos no Pathogen Box® resultou em um total de 69 compostos com CIM  $\leq$  100  $\mu\text{M}$  in vitro. Para *E. coli* 25922, 25 compostos apresentaram atividade inibitória de crescimento, destes, 3 são compostos referência: levofloxacino (Placa E, composto A5), auronafina (Placa E, composto H5) e dietilcarbamazina (Placa E, composto A3). Já na triagem para *S. aureus* 29213, 44 compostos apresentaram atividade inibitória de crescimento bacteriano, incluindo 4 compostos referência: benznidazol (Placa B, composto E5), linezolidina (Placa B, composto H4), levofloxacino (Placa E, composto A5) e rifampicina (Placa E, composto A6). Estes resultados estão descritos também no Quadro 7.

A patologia de classificação mais prevalente dos compostos ativos foi tuberculose com 22 compostos (32%), seguida por malária com 16 (24%) e cinetoplastídeos com 11 (16%) (Figura 12).

Figura 12: Distribuição dos compostos que apresentaram atividade antibacteriana agrupados pela classificação determinada no Pathogen Box®.



Fonte: elaborado pela autora

Quadro 7: Compostos do Pathogen Box® que apresentaram atividade inibitória na triagem com as cepas sensíveis (*E. coli* 25922 e *S. aureus* 29213), organizados pela localização dos compostos nas placas de fornecimento (Anexo 1).

	Posição composto	ID composto	Fórmula Molecular	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 29213
PLACA A	A10	MMV676449	C19H21N2O2Cl	X	
	A6	MMV688796	C19H19N4O2F		X
	B10	MMV102872	C16H9N3O2ClF3		X
	C3	MMV688548	C15H17N5	X	
	C6	MMV688943	C19H17N3O3Cl2		X
	C9	MMV676439	C16H15N2ClS		X
	E6	MMV688756	C16H20N3O3FS		X
	E8	MMV676431	C17H16NO3Cl		X
	E10	MMV676445	C17H19N3O	X	
	F4	MMV676388	C15H14N4O3S		X
	G5	MMV688958	C18H16N2OS		X
	G6	MMV063404	C19H24N3OCl	X	
	H3	MMV688360	C25H31N3O3		X
PLACA B	A11	MMV688761	C20H19N3O6S2		X
	B11	MMV021057	C22H17N3O5		X
	C10	MMV019721	C19H20N3O3ClS2		X
	D2	MMV020537	C16H15N2O2ClS		X
	D4	MMV676536	C18H19N3O2S2		X
	E5	MMV688773	C12H12N4O3		X
	E6	MMV002817	C9H5NOI2	X	
	F7	MMV020321	C18H18N2O2ClF3	X	
	F10	MMV020320	C20H17N5O2	X	
	F11	MMV085210	C22H24N3O3ClS		X
	G8	MMV000858	C16H18N3O3ClS2	X	
	H4	MMV687803	C16H20N3O4F		X
	H6	MMV019742	C21H22N4O3S		X
	H8	MMV006901	C18H18N4O		X
	H9	MMV020391	C19H23N2O3ClS	X	
PLACA C	A2	MMV675997	C24H29N4O2F	X	
	A3	MMV676204	C21H19N2OF		X
	B7	MMV054312	C15H16N2O	X	
	C4	MMV687243	C15H14NO3Br		X
	D2	MMV688410	C21H25N4OCl		X
	D5	MMV687248	C18H13N4OF	X	
	E4	MMV687699	C16H10N3OCl2F3		X
	F5	MMV687138	C19H17NO3S		X
	G3	MMV675993	C16H19N5O2	X	
	G4	MMV021660	C20H21N6Cl	X	
	G11	MMV688703	C21H22N3F	X	
	H5	MMV688844	C23H25N4O2Cl	X	
H7	MMV024311	C19H21N3		X	
PLACA D	A4	MMV023953	C25H28N4O	X	
	B5	MMV024829	C23H32N4O		X
	B8	MMV676064	C23H21N2O2F		X
	B9	MMV688180	C21H24N6O2Cl2S		X
	C2	MMV020291	C21H33N3O3S		X
	D2	MMV676269	C21H25N2O2F		X
	D4	MMV026550	C20H23N3O		X
	E7	MMV688364	C25H29N7O2		X
	E10	MMV688271	C18H16N6OCl2	X	

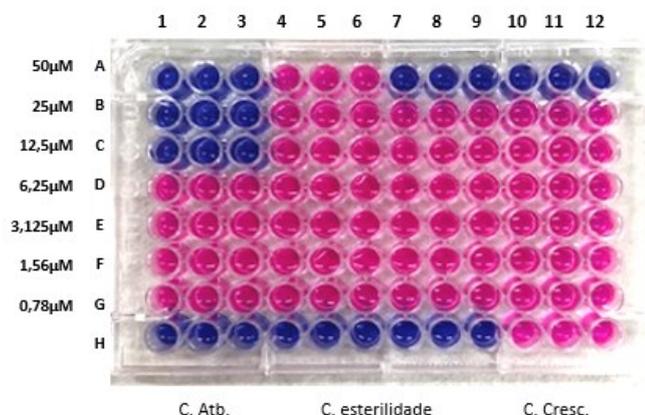
	Posição composto	ID composto	Fórmula Molecular	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 29213
	G4	MMV011691	C21H21N5O3	X	
PLACA E	A4	MMV688771	C18H19N3OS		X
	A5	MMV687798	C18H20N3O4F	X	X
	A6	MMV688775	C43H58N4O12		X
	B4	MMV688938	C20H21N2OFS		X
	B6	MMV004168	C19H23N2Cl	X	
	C5	MMV676599	C20H21N5		X
	C7	MMV688411	C20H21N7		X
	C8	MMV687765	C25H26N6O		X
	D3	MMV200748	C19H20N2O2Br		X
	D10	MMV687700	C17H18N6O8S		X
	E3	MMV002816	C10H21N3O	X	
	F3	MMV688552	C17H14N5OF3S		X
	F7	MMV228911	C21H19N3O3S	X	
	F8	MMV272144	C9H10N4O3S		X
	G8	MMV658988	C19H19N4Cl	X	
	H5	MMV688978	C20H34AuO9PS	X	
H7	MMV688273	C21H16N4OCIF		X	

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.2 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA – CIM

Na triagem com *E. coli* 25922, foram selecionados 24 compostos que apresentaram atividade para realização da CIM com o isolado de perfil resistente *E. coli* MCR-1. Destes, apenas 3 compostos apresentaram atividade em concentrações  $\leq 50 \mu\text{M}$ , sendo um composto com CIM de  $50 \mu\text{M}$  e 2 compostos com CIM de  $25 \mu\text{M}$ . Para verificar se existiria diferença entre as CIMs de isolados de uma mesma espécie, foram determinadas as CIMs do isolado *E. coli* 25922, em que 9 compostos apresentaram atividade  $\leq 50 \mu\text{M}$ . Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1 e na Figura 13. As CIM foram: dois compostos  $50 \mu\text{M}$ ; dois compostos  $25 \mu\text{M}$ ; um composto  $12,5 \mu\text{M}$ ; dois compostos  $3,125 \mu\text{M}$ ; dois compostos  $1,56 \mu\text{M}$ .

Figura 13: Microplaca representativa do resultado obtido no ensaio para determinação de CIM dos compostos que apresentaram atividade na triagem com 100  $\mu\text{M}$ .



A: Os compostos foram distribuídos em triplicatas, na fileira A e diluídos em série até a fileira G. B: Placa 4 do isolado *S. aureus* MRSA. Em cada microplaca foi realizada a CIM de contém 4 compostos que apresentaram atividade na triagem com 100  $\mu\text{M}$ . Os compostos estão distribuídos em triplicatas lineares nas fileiras A-G e colunas 1-12 por diluição seriada; na fileira H temos os controles: H1-3 = controle de inibição do crescimento pelo antimicrobiano; H 4-9 = controle de esterilidade do meio de cultura; H10-12 = controle de crescimento bacteriano. No ensaio de resazurina temos atividade inibitória para o composto MMV020537 (colunas A1-3) com CIM = 12,5  $\mu\text{M}$ ; MMV085210 (colunas A7-9) com CIM = 50  $\mu\text{M}$ ; e MMV019742 (colunas 10-12) com CIM = 50  $\mu\text{M}$ . Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 1: Determinação da CIM para os compostos do Pathogen Box® com atividade antimicrobiana contra *E. coli* 25922 e *E. coli* MCR-1.

PB	CP	ID COMPOSTO	NOME	CIM ( $\mu\text{M}$ )	
				25922	MCR-1
A	A10	MMV676449		100	> 50
A	C3	MMV688548		100	> 50
A	E10	MMV676445		1,56	> 50
A	G6	MMV063404		100	> 50
B	E6	MMV002817	indoquinol	50	> 50
B	F7	MMV020321		50	> 50
B	F10	MMV020320		3,125	> 50
B	G8	MMV000858		3,125	> 50
B	H9	MMV020391		100	> 50
C	A2	MMV675997		12,5	25
C	B7	MMV054312		100	> 50
C	D5	MMV687248		100	> 50
C	G3	MMV675993		100	> 50
C	G4	MMV021660		1,56	> 50
C	G11	MMV688703		100	> 50
C	H5	MMV688844		100	> 50
D	A4	MMV023953		100	> 50
D	E10	MMV688271		100	> 50
D	G4	MMV011691		100	> 50

PB	CP	ID COMPOSTO	NOME	CIM ( $\mu\text{M}$ )	
				25922	MCR-1
E	A5	MMV687798	levofloxacino	NR	NR
E	B6	MMV004168		25	50
E	E3	MMV002816	dietilcarbamazina	100	> 50
E	F7	MMV228911		25	25
E	G8	MMV658988		100	> 50
E	H5	MMV688978	auronafina	100	> 50

PB: placa do Pathogen Box; CP: posição do composto na placa do Pathogen Box; NR: CIM não avaliada

Da triagem com *S. aureus* 29213, foram selecionados os 44 compostos que apresentaram atividade inibitória para realizar a CIM com o isolado de perfil resistente, *S. aureus* MRSA. Desses, 16 compostos apresentaram atividade inibitória em concentrações  $\leq 50 \mu\text{M}$ , sendo 10 compostos com CIM de  $50 \mu\text{M}$ ; um composto  $25 \mu\text{M}$ ; um composto  $12,5 \mu\text{M}$ ; um composto  $6,25 \mu\text{M}$ ; um composto  $1,56 \mu\text{M}$ ; dois compostos  $0,78 \mu\text{M}$  (Tabela 2).

Tabela 2: Determinação da CIM para os compostos do Pathogen Box® com atividade antimicrobiana contra *S. aureus* MRSA

PB	CP	ID COMPOSTO	NOME	CIM ( $\mu\text{M}$ ) MRSA
A	A6	MMV688796		> 50
A	B10	MMV102872		> 50
A	C6	MMV688943	difenoconazol	> 50
A	C9	MMV676439		> 50
A	E6	MMV688756	sutezolida	6,25
A	E8	MMV676431		> 50
A	F4	MMV676388		50
A	G5	MMV688958		> 50
A	H3	MMV688360		> 50
B	A11	MMV688761		> 50
B	B11	MMV021057	azoxistrobina	0,78
B	C10	MMV019721		> 50
B	D2	MMV020537		12,5
B	D4	MMV676536		> 50
B	E5	MMV688773	benznidazol	> 50
B	F11	MMV085210		50
B	H4	MMV687803	linezolida	12,5
B	H6	MMV019742		50
B	H8	MMV006901		> 50
C	A3	MMV676204		50
C	C4	MMV687243		50
C	D2	MMV688410		> 50
C	E4	MMV687699		0,78
C	F5	MMV687138		50
C	H7	MMV024311		> 50

PB	CP	ID COMPOSTO	NOME	CIM ( $\mu\text{M}$ ) MRSA
D	B5	MMV024829		> 50
D	B8	MMV676064		> 50
D	B9	MMV688180		> 50
D	C2	MMV020291		> 50
D	D2	MMV676269		50
D	D4	MMV026550		50
D	E7	MMV688364		50
E	A4	MMV688771		25
E	A5	MMV687798	levofloxacino	1,56
E	A6	MMV688775	rifampicina	50
E	B4	MMV688938		> 50
E	C5	MMV676599		> 50
E	C7	MMV688411		> 50
E	C8	MMV687765		> 50
E	D3	MMV200748		> 50
E	D10	MMV687700		1,56
E	F3	MMV688552		> 50
E	F8	MMV272144		> 50
E	H7	MMV688273		50

PB: placa do Pathogen Box; CP: posição do composto na placa do Pathogen Box.

Finalizada a determinação das CIM de todos os compostos, foram selecionados os que demonstraram ser mais promissores quanto à ação antibacteriana frente aos isolados resistentes. Para que testes subsequentes pudessem ser realizados, a MMV forneceu uma nova remessa dos compostos que apresentam potencial atividade uma vez que o volume inicial nas placas de fornecimento é bastante limitado. Os compostos selecionados foram escolhidos pelo melhor desempenho em inibir o crescimento dos isolados em menores concentrações, foram eles: MMV004168, MMV228911, MMV675997, MMV676269, MMV688771, MMV688756, MMV020537, MMV687700, MMV687699 e MMV021057 (Quadro 8).

Quadro 8: Compostos com atividade inibitória que foram solicitados para realizar demais análises.

	PATOLOGIA	COMPOSTO	ID COMPOSTO	CIM ( $\mu\text{M}$ )
<i>E. coli</i> MCR-1	Kinetoplastida	B6 – E	MMV004168	50
	Tuberculose	F7 – E	MMV228911	25
	Kinetoplastida	A2 – C	MMV675997	25
<i>S. aureus</i> MRSA	Malária	D2 – D	MMV676269	50
	Esquistossomose	A4 – E	MMV688771	25
	Malária	D2 – B	MMV020537	12,5

	PATOLOGIA	COMPOSTO	ID COMPOSTO	CIM ( $\mu\text{M}$ )
<b>S. aureus</b> <b>MRSA</b>	Tuberculose	E6 – A	MMV688756 Sutezolida	6,25
	Tuberculose	D10 – E	MMV687700	1,56
	Tuberculose	E4 – C	MMV687699	0,78
	Malária	B11 – B	MMV021057 Azoxistrobina	0,78

Fonte: Elaborado pela autora

### 4.3 PESQUISA DOS COMPOSTOS EM BANCOS DE DADOS

#### 4.3.1 *Escherichia coli* 25922 e *Escherichia coli* MCR-1

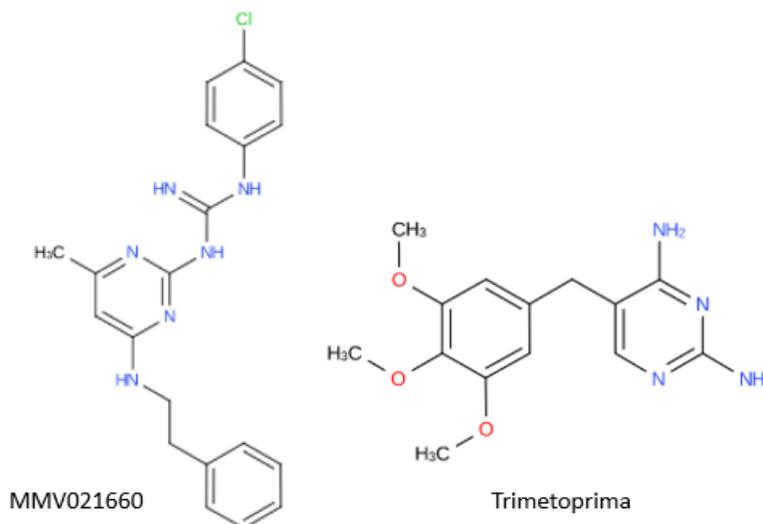
Entre os compostos que se destacaram para *E. coli* MCR-1, encontramos três com  $\text{CIM} \leq 25 \mu\text{M}$ : MMV228911 ( $25 \mu\text{M}$ ), MMV004168 ( $12,5 \mu\text{M}$ ) e MMV675997 ( $12,5 \mu\text{M}$ ). Esses compostos apresentaram  $\text{CIM} = 25 \mu\text{M}$  na triagem contra *E. coli* 25922. Este achado pode ser sugestivo de que estes compostos possuem um mecanismo de ação independente dos alvos relacionados ao mecanismo de resistência produzido pelo gene *mcr-1*. Curiosamente, outros quatro compostos: MMV676445, MMV020320, MMV000858 e MMV021660 mostraram uma excelente atividade inibitória contra *E. coli* 25922 com  $\text{CIM} \leq 3,125 \mu\text{M}$  (Tabela 1). Entretanto, nenhum desses compostos apresentou atividade inibitória para *E. coli* MCR-1 em concentrações  $\leq 50 \mu\text{M}$ . Esta diferença entre CIM de cepas de uma mesma espécie, poderia ser indicativa de que um dos muitos mecanismos de ação possíveis para esses compostos poderia de alguma forma envolver a membrana bacteriana, já que é nela que se manifesta o mecanismo de resistência às polimixinas conferida pelo gene *mcr-1*. Este gene codifica uma enzima da família fosfoetanolamina transferase que, ao ser expressa, resulta na adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A, que apresenta afinidade reduzida pelo lipídeo da membrana, perdendo assim sua atividade terapêutica (LIU et al., 2016).

Até a finalização deste trabalho, não havia na literatura estudos publicados que tenham avaliado a atividade antibacteriana ou possíveis mecanismos dos compostos presentes no Pathogen Box® para os quais encontramos atividade inibitória contra os isolados de *E. coli* que poderiam explicar essa ação. Os estudos encontrados sobre os compostos são relacionados a suas patologias de origem, sendo eles majoritariamente análogos de antimaláricos ou fármacos antituberculose já com eficácia comprovada.

Mi-ichi e colaboradores (2018) investigaram o Pathogen Box® em busca de compostos promissores para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de amebíase que inibissem a formação de cistos e/ou proliferação de trofozoítos de duas espécies de *Entamoeba*, e identificou 22 compostos do Pathogen Box® que reduziram em mais de 80% o desenvolvimento das amebas utilizando uma concentração de 10 µM. Um destes foi o composto MMV020320, que inibiu quase que completamente a formação do cisto, porém não afetou a proliferação de trofozoítos. Estudo semelhante realizado para atividade antimalárica por citometria de fluxo aplicou um valor corte para inibição de crescimento (IC) estabelecido em 70% e avaliou a eficácia dos compostos em 24 e 48 horas para monitorar diferentes fases do ciclo de reprodução do *Plasmodium*. Os compostos puderam ser analisados e classificados em 4 tipos quanto a sua ação nos parasitos, Tipo I: parasitos foram capturados ou mortos sem replicação de DNA; Tipo II: semelhante ao tipo I com redução de bacteremia; Tipo III: parasitos progrediram para fase trofozoíto sem replicação suficiente de DNA; Tipo IV: parasitos foram capturados na fase trofozoíto tardia ou esquizonte com replicação de DNA. Entre eles temos os compostos antimaláricos MMV000858, MMV020537, MMV021057 do tipo I, todos com IC  $\geq 96,9\%$  e morte sem replicação de DNA; MMV020320 com 84% de IC após 48 horas com replicação de DNA já na fase trofozoíto ou esquizonte; e o composto MMV021660 com uma IC de 100,4% do tipo II, porém este composto, diferente dos anteriores que são antimaláricos, é classificado no Pathogen Box® como antituberculose (TOUGAN et al., 2019). MMV021660 é uma 2,4-diamino pirimidina que, em estudo realizado por Duffy e colaboradores (2017), também apresentou potente atividade antimalárica no estágio sanguíneo assexuado, com IC<sub>50</sub> = 0,160 µM, demonstrou ser bastante promissor no ponto de vista da otimização molecular e com possível atuação na via do folato. A via de biossíntese do folato é regulada principalmente pela enzima diidrofolato redutase (DHFR), presente em diversas espécies, desde humanos até seres procariotos, está associada à síntese de novo de glicina, purina e de precursores da síntese de DNA (UNIPROT, 2019). Um inibidor da síntese de folato bastante utilizado na clínica é a trimetoprima (Figura 14) que atua como um inibidor competitivo ao se ligar na enzima DHFR bacteriana e impede a formação dos tetra-hidrofolato, um precursor essencial para a síntese de DNA (NCBI, 2019a). Popov e colaboradores (2006) sintetizaram e analisaram análogos da trimetoprima em estudo de *docking* em busca de novos inibidores para DHFR de *Cryptosporium hominis*. Ao compararem DHFR de diferentes espécies, verificaram que apesar da forte homologia entre os resíduos de aminoácidos no sítio de ação onde ocorre a ligação ao anel 2,4-diamino pirimidina, existem pequenas diferenças de aminoácidos e estruturais encontradas entre

DHFR de algumas espécies que podem ser substituídas na molécula para aumentar ou reduzir afinidade para o organismo desejado, neste estudo encontraram que a substituição em C7 da trimetoprima, resultou em análogos com afinidade aumentada em até 4x para DHFR de *C. hominis* em relação a trimetoprima.

Figura 14: Estruturas químicas dos compostos MMV021660 e trimetoprima que possuem grupamento 2,4-diamino pirimidina

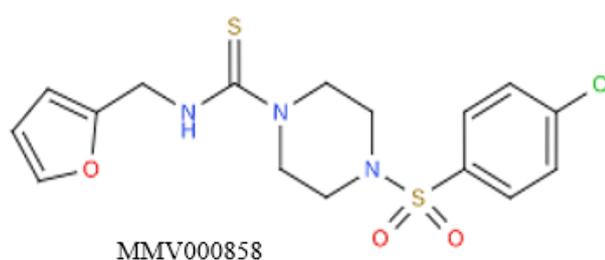


Fonte: Pubchem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim> e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44523242>.

Foi realizada uma busca para verificar se existiria alguma proteína similar conhecida onde o composto MMV021660 pudesse exercer sua atividade de forma semelhante como em *Plasmodium*. Assim, realizando um Blastp entre a sequência fasta da enzima DHFR de *Plasmodium falciparum* (DRTS\_PLAFK) e de *Escherichia coli*, o melhor percentual de identidade foi de 45,55% para timidilato sintase (número de acesso WP\_109956121.1) com um E value  $2e-82$ . A enzima timidilato sintase (TS) catalisa a etapa final da síntese de novo do timidilato; ela atua na etapa anterior a da DHFR, sendo também essencial para síntese de DNA por fornecer a única fonte biossintética de 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) (POZZI et al., 2019). Assim como a DHFR, as TS estão presentes em diversos organismos e são altamente conservadas entre espécies, sendo que a TS de *E. coli* e a TS humana compartilham 46% de identidade e 60% de semelhança. Em decorrência dessa semelhança, a TS de *E. coli* é utilizada como modelo de alvo para fármacos direcionados a TS humana, principalmente no tratamento do câncer. Entretanto, até então nenhum antimicrobiano foi desenvolvido com atuação nela (ISLAM et al., 2018).

O composto MMV000858 (Figura 15) é uma sulfonamida piperazina que apresenta potente atividade contra *P. falciparum*, porém ele apresenta grupos furanila, tioureia e nitrofenila que geram metabólitos tóxicos. Martyn e colaboradores (2010) realizaram algumas substituições nesta substância e concluíram que o furano pode ser substituído sem perda de atividade, já a tioureia ao ser substituída resultou em perda significativa de atividade antiplasmodial. Acredita-se que seu mecanismo de ação seja através de inibição na PfATP4, uma proteína presente no *Plasmodium falciparum* responsável por manter a baixa concentração de Na<sup>+</sup> intracelular (SPILLMAN; KIRK, 2015).

Figura 15: Estrutura química do composto MMV000858



Fonte: Pubchem, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1295876>.

Foi realizada uma pesquisa para verificar se para o composto MMV000858 também existiria alguma proteína similar conhecida em *E. coli* onde esse composto poderia exercer sua atividade de forma semelhante contra *Plasmodium*. Assim, foi realizado um Blastp entre a sequência fasta da proteína PfATP4 obtida no Uniprot (Q9U445\_PLAFA) e a as sequências de *E. coli*. Dezenas de resultados de proteínas ATPase tipo P, também envolvidas no transporte de diferentes íons específicos, foram encontradas, sendo o melhor *hit* correspondente a uma ATPase transportadora de cátions (número de acesso PPI92839.1) que apresentou 31,86% de identidade e E value 1e-120. Estas enzimas estão presentes em praticamente todos os seres vivos e sua atividade depende de um ciclo de autofosforilação e desfosforilação. Os sítios de ligação dos íons estão localizados na região intramembranar destas bombas que apresentam duas conformações principais: E1 que permite acesso dos íons ao citoplasma; e E2 ao meio extracelular (CHAN et al., 2010). Fármacos que agem nestas enzimas ainda não possuem mecanismos elucidados, porém acredita-se que através da ligação em uma hélice transmembranar do transportador E2, impediriam que a bomba retorne à conformação E1 interrompendo o transporte de íons, que pode levar a célula à apoptose por excesso de cálcio intracelular (YATIME et al., 2009). Possíveis alvos de ação do composto

poderiam, então, ser nessas hélices transmembranares, ou também atuar bloqueando o ciclo de fosforilação do qual a enzima depende para funcionar.

#### 4.3.2 *Staphylococcus aureus* MRSA

Para *S. aureus* MRSA, seis moléculas apresentaram atividade inibitória com CIM  $\leq$  25  $\mu$ M: MMV688771 (25  $\mu$ M), MMV020537 (12,5  $\mu$ M), MMV688756 (6,25  $\mu$ M), MMV687700 (1,56  $\mu$ M), MMV687699 (0,78  $\mu$ M) e MMV021057 (0,78  $\mu$ M). Dois deles são compostos com atividade conhecida para outros microrganismos descritos na literatura, MMV021057 - azoxistrobina e MMV688756 - sutezolida.

A azoxistrobina é um fungicida do tipo estrobilurina amplamente utilizado na agricultura, sendo o fungicida mais vendido no mundo no ano de 1999. Sua atividade é decorrente da inibição da respiração mitocondrial por ligação no sítio do citocromo b localizado na membrana mitocondrial interna de fungos e outros organismos. Quando os inibidores se ligam, ele bloqueia a transferência de elétrons entre o citocromo b e citocromo c1 (Complexo III) e interrompe a fosforilação oxidativa necessária ao crescimento celular, interrompendo o ciclo de energia no fungo e a produção de ATP (BARTLETT et al., 2002). Estudo conduzido por Baćmaga, Kucharski e Wyszowska (2015) revelou que altas doses de azoxistrobina inibiram o crescimento de bactérias organotróficas e tiveram um efeito inibitório nas enzimas desidrogenase, catalase, urease, fosfatase ácida e fosfatase alcalina do solo. Neste estudo também foram encontradas quatro bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de solo contaminado com altas doses de azoxistrobina, o que demonstra adaptabilidade destas, devido ao potencial de degradar pesticidas que pode até ser considerado em estratégias de remediação em solos contaminados por agrotóxicos. Blastp realizado entre citocromo b de um fungo (CYB\_YEAST) e *S. aureus* obteve como melhor resultado um citocromo b com 53,00% de identidade e um E value 4e-58 (número de acesso OWU61376.1). O E value indica o número de alinhamentos que seriam esperados com valores de score igual ou melhores que o encontrado por acaso, sendo que, quando mais próximo de 0 melhor, o que indicaria que não há chances de determinado alinhamento ter ocorrido ao acaso (NCBI, 2019b).

*S. aureus* é positivo para presença de catalase, urease e fosfatase alcalina. Estas mesmas enzimas sofreram inibição pela azoxistrobina, assim como as bactérias *Bacillus* spp. Blastp realizado entre a urease de *Bacillus subtilis* (URE1\_BACSU) e a urease de *S. aureus* encontrou 100 sequências de urease subunidade alfa todas com similaridade acima de 62% e E value = 0. O melhor *hit* encontrado possui 64,96% de identidade (número de acesso

WP\_126317396.1). Recentemente foi descrita por Zhou e colaboradores (2019) a importância da urease no equilíbrio da homeostase de pH do *S. aureus* em situações de estresse em meio ácido, além de ser um importante fator na patogênese de *S. aureus*. Estes achados podem ser sugestivos de modos que a azoxistrobina pode exercer seu efeito antibacteriano por meio de uma destas enzimas.

MMV687700 é um inibidor bi-substrato de MbtA na via de biossíntese da micobactina. Este composto é um análogo não hidrolisável do intermediário salicil-AMP, que tem sido bastante estudado por não haver homólogos em células mamíferas. Foi sintetizado por Ferreras e colaboradores (2005) e inibiu o crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* em condições limitantes de ferro.

Blastp com a MbtA de *Mycobacterium tuberculosis* (MBTA\_MYCTU) com *S. aureus* resultou nos seguintes alinhamentos: proteína de ligação AMP com 35,50% de similaridade (WP\_050968471.1), E value  $2e-107$ ; acil-CoA sintetase com similaridade de 29,78% (SQA10713.1) e E value  $1e-39$ ; Acetil-coenzima A sintetase com E value  $4e-30$ , similaridade de 27,19% (SQA09884.1) e acetato-CoA ligase com E value de  $5e-24$ , similaridade de 23,53% (WP\_031866623.1).

Pethe e colaboradores (2013) ao investigarem atividade antimicobacteriana em mais de 100.000 compostos, encontraram moléculas bastante semelhantes a MMV687699 que atuam na inibição da respiração mitocondrial, e foram ativas contra diversas cepas de *M. tuberculosis* MDR em cultura. Após investigação aprofundada, os autores deduziram a importância da 3-carboxiamida ligando a imidazo [1,2-a] piridina a um grupo lipofílico linear longo. Além disso, os grupos piperazina ou piperidina entre os grupos fenila da cadeia lipofílica melhoraram a potência e a estabilidade metabólica (VEALE, 2019).

MMV020537 possui homologia estrutural com inibidores já relatados por possuírem atividade na enzima di-hidroorotato desidrogenase (DHODH). Esta enzima é responsável por catalisar a biossíntese de novo das pirimidinas. *Plasmodium* são incapazes de sintetizar purinas ou de recaptar as pirimidinas do ambiente, sendo totalmente dependentes desta via para sobreviver. Este composto apresentou atividade contra a cepa selvagem de *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> = 322nM ± 41), mas não para o mutante resistente (ROSS et al., 2018).

Demonstrou também ser bastante promissor em um recente estudo de simulação e dinâmica molecular desenvolvido por Ropón-Palacios e colaboradores (2019) em busca de possíveis fármacos para o tratamento de Nipah vírus através de cálculo de constante de dissociação (0,03 nM), *docking* e estabilidade no sítio de ligação. Blastp com a DHODH de *Plasmodium knowlesi* (A0A1Y3DML0\_PLAKN) com *S. aureus* resultou nos seguintes

alinhamentos: di-hidroorotato desidrogenase (fumarato) com 34,23% de identidade (número de acesso KDP49079.1), E value 7e-42; di-hidroorotato desidrogenase com identidade de 32,35% (número de acesso SQA11165.1), E value 1e-41; di-hidroorotato desidrogenase dependente de quinona, identidade de 33,13% (número de acesso WP\_075109411.1) e E value 1e-40.

No quadro 9 é possível visualizar o alinhamento das proteínas de diferentes microrganismos, aos quais os compostos do Pathogen Box apresentaram atividade inibitória contra cepas de *E. coli* e *S. aureus* em busca de possíveis proteínas com funções homólogas que podem ser sugestivas do mecanismo de ação.

Quadro 9: Dados obtidos de hits gerados por BLASTp entre alvos biológicos de diferentes microrganismos patogênicos que sofreram inibição pelos compostos do Pathogen Box

CEPA	COMPOSTO	ALVO LITERATURA			MELHOR HIT NO BLASTP			
		SITIO	PROTEÍNA	MICROORGANISMO	NÚMERO DE ACESSO	ENZIMA	% ID	E VALUE
<i>E. coli</i>	MMV021660	DHFR	DRTS_PLAFK	<i>Plasmodium falciparum</i>	WP_109956121.1	Timidilato sintase	45,55	2e-82
	MMV000858	PfATP4	Q9U445_PLAFA	<i>Plasmodium falciparum</i>	PPI92839.1	ATPase transportadora de cátions	31,86	1e-120
<i>S. aureus</i>	MMV021057 Azoxistrobina	Citocromo b	CYB_YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	OWU61376.1	Citocromo b	53,00	4e-58
		Urease subunidade alfa	URE1_BACSU	<i>Bacillus subtilis</i>	WP_126317396.1	Urease subunidade alfa	64,96	0
	MMV687700	MbtA	MBTA_MYCTU	<i>M. tuberculosis</i>	WP_050968471.1	Proteína de ligação AMP	35,50	2e-107
	MMV020537	DHODH	AOA1Y3DML0_PLAKN	<i>Plasmodium knowlesi</i>	KDP49079.1	di-hidroorotato desidrogenase (fumarato)	34,23	7e-42

Legenda: %ID = percentual de identidade. Fonte: Elaborado pela autora

Foi encontrado na literatura um único estudo que avaliou a atividade antiestafilocócica e antibiofilme dos compostos do Pathogen Box®. Bhandari e colaboradores (2018) encontraram 13 compostos com CIM inferior a 50 µM para os isolados *S. aureus* sensíveis e resistentes à metilicina, sendo os cinco mais promissores MMV676477, MMV688179, MMV102872, MMV688508 e MMV687807 com CIM ≤ 8,50 µM. Interessantemente, apesar desse estudo ter utilizado o mesmo isolado *S. aureus* 29213, apenas um composto (MMV102872) coincidiu com os resultados encontrados neste trabalho. Esta divergência pode ter ocorrido por diversos fatores desde os materiais e reagentes utilizados, variáveis técnica e condições do ensaio, conservação e estabilidade dos compostos e alteração do perfil de sensibilidade do isolado após exceder limite de descongelamento e repique.

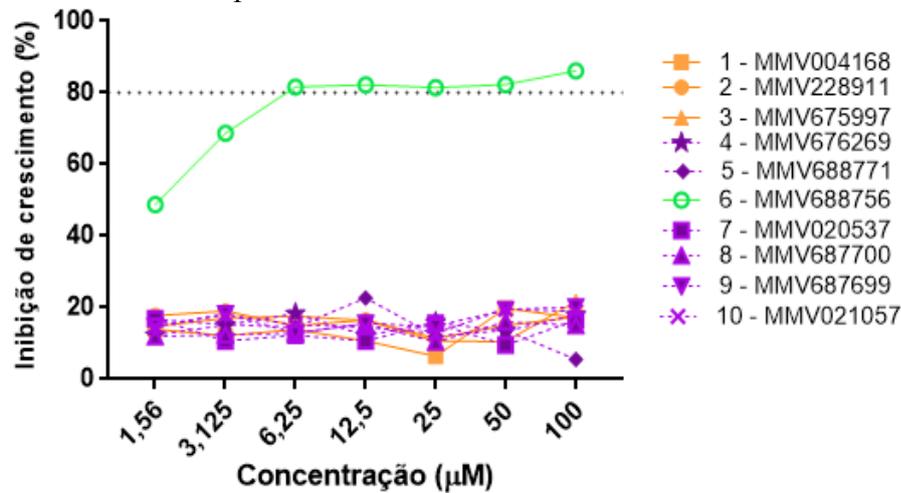
#### 4.4 ENSAIOS COM NOVA REMESSA DE COMPOSTOS DO PATHOGEN BOX®

Após recebimento dos compostos, eles foram reconstituídos e reavaliados quanto à concentração inibitória mínima para verificar a reprodutibilidade do ensaio anterior. Entretanto, os resultados não foram reprodutíveis. Apenas um entre os dez compostos apresentou atividade inibitória de crescimento, MMV688756 (sutezolida) que apresentou o mesmo valor de CIM obtido anteriormente (6,25  $\mu\text{M}$ ). Os demais não apresentaram atividade inibitória de crescimento em nenhuma das concentrações avaliadas da microdiluição em caldo (1,56  $\mu\text{M}$  até 100  $\mu\text{M}$ ). O resultado foi avaliado por leitura visual pela presença de turvação, ensaio da resazurina e leitura de absorvância em triplicatas técnicas e biológicas em que nenhum composto apresentou  $\text{IC} \geq 22\%$ .

Algumas hipóteses podem ser levantadas a respeito da diferença de atividade dos compostos nesta nova etapa, como uma variação na estabilidade decorrente da diferente apresentação da remessa entre os compostos recebidos inicialmente no kit do Pathogen box®, que vieram já dissolvidos em DMSO, e os enviados posteriormente em pó para serem reconstituídos no momento do uso. Outra possibilidade seria a atividade antibacteriana inicial estar relacionada com metabolitos resultantes da degradação dos compostos já dissolvidos em DMSO na placa por um longo período de tempo. Na Figura 16, estão plotados os dados obtidos com as triplicatas realizadas com estes compostos, em que é possível visualizar o composto MMV688756 com um nítido perfil de inibição de atividade, pela diminuição da densidade ótica conforme aumenta a concentração do composto e pelo percentual de inibição de crescimento, que na sua CIM foi de 81,6%. Os demais compostos apresentam um perfil praticamente linear pela ausência de variação na inibição de crescimento bacteriano.

Deste modo, até o momento o único composto disponível para dar continuidade nas análises foi o MMV688756, a sutezolida.

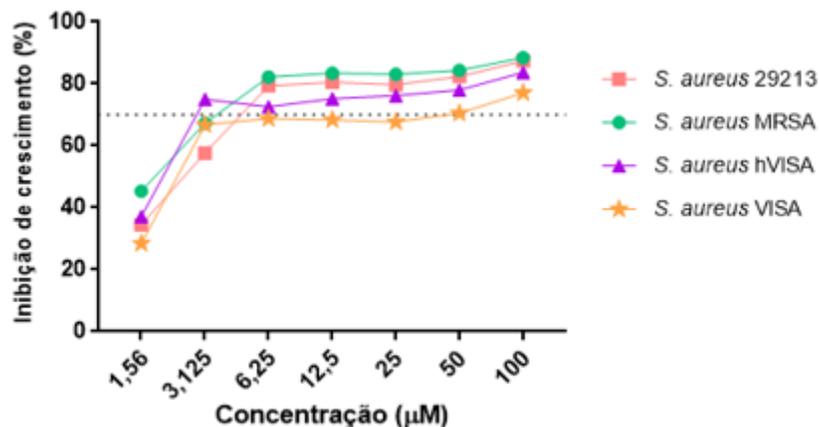
Figura 16: Inibição de crescimento apresentado pelos 10 compostos do Pathogen Box® com potencial atividade antibacteriana



A sutezolida (MMV688756) está representada em verde. Em laranja estão os compostos avaliados contra *E. coli* e em roxo os avaliados contra *S. aureus*. Fonte: desenvolvido pela autora

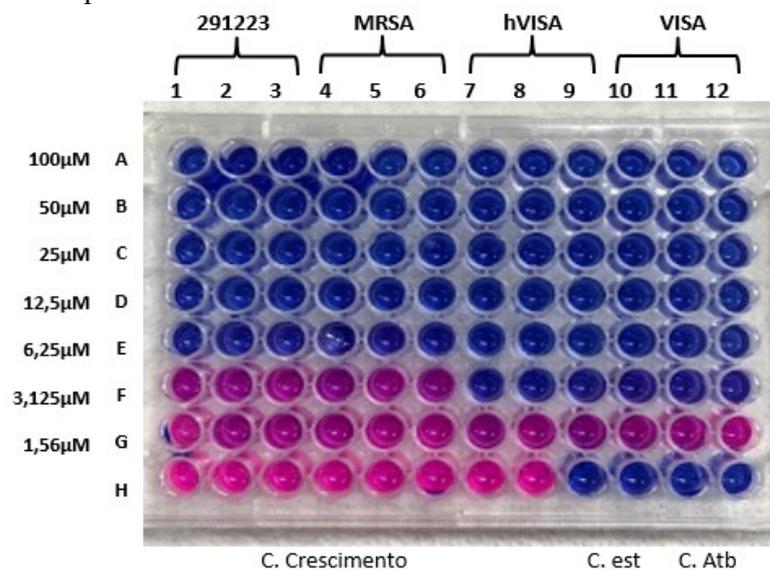
O composto MMV688756 (sutezolida) foi ativo contra *S. aureus* 29213 na triagem inicial com 100 µM e para *S. aureus* MRSA apresentou uma CIM de 6,25 µM; entretanto a CIM para *S. aureus* 25922 ainda não havia sido avaliada. Deste modo, foi feito um comparativo com quatro isolados de *S. aureus* distintos que possuem diferentes perfis de resistência: *S. aureus* 29213, *S. aureus* MRSA, *S. aureus* hVISA, *S. aureus* VISA (Figura 17). A CIM da sutezolida contra as cepas VISA e hVISA foi de 3,125 µM, e 6,25 µM contra MRSA e *S. aureus* 29213 (MSSA) (Figura 18).

Figura 17: Perfil de inibição de crescimento % para isolados de *S. aureus* com perfis de resistência distintos contra MMV688756



Fonte: elaborado pela autora

Figura 18: Resultado obtido no ensaio em microplaca para determinação de CIM da sutezolida contra as cepas de *S. aureus*

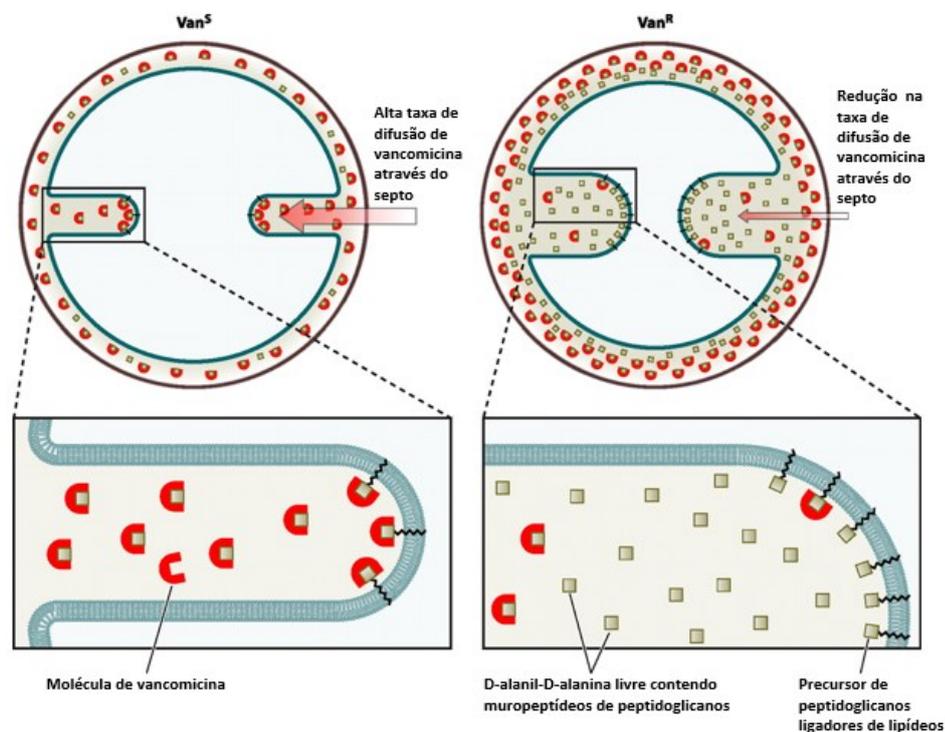


CIM em triplicata da sutezolidada com 4 cepas diferentes de *S. aureus*: 29213 (MSSA); MRSA; hVISA e VISA em diluição seriada entre as linhas A-G. Na fileira H temos os controles: H1-2 = controle de crescimento bacteriano MSSA; H3-4 = controle de crescimento bacteriano MRSA; H5-6 = controle de crescimento bacteriano hVISA; H7-8 = controle de crescimento bacteriano VISA; H 9-10 = controle de esterilidade do meio de cultura; H11-12: controle de inibição do crescimento pelo antimicrobiano. No ensaio de resazurina temos as CIM = 6,25 μM para *S. aureus* 29213 e MRSA; CIM = 3,125 μM para hVISA e VISA. Fonte: Elaborado pela autora

A parede celular de *S. aureus* é formada por uma camada de cadeias de peptidoglicanos altamente reticulada, composta por proteínas associadas a parede celular, aminoácidos e ácido teicoico. Estes são componentes essenciais para a manutenção da integridade celular, que pode ser revestida por uma cápsula de polissacarídeo (HOWDEN et al., 2010). A sensibilidade intermediária ou a hetero-resistência à vancomicina de *S. aureus* é caracterizada pelo espessamento da parede celular, interferindo na permeabilidade dos antimicrobianos até o alvo de ação. Isto pode ocorrer devido à superexpressão de genes que estimulam a produção de ácido teicoico e pela redução da atividade de PBPs que produzem resíduos anormais de muropeptídeos. Estes resíduos atuam como pseudo-alvos (especialmente nas VISAs), que “sequestram” a vancomicina impedindo a chegada do antimicrobiano no septo de divisão da célula onde ocorre a síntese da parede celular (Figura 19). No septo estão localizadas as moléculas de lipídeo II, precursores de peptidoglicano que apresentam resíduos terminais de D-ala-D-ala, aos quais os glicopeptídeos se ligam com alta afinidade e inibem a síntese da parede celular bacteriana pelo bloqueio das ligações cruzadas entre estes peptidoglicanos e impedem a formação do esqueleto estrutural da parede celular, que perde sua estabilidade e integridade, resultando em lise celular (GARCÍA et al., 2017; GREIN; SCHNEIDER; SAHL, 2019). Recentemente, Bibek, Sahukhal e Elasri (2019) conduziram um estudo sobre o efeito de mutantes com deleção do operon *msaACBR* na formação da parede

celular, em que foi demonstrada redução na espessura da parede celular e na ligação cruzada de peptidoglicanos de VISA e MRSA, quando comparadas com cepa selvagem. Este efeito aconteceu devido à diminuição na expressão de genes reguladores e concluiu-se que, possivelmente, o operon *msaACBR* controla a síntese e a hidrólise da parede celular. Adicionalmente, as cepas mutantes também apresentaram redução de ácido teicoico, que aumenta a sensibilidade da célula bacteriana aos antimicrobianos com ação na parede celular.

Figura 19: Modelo representativo do local de atividade da vancomicina no septo divisão e as mudanças associadas com o fenótipo VISA

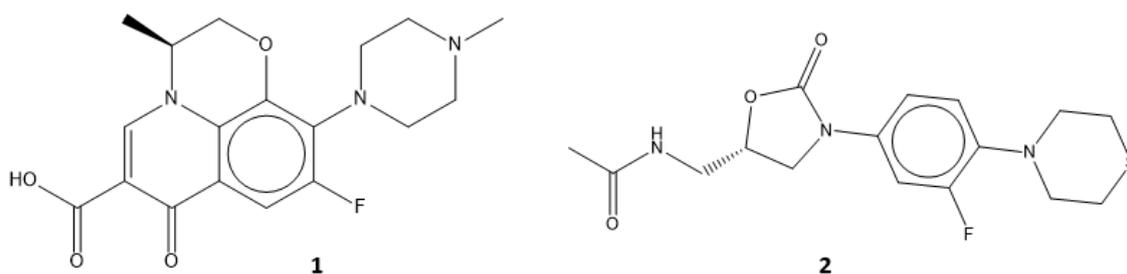


Diferença na espessura da parede celular entre uma bactéria VSSA (esquerda) e uma VISA (direita). A vancomicina se liga ao lipídeo II no septo de divisão para desempenhar sua ação. Nas células com resistência intermediária, a taxa de difusão das moléculas de vancomicina até o septo diminui, reduzindo a concentração efetiva do fármaco que atinge o precursor peptidoglicano ligado ao lipídeo (lipídeo II). Assim, a síntese de parede celular ocorre de maneira contínua e quanto mais espessa a parede, mais difícil das moléculas de vancomicina atingirem seu alvo. Fonte: adaptado de (HOWDEN et al., 2010).

A sutezolida (também conhecida como PNU-100480) é uma oxazolidinona atualmente em estudo clínico de fase II contra tuberculose (NIH, 2016). Apesar de mais de 20 anos de pesquisa por mais de 30 empresas, a linezolida continua sendo a única oxazolidinona aprovada pelo FDA. Sutezolida é um análogo tiomorfolinil da linezolida (Figura 20) que foi relatado como tendo um perfil de segurança e eficácia melhorado em comparação com a linezolida, além de apresentar potencial de reduzir a duração do tratamento farmacológico tanto para tuberculose sensível, como para multirresistente (SHAW; BARBACHYN, 2011;

WALLIS et al., 2014). A linezolida tem boa atividade contra muitas bactérias aeróbicas Gram-positivas, incluindo cepas resistentes de várias espécies, como MRSA, *Pneumococcus* resistente à penicilina (PRP) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), e é uma alternativa bastante utilizada na clínica para tratamento de infecções graves por MRSA, hVISA e VISA. Diversos casos clínicos relatados na literatura obtiveram rápido sucesso terapêutico com este medicamento após longo tempo de internação em uso de vancomicina sem melhora terapêutica. Esses casos eram possivelmente causados por uma cepa hVISA não diagnosticada por apresentar MIC na faixa de sensibilidade, como ocorreu em um caso de endocardite no Brasil em 2003 (ANDRADE-BAIOCCHI et al., 2003) e associação de linezolida com ácido fusídico e rifampicina na Austrália (HOWDEN et al., 2004) e associação de linezolida com ácido fusídico em Taiwan (HUANG et al., 2008).

Figura 20: Estruturas químicas da linezolida e sutezolida



1: linezolida (MMV687798); 2: sutezolida (MMV688756) Fonte: MMV Pathogen Box<sup>®</sup>

O mecanismo de ação das oxazolidinonas envolve a inibição da síntese de proteínas através da interação com a subunidade ribossômica 50S da bactéria, ligando-se competitivamente ao sítio catalítico 23S do RNA ribossomal (rRNA), bloqueando a conexão do aminoacil-tRNA ao sítio A da peptidiltransferase, que acarreta na interrupção do processo de tradução (LEACH et al., 2007; WILSON et al., 2008; ZHANG et al., 2014). Esse mecanismo difere dos outros antimicrobianos que também atuam na inibição da síntese proteica como macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e ácido fusídico. Esses fármacos atuam na fase de extensão da cadeia polipeptídica, já as oxazolidinonas atuam no estágio inicial, logo na fase de iniciação do complexo 70S (KARPIUK; TYSKI, 2017).

Apesar de já existirem relatos de resistência à linezolida, a incidência ainda é muito baixa e os mecanismos não estão associados ao espessamento da parede celular. Conforme relatado por García e colaboradores (2017), na avaliação do espessamento da parede e do

septo celular de MSSA, MRSA e MLRSA por microscopia eletrônica de transmissão, foram encontradas diferenças significativas na espessura da parede quanto ao septo entre as linhagens MSSA e MRSA e entre MSSA e MRLSA. Porém, entre MRSA e MRLSA não houve alteração significativa entre as características da espessura de parede ( $P = 0,386$ ) nem de septo ( $P = 0,117$ ). Seus mecanismos de resistência estão associados à mutação G2576U no domínio V do 23S rRNA, que reduz a afinidade do fármaco ao seu sítio de ação (AGER; GOULD, 2012), e mutação/deleção na proteína ribossomal L3 do centro da peptidiltransferase (PTC) (ENDIMIANI et al., 2011). Entretanto, as taxas de resistência à linezolida são baixas. Ross e colaboradores (2011) encontraram, especificamente para *S. aureus*, apenas um organismo que tinha um valor de CIM para linezolida  $\geq 8$  mg/L. O isolado era proveniente da Irlanda e continha a mutação mais comum do local alvo do gene do rRNA 23s, G2576T. Embora ainda não existam estudos que avaliaram a atividade da sutezolida contra outras bactérias Gram-positivas que não do gênero *Mycobacterium*, um relatório desenvolvido por Mutnick et al. (2002) coletou resultados através do Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY de mais de 30.000 isolados Gram-positivos tratados com linezolida e outros fármacos. Eles concluíram que as CIM da linezolida contra isolados de *S. aureus* de diferentes perfis de sensibilidade (MRSA, sensível a oxacilina/meticilina e *Staphylococcus* coagulase-negativo) não apresentaram diferença significativa: o valor da CIM50 e CIM90 para linezolida foi praticamente igual, independente do isolado ser sensível ou resistente à meticilina e outros antimicrobianos. Esta faixa estreita e de pouca variabilidade de CIM também foi evidenciada em uma rede europeia de vigilância de linezolida por 7 anos (ROSS et al., 2011). Isto pode indicar que as alterações de parede e membrana ocasionadas devido a outros mecanismos de resistências presentes no isolado não interferem com a captação das oxazolidinonas até seu sítio de ação nos ribossomos. Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, onde obtivemos para a sutezolida CIM = 6,25  $\mu$ M (para *S. aureus* MRSA e *S. aureus* 29213) e para linezolida CIM = 12,5  $\mu$ M (para *S. aureus* e MRSA e *S. aureus* 29213).

Já para os isolados *S. aureus* hVISA e *S. aureus* VISA, a CIM para sutezolida foi de 3,125  $\mu$ M. Isto pode ter ocorrido pois a resistência a antibióticos quando se dá por aquisição de um elemento genético móvel ou por mutação, muitas vezes pode estar associado com uma redução no *fitness* bacteriano. Esta perda pode se manifestar como uma desvantagem na disseminação clonal ou patogênica em determinada região (HU; PENG; RAO, 2016). Isolados com resistência intermediária aos glicopeptídeos, muitas vezes, apresentaram diminuição em suas taxas de crescimento. Acredita-se que este fato está relacionado ao espessamento da

parede celular que acarreta alterações morfológicas, como a presença de colônias menores e de crescimento mais lentos, e ampla instabilidade no fenótipo de resistência (MCCALLUM et al., 2006). Esta característica foi evidenciada neste trabalho pela baixa densidade ótica na presença de vancomicina das cepas resistentes em comparação às sensíveis e a presença de colônias pequenas. Assim, a diminuição da virulência nas cepas VISA e hVISA estariam associadas ao mesmo gene mutado responsável pela reduzida sensibilidade à vancomicina, que por sua vez as tornam mais sensíveis a outros compostos que atuam em outros sítios de ação. Essa redução de virulência, pode representar uma estratégia para que bactérias invasoras consigam penetrar em tecidos profundos sem serem detectadas pelo sistema imune inato e consigam assim promover a persistência clínica, uma vez que tecidos como válvulas cardíacas, implantes e tecido ósseo, apresentam uma vigilância imunológica comprometida (GARDETE et al., 2012).

Apesar de possuírem uma CIM muito semelhante, a sutezolida demonstrou em diferentes estudos uma atividade bactericida superior à linezolida por mecanismos ainda desconhecidos (WALLIS et al., 2010a; WALLIS et al., 2010b) que podem incluir melhor permeabilidade através da membrana celular eucariótica e acúmulo intracelular (ZHANG et al., 2014). Após administração oral, sutezolida é oxidada a um metabólito ativo, PNU-101603, que atinge concentrações plasmáticas muito maiores que a sutezolida. Estudo conduzido por Zhu e colaboradores (2014) determinaram simultaneamente a relação entre a atividade micobactericida intracelular e a concentração plasmática de sutezolida e do seu metabólito principal em pacientes com tuberculose pulmonar. Os autores constataram que a sutezolida é 17x mais potente que seu metabólito para combater *M. tuberculosis* intracelular; o metabólito, por sua vez, parece ser mais eficaz na atividade micobactericida extracelular devido às altas concentrações alcançadas.

#### 4.5 CITOTOXICIDADE

A partir da consulta realizada na literatura e no material suplementar fornecido pela “Medicines for Malaria Venture” (MMV), algumas possibilidades podem ser levantadas para futuros ensaios. Nas análises de toxicidade conduzidas por MMV, os compostos MMV228911 e sutezolida (MMV688756) demonstraram ter concentração citotóxica 50% (CC50) > 50  $\mu$ M contra a linhagem celular de carcinoma hepático (HepG2). As CIMs obtidas para esses dois compostos foram de 25 e 6,25  $\mu$ M, respectivamente. Com índice de seletividade (IS) = 2 para MMV228911 e IS = 8 para sutezolida. Os compostos MMV687700

(CIM = 1,56  $\mu\text{M}$ ) e MMV687699 (CIM = 0,78  $\mu\text{M}$ ) também foram avaliados contra células HepG2 e os valores de CC50 foram respectivamente  $>100 \mu\text{M}$  e 38,3  $\mu\text{M}$ . Com índice de seletividade (IS) = 64,10 para MMV687700 e IS = 49,09 para MMV687699.

Estes quatro compostos estão agrupados no Pathogen Box<sup>®</sup> como anti-tuberculose e todos apresentaram atividade antibacteriana em concentrações inferiores às concentrações tóxicas para as células humanas avaliadas. MMV021057 está classificado no Pathogen Box<sup>®</sup> como antimalárico e seu ensaio de toxicidade foi realizado com linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano (MRC5), com CC50  $> 28 \mu\text{M}$ . A CIM neste estudo foi de 0,78  $\mu\text{M}$ , um valor muito inferior à concentração tóxica e IS = 35,9. A baixa citotoxicidade destes compostos sugere que podem apresentar bom índice terapêutico de segurança, sendo bons candidatos para estudos mais aprofundados a fim de auxiliar no combate a bactérias MDR.

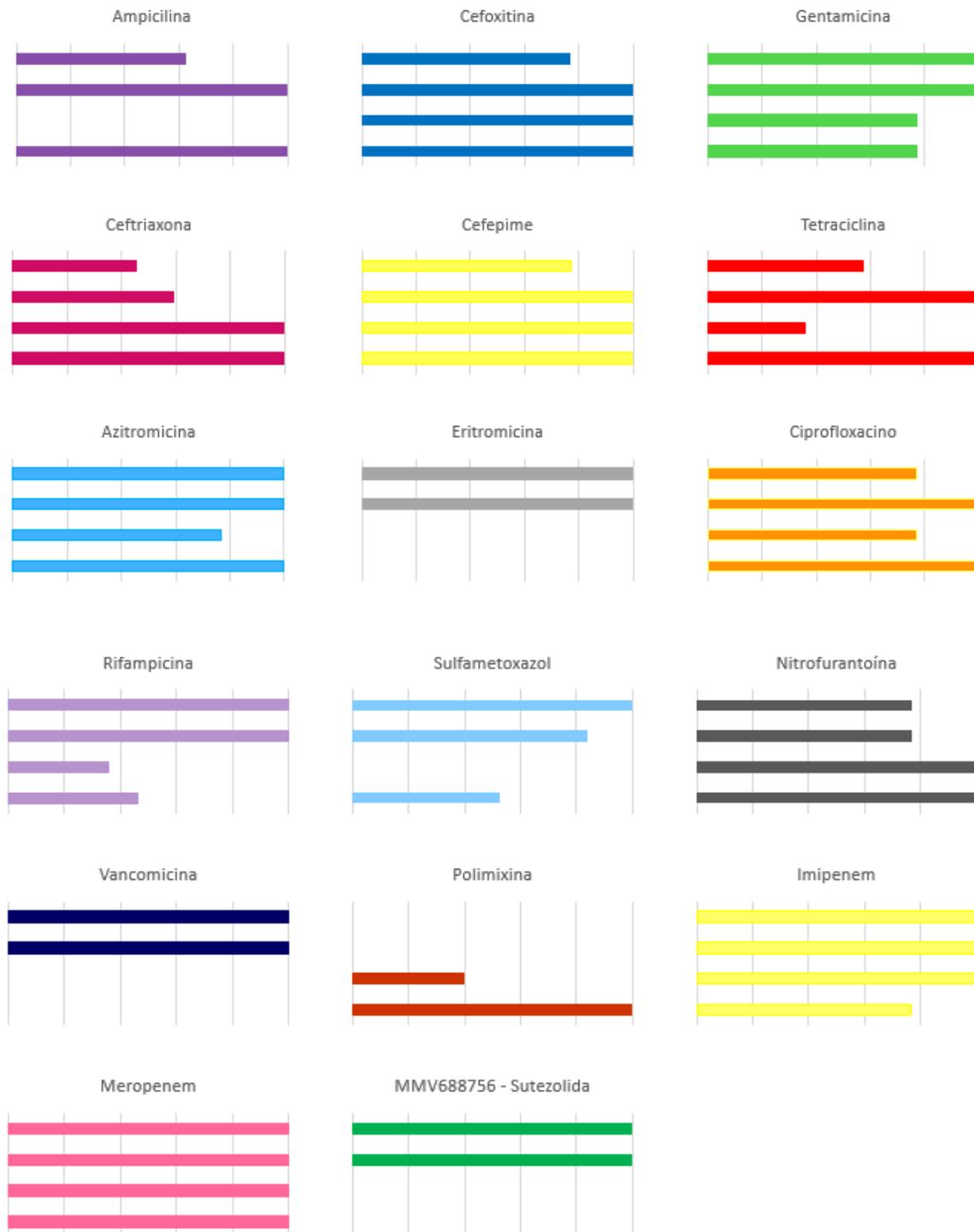
Os demais compostos apresentaram CIM maior que a CC50, indicando possível toxicidade a células saudáveis. Os dados de citotoxicidade dos compostos com atividade antibacteriana podem ser consultados no Anexo 3 e a tabela completa com dados dos 400 compostos está disponível no sítio eletrônico da MMV <<https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/pathogen-box-supporting-information>>

#### 4.6 BIOMAP SCREENING

A partir das CIMs obtidas para os antimicrobianos e compostos foram realizadas as etapas descritas por Wong, Oliver e Linington (2012) para obtenção dos histogramas concentração independente de cada um (figura 21).

O histograma da sutezolida possui um perfil semelhante ao da vancomicina e da eritromicina. Entretanto, temos uma forte limitação que é o número reduzido de isolados, para obtenção de dados mais concretos que reflitam a realidade da ampla gama de mecanismos de ação distintos. É necessário estabelecer os perfis para um maior número de isolados e antimicrobianos a fim de ampliar as inúmeras variações possíveis de serem encontradas com os antimicrobianos conhecidos e compostos ainda sem mecanismo de ação definido.

Figura 21: Histograma dos antimicrobianos utilizados e da sutezolida



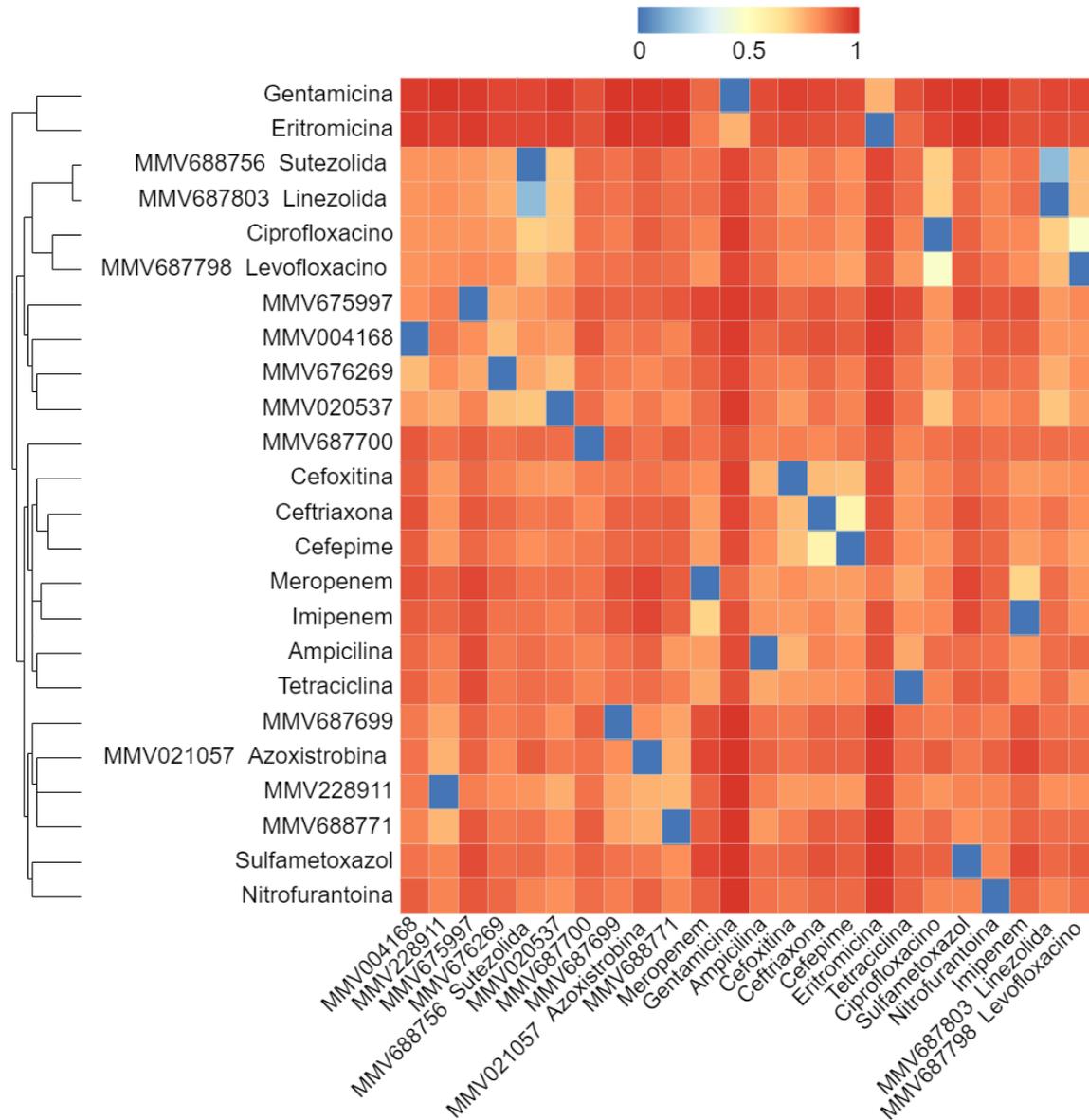
Os histogramas estão plotados em escala 0 – 1, sendo 0 inativo e 1 maior potencial de atividade inibitória. Cada linha do histograma representa um isolado, de cima para baixo temos: *S. aureus* MRSA, *S. aureus* 29213, *E. coli* MCR-1 e *E. coli* 25922. Fonte: elaborada pela autora.

#### 4.6.1 Clusterização hierárquica

Através do software *Chemmine tools* foi elaborada a clusterização hierárquica dos compostos para avaliar a similaridade estrutural entre eles e os antimicrobianos utilizados. Para isso, a estrutura de cada um dos compostos foi adicionada ao programa pela sequência SMILES (especificação de introdução linear molecular simplificada) fornecida no material suplementar do Pathogen Box<sup>®</sup> e o código de identificação deles obtido nos sítios eletrônicos do Pubchem e ChEMBL. A análise resultou em um dendrograma de dissimilaridade (Figura 21) construído pela diferença entre a matriz de distanciamento gerada entre todas as moléculas.

Os compostos demonstraram ser bastante diferentes entre si, inclusive entre antimicrobianos de mesma classe como os gentamicina-eritromicina (0,762), ciprofloxacino - levofloxacino (0,474) e ceftriaxona - cefepime (0,565). A maior similaridade encontrada foi entre a sutezolida e a linezolida (0,153), que apresenta coeficiente de Tanimoto por pareamento de átomos (AP) = 0,846; e por subestrutura comum máxima (MCS) 0,920. (<http://chemminetools.ucr.edu/similarity/>)

Figura 22: Clusterização hierárquica dos antimicrobianos e compostos com atividade antibacteriana expressiva



A medida de similaridade utilizada foi o coeficiente de Tanimoto (Tc), ou seja, a dissimilaridade é igual a  $1 - Tc$ . O Tc varia de 0 a 1, em que quanto mais próximo de 1, maior a similaridade entre as moléculas. Como o método emprega a diferença da matriz e do Tc, no *heatmap* quanto mais similares as moléculas, mais próximo o valor será de 0. Fonte: elaborada pela autora.

## 5 CONCLUSÃO

Para os compostos isoxazólicos e extratos naturais, nas concentrações testadas, nenhuma atividade inibitória significativa foi observada neste trabalho. Uma nova triagem poderia ser feita em concentrações maiores, empregando primeiramente um painel de isolados sensíveis para ampliar a avaliação de possíveis mecanismos sem o agravante da resistência. Entretanto, a atividade antibacteriana contra cepas sensíveis apresenta menor relevância e pode não justificar as etapas seguintes no desenvolvimento de novos antimicrobianos.

A triagem dos compostos do Pathogen Box<sup>®</sup> visou a investigação de novos alvos terapêuticos para compostos e fármacos já em uso ou em fase de desenvolvimento para outras finalidades, como uma forma de contornar a crítica situação da falta de novos antimicrobianos para combater bactérias multirresistentes atualmente. Foi demonstrada promissora atividade contra *S. aureus* da sutezolida (MMV688756), independente do mecanismo de resistência apresentado pela bactéria, com baixas CIM (0,78 – 100 µM), indicando possível segurança terapêutica.

O Pathogen Box<sup>®</sup> demonstrou ser uma excelente ferramenta *open source* que auxilia na pesquisa e investigação destas moléculas promissoras e pode ser um assistente nos estágios iniciais do reaproveitamento de medicamentos, assim como direcionamento de possíveis alvos em diferentes espécies com função semelhante. Esses resultados preliminares de atividade antibacteriana da sutezolida são promissores e podem embasar estudos adicionais *in vitro* e *in vivo*.

## 6 PERSPECTIVAS

Realização de ensaios de citotoxicidade em células de linhagem celular HepG2 dos compostos que apresentaram potencial atividade inibitória para isolados de *S. aureus* e *E. coli*.

Repetir os experimentos com mais réplicas e ampliar o painel de isolados bacterianos analisados após a chegada dos compostos.

Fazer testes de sinergismo entre os compostos e com antimicrobianos em busca de novos potenciais de ação para o tratamento de bactérias multirresistentes.

Investigar analogias estruturais entre os alvos de ação dos compostos que demonstraram ser mais promissores: MMV228911, sutezolida (MMV688756), MMV687700 e MMV687699, devido as baixas CIM, baixa citotoxicidade e altos índices de seletividade, utilizando softwares de docking molecular para realizar pesquisa em busca de novos sítios e mecanismos de ação destes possíveis ligantes, em conjunto com ferramentas de bioinformática para seleção de possíveis análogos de proteínas alvos para ação terapêutica

## REFERÊNCIAS

- AGER, Sally; GOULD, Kate. Clinical update on linezolid in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Infection and Drug Resistance**, p.87-102, jun. 2012.
- ALI, Junaid; RAFIQ, Qasim A.; RATCLIFFE, Elizabeth. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. **Future Science Oa**, v. 4, n. 4, FSO290 abr. 2018.
- ANDRADE-BAIOCCHI, Soraya et al. Endocarditis due to glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: case report and strain characterization. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, n. 2, p.149-152, fev. 2003.
- ARZANLOU, Mohsen; CHAI, Wern chern; VENTER, Henrietta. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 1, p.49-59, 3 mar. 2017.
- ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B.. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p.673-683, ago. 2004.
- BAĆMAGA, Małgorzata; KUCHARSKI, Jan; WYSZKOWSKA, Jadwiga. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 10, p. 1 – 15 7 set. 2015.
- BANO, Sameena et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of some substituted pyrazolines and isoxazolines as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p.96-103, maio 2015.
- BARTLETT, Dave W et al. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p.649-662, 2002.
- BEUTLER, John A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. **Current Protocols In Pharmacology**, v. 46, p. 9.11.1- 9.11.21, set. 2009.
- BEYZAEI, Hamid et al. Green multicomponent synthesis, antimicrobial and antioxidant evaluation of novel 5-amino-isoxazole-4-carbonitriles. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p.1-8, 15 nov. 2018.
- BHANDARI, Vasundhra et al. Identification of Anti-staphylococcal and Anti-biofilm Compounds by Repurposing the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p.1-20, 23 out. 2018.
- BIASI, Bruno de; GRAZZIOTIN, Neiva A.; HOFMANN JUNIOR, Arno E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p.582-585, jun. 2009.
- BIBEK G. C; SAHUKHAL, Gyan S.; ELASRI, Mohamed O.. Role of the msaABCR operon in cell wall biosynthesis, autolysis, integrity, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.1-10, 15 jul. 2019.

BLAIR, Jessica M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p.42-51, 1 dez. 2014.

CARB. Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. National action plan for combating antibiotic-resistant bacteria, Progress Report for Years 1 and 2. Outubro, 2017. Disponível em: <https://aspe.hhs.gov/system/files/pdf/258516/ProgressYears1and2CARBNationalActionPlan.pdf>. Acesso em: 10 de Maio 2018

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States**, 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acesso em: 10 Abr 2018

CHAN, Henry et al. The P-Type ATPase Superfamily. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 1-2, p.5-104, 2010.

CHANG, Qiuzhi et al. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 3, p.240-247, 2 ago. 2014.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Wayne, PA: CLSI: 2018. [28th ed. CLSI supplement M100]

COBAN, A.y. et al. The Resazurin Microplate Method for Rapid Detection of Vancomycin Resistance in Enterococci. **Journal of Chemotherapy**, v. 17, n. 4, p.361-366, ago. 2005.

COSTA, Jéssica Caroline Freitas da; HOSCHEID, Jaqueline. Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquoso e etanólico de folhas de *Cecropia pachystachya*. **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p.1-10, 2018.

DUFFY, Sandra et al. Screening the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box across Multiple Pathogens Reclassifies Starting Points for Open-Source Drug Discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, p. 1-22, 3 jul. 2017

ECHOLS, Roger M. A long and winding road; evolution of antimicrobial drug development – crisis management. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 11, p.1311-1319, nov. 2012.

ENDIMIANI, Andrea et al. Emergence of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* after Prolonged Treatment of Cystic Fibrosis Patients in Cleveland, Ohio. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p.1684-1692, 24 jan. 2011.

FEIGHNER, John. Mechanism of Action of Antidepressant Medications. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 60, suppl 4, p. 4-11, 1999

FERRERAS, Julian et al. Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. **Nature Chemical Biology**, v.1, n. 1, p.29-32, 24 maio 2005.

FLEMING, A. Nobel Lecture - NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf>. Acesso em: 15 ago 2019.

GARCÍA, Ana Belén et al. Correlation between resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus* and cell wall and septum thickening. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p.353-356, out. 2017.

GARDETE, Susana et al. Genetic Pathway in Acquisition and Loss of Vancomycin Resistance in a Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain of Clonal Type USA300. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 2, p. 1-16, 2 fev. 2012.

GREIN, Fabian; SCHNEIDER, Tanja; SAHL, Hans-georg. Docking on Lipid II—A Widespread Mechanism for Potent Bactericidal Activities of Antibiotic Peptides. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p.3520-3530, ago. 2019.

GUTIÉRREZ, Margarita et al. Synthetic isoxazole as antiplatelet agent. **Platelets**, v. 25, n. 4, p.234-238, 10 jul. 2013.

HEINZERLING L. Undue process at the FDA: antibiotics, animal feed, and the agency intransigence. **Vermont Law Review** v. 37, p.1007-1031, abr. 2013

HOWDEN, B. P. et al. Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p.99-139, 1 jan. 2010.

HOWDEN, Benjamin P. et al. Treatment Outcomes for Serious Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Vancomycin Susceptibility. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p.521-528, 15 fev. 2004.

HU, Qiwen; PENG, Huagang; RAO, Xiancai. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 13 out. 2016.

HU, Yanmin; LIU, Yingjun; COATES, Anthony. Azidothymidine Produces Synergistic Activity in Combination with Colistin against Antibiotic-Resistant enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p.1-10, 29 out. 2018.

HUANG, Y.-t. et al. Bacteremia and Infective Endocarditis Caused by a Non-Daptomycin-Susceptible, Vancomycin-Intermediate, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p.1132-1136, 16 jan. 2008.

ILANGO VAN, Andivelu et al. Discovery of 6,7-dihydro-3H-pyrano[4,3-c]isoxazol-3-ones as a new class of pathogen specific anti-leptospiral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p.29-40, jan. 2017.

ISLAM, Zahidul et al. Bacterial versus human thymidylate synthase: Kinetics and functionality. **Plos One**, v. 13, n. 5, p.1-9, 1 maio 2018.

KAPOOR, Garima; SAIGAL, Saurabh; ELONGAVAN, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p.300-305, 2017.

KARPIUK, I; TYSKI S. Looking for the new preparations for antibacterial therapy V. new antimicrobial agents from the oxazolidinones group in clinical trials. **Przegl Epidemiol**, v. 71 n. 2, p.207-219, 2017

KHAMENEH, Bahman et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p.1-15, 16 jul. 2019.

LAVANYA, G. et al. Synthesis and antimicrobial activity of (1,4-phenylene)bis(arylsulfonylpyrazoles and isoxazoles). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p.187-194, fev. 2014.

LEACH, Karen L. et al. The Site of Action of Oxazolidinone Antibiotics in Living Bacteria and in Human Mitochondria. **Molecular Cell**, v. 26, n. 3, p.393-402, maio 2007.

LI, J. W.; VEDERAS, J. C.. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?. **Science**, v. 325, n. 5937, p.161-165, 9 jul. 2009.

LIU, Yi-yun et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p.161-168, fev. 2016.

LOH, Belinda et al. Inhibition of HIV-1 Replication by Isoxazolidine and Isoxazole Sulfonamides. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 75, n. 5, p.461-474, 24 mar. 2010.

LUEPKE, Katherine H. et al. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societa Implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p.71-84, 27 dez. 2016.

MAGIORAKOS, A. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p.268-281, mar. 2012.

MARTIN, José G. Prado et al. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 2, p.93-98, 2013.

MARTYN, Derek C. et al. Antiplasmodial activity of piperazine sulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p.218-221, jan. 2010.

MCCALLUM, N. et al. In Vivo Survival of Teicoplanin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Fitness Cost of Teicoplanin Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p.2352-2360, 26 jun. 2006.

MI-ICHI, Fumika et al. A Flow Cytometry Method for Dissecting the Cell Differentiation Process of Entamoeba Encystation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 24 jul. 2018.

MMV. Medicines for Malaria Ventures: About the Pathogen Box. About the Pathogen Box. Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/about-pathogen-box>. Acesso em: 15 mar. 2019

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition**, p.481-511, 8 abr. 2016.

MUTNICK, Alan H. et al. Spectrum and potency evaluation of a new oxazolidinone, linezolid: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998–2000. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 1, p.65-73, maio 2002.

NAIDU, Kalaga Mahalakshmi et al. Seeking potent anti-tubercular agents: Design, synthesis, anti-tubercular activity and docking study of various ((triazoles/indole)-piperazin-1-yl/1,4-diazepan-1-yl)benzo[d]isoxazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 9, p. 2245-2250, maio 2016.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. **Trimethoprim**, CID=5578, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim>. Acesso em: 8 Set. 2019a

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Blast. **The Statistics of Sequence Similarity Scores**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tutorial/Altschul-1.html>. Acesso em: 10 Set. 2019b

NDIMIANI, Andrea et al. Emergence of Linezolid-Resistant Staphylococcus aureus after Prolonged Treatment of Cystic Fibrosis Patients in Cleveland, Ohio. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p.1684-1692, 24 jan. 2011

NELSON, R. Intrinsically vancomycin-resistant Gram-positive organisms: clinical relevance and implications for infection control. **Journal of Hospital Infection**, v. 42, n. 4, p.275-282, ago. 1999.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p.461-477, mar. 2007.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.; SNADER, Kenneth M.. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p.1022-1037, jul. 2003.

NIAID. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. **NIAID's antibacterial resistance program: current status and future directions**. 2014. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/arstrategicplan2014.pdf>. Acesso em: 25 jun 2019.

NIH. U.S. National Library of Medicine. Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Sutezolid. Identifier: NCT03199313. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03199313>. Acesso em: 21 ago 2019

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p.382-388, 15 abr. 1994.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections Globally: Final report and recommendations. **The Review on Antimicrobial Resistance**. mai, 2016. Disponível em: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf). Acesso em: 25 mar 2018.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p.1-1, 12 jun. 2003.

OLIPHANT, Catherine M.; EROSCHENKO, Kathryn. Antibiotic Resistance, Part 1: Gram-positive Pathogens. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 11, n. 1, p.70-78, jan. 2015.

OTTO, Robin G. et al. An alternative strategy for combination therapy: Interactions between polymyxin B and non-antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 1, p.34-39, jan. 2019.

PAGADALA, Nataraj S.; SYED, Khajamohiddin; TUSZYNSKI, Jack. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p.91-102, 16 jan. 2017.

PALOMINO, J.C. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p.2720-2722, 1 ago. 2002.

PAYNE, David J. et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p.29-40, 8 dez. 2006.

PETHE, Kevin et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 9, p.1157-1160, 4 ago. 2013

PEW. The Pew Charitable Trusts: Antibiotics Currently in Global Clinical Development. Atualizado em Setembro, 2019. Disponível em: [https://www.pewtrusts.org/-/media/assets/2019/08/arp\\_antibiotics\\_currently\\_in\\_global\\_clinical\\_development\\_data\\_table\\_v2.pdf](https://www.pewtrusts.org/-/media/assets/2019/08/arp_antibiotics_currently_in_global_clinical_development_data_table_v2.pdf). Acesso em: 11 Setembro 2019.

PEYCLIT, Lucie; BARON, Sophie Alexandra; ROLAIN, Jean-marc. Drug Repurposing to Fight Colistin and Carbapenem-Resistant Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1-11, 11 jun. 2019.

POPOV, Veljko M. et al. Analysis of complexes of inhibitors with *Cryptosporidium hominis* DHFR leads to a new trimethoprim derivative. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 16, p.4366-4370, ago. 2006

POREBA, K. et al. Synthesis and antibacterial activity of new sulfonamide isoxazolo[5,4-b]pyridine derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 72 n. 4, p.727-735, 2015

POZZI, Cecilia et al. Targeting Methyltransferases in Human Pathogenic Bacteria: Insights into Thymidylate Synthase (TS) and Flavin-Dependent TS (FDTS). **Molecules**, v. 24, n. 8, p.1638-1711, 25 abr. 2019.

PROJAN, S.J.; SHLAES, D.M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here?. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p.18-22, 2004.

PUBCHEM. ISOXAZOLE. Disponível em:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9254#section=Top>. Acesso em: 03 mai. 2018.

PUSHPAKOM, Sudeep et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p.41-58, 12 out. 2018.

RANDALL, Christopher P. et al. The Target of Daptomycin Is Absent from Escherichia coli and Other Gram-Negative Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 637-639, 31 out. 2012.

ROPÓN-PALACIOS, Georcki et al. Potential novel inhibitors against emerging zoonotic pathogen Nipah virus: a virtual screening and molecular dynamics approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p.1-10, 22 ago. 2019.

ROSA, Rafael da et al. Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against Trypanosoma cruzi and Leishmania amazonensis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p.25-35, mar. 2017.

ROSS, J.E. et al. Eight-year (2002-2009) Summary of the Linezolid (Zyvox® Annual Appraisal of potency and Spectrum; ZAAPS) Program in European Countries. **Journal of Chemotherapy**, v. 23, n. 2, p.71-76, abr. 2011.

ROSS, Leila Saxby et al. Identification of Collateral Sensitivity to Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors in Plasmodium falciparum. **Acs Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p.508-515, 16 jan. 2018.

SHAW, Karen Joy; BARBACHYN, Michael R.. The oxazolidinones: past, present, and future. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1241, n. 1, p.48-70, dez. 2011.

SHLAES, David M. et al. The FDA Reboot of Antibiotic Development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p.4605-4607, 29 jul. 2013.

SINGH, Sheo B.; BARRETT, John F.. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p.1006-1015, mar. 2006.

SOUZA, D.O. et. al.; Antibacterial and modulatory activity of Cecropia pachystachya Trécul on the action of aminoglycosides. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.19, n. 3, p. 121-132, set. 2014

SOWMYA, D.v. et al. Green approach for the synthesis of thiophenyl pyrazoles and isoxazoles by adopting 1,3-dipolar cycloaddition methodology and their antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p.891-898, jan. 2018.

SPELLMAN, Natalie Jane; KIRK, Kiaran. The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p.149-162, dez. 2015.

SUN, Wei et al. Rapid antimicrobial susceptibility test for identification of new therapeutics and drug combinations against multidrug-resistant bacteria. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 1, jan. 2016.

TANGALLAPALLY, Rajendra P. et al. Discovery of novel isoxanzolines as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 23, p.6638-6642, dez. 2007.

TENOVER, Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p.S3-S10, jun. 2006.

TIETGEN, Manuela et al. Impact of the colistin resistance gene *mcr-1* on bacterial fitness. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 4, p.554-561, abr. 2018.

TOUGAN, Takahiro et al. Application of the automated haematology analyzer XN-30 for discovery and development of anti-malarial drugs. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, 14 jan 2019.

UNIPROT. UniProtKB - P0ABQ4 (DYR\_ECOLI). **Dihydrofolate reductase**, Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P0ABQ4> Acesso em: 8 Set. 2019

VAN HOEK, Angela H. A. M. et al. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, art. 203. p.1-27, 2011.

VEALE, Clinton G. L. Unpacking the Pathogen Box—An Open Source Tool for Fighting Neglected Tropical Disease. **Chemmedchem**, v. 14, n. 4, p.386-453, 30 jan. 2019.

VENTOLA, L. The antibiotic resistant crisis. **P&T**. v. 40, n. 4, p. 277–283 abr. 2015

WALLIS, Robert S. et al. Biomarker-Assisted Dose Selection for Safety and Efficacy in Early Development of PNU-100480 for Tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p.567-574, 15 nov. 2010a.

WALLIS, Robert S. et al. Mycobactericidal Activity of Sutezolid (PNU-100480) in Sputum (EBA) and Blood (WBA) of Patients with Pulmonary Tuberculosis. **Plos One**, v. 9, n. 4, p.1-10, 14 abr. 2014

WALLIS, Robert S. et al. Pharmacokinetics and Whole-Blood Bactericidal Activity against Mycobacterium tuberculosis of Single Doses of PNU-100480 in Healthy Volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 5, p.745-751, set. 2010b

WATKINS, Richard R.; BONOMO, Robert A. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p.313-322, jun. 2016.

WHO. World Health Organization. Antimicrobial Resistance. Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>. Acesso em: 28 de abril 2018

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014**. 2014a. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf;jsessionid=2FB2C240979FCA1EB877D7E3C0108684?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=2FB2C240979FCA1EB877D7E3C0108684?sequence=1). Acesso em: 20 de abril 2018

WHO. World Health Organization. **Exploiting the Pathogen Box: an international open source collaboration to accelerate drug development in addressing diseases of poverty Medicines for Malaria Venture (MMV)**. 2014b Disponível em: [https://www.who.int/phi/implementation/MMV\\_documents.pdf?ua=1](https://www.who.int/phi/implementation/MMV_documents.pdf?ua=1). Acesso em: 10 de Março 2019

WHO. World Health Organization. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. 2017 Disponível em: [https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/PPLreport\\_2017\\_09\\_19.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1). Acesso em: 21 de Março 2018

WILSON, D. N. et al. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36, p.13339-13344, 29 ago. 2008

WONG, Weng ruh; OLIVER, Allen g.; LININGTON, Roger g. Development of Antibiotic Activity Profile Screening for the Classification and Discovery of Natural Product Antibiotics. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 11, p.1483-1495, nov. 2012.

YATIME, Laure et al. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, v. 1787, n. 4, p.207-220, abr. 2009.

YOUNIS, Waleed; THANGAMANI, Shankar; SELEEM, Mohamed. Repurposing Non-Antimicrobial Drugs and Clinical Molecules to Treat Bacterial Infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 28, p.4106-4111, 22 set. 2015.

ZHANG, Ming et al. In Vitro and In Vivo Activities of Three Oxazolidinones against Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p.3217-3223, 24 mar. 2014

ZHENG, Wei; SUN, Wei; SIMEONOV, Anton. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 2, p.181-191, 9 jul. 2017.

ZHOU, Chunyi et al. Urease is an essential component of the acid response network of Staphylococcus aureus and is required for a persistent murine kidney infection. **Plos Pathogens** v. 15, n. 1, 4 jan. 2019.

ZHOU, Yonglin et al. Pterostilbene, a Potential MCR-1 Inhibitor That Enhances the Efficacy of Polymyxin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p.1-10, 16 jan. 2018.

ZHU, Tong et al. Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis of the Bactericidal Activities of Sutezolid (PNU-100480) and Its Major Metabolite against Intracellular Mycobacterium tuberculosis in Ex Vivo Whole-Blood Cultures of Patients with Pulmonary Tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p.3306-3311, 31 mar. 2014.

## APÊNDICE A - Triagem de isoxazóis e extratos naturais

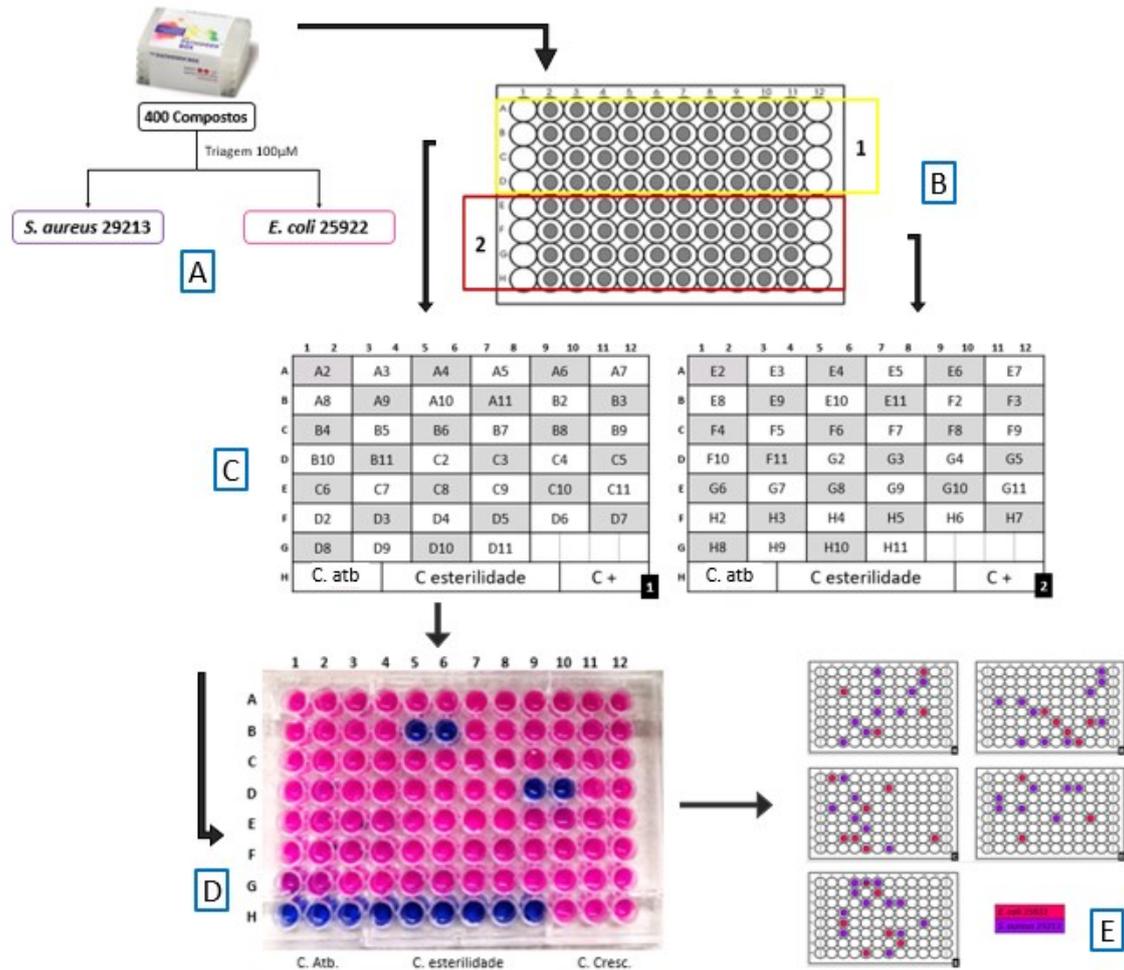
Esquema representativo da triagem de atividade antibacteriana dos compostos isoxazólicos e extratos naturais

		Composto 1	Composto 2	Composto 3	Composto 4	Composto 5	Composto 6	Composto 7	Composto 8	9	C. Atb.	C+ Cresc.	C- Meio
		1	2	3	4	5	6	7	8		10	11	12
Isolado 1	A												
	B												
Isolado 2	C												
	D												
Isolado 3	E												
	F												
Isolado 4	G												
	H												

O experimento foi organizado de modo que, os compostos/extratos foram distribuídos entre as colunas 1-8, e as cepas a cada duas fileiras ex: fileiras A-B cepa 1. Cada composto/extrato ocupa uma coluna inteira. Na coluna 1, temos o composto/extrato 1, onde a cada 2 fileiras têm-se a duplicata contra uma diferente cepa. 1A-B= duplicata cepa 1, 1C-D= duplicata cepa 2, e assim sucessivamente. C+ cresc. = controle de crescimento bacteriano, C. atb= controle de inibição do crescimento pelo antimicrobiano, C. meio= controle de esterilidade do meio de cultura, isolado = duplicata biológica de cada uma das cepas. Fonte: Elaborado pela autora.

## APÊNDICE B – Pathogen Box

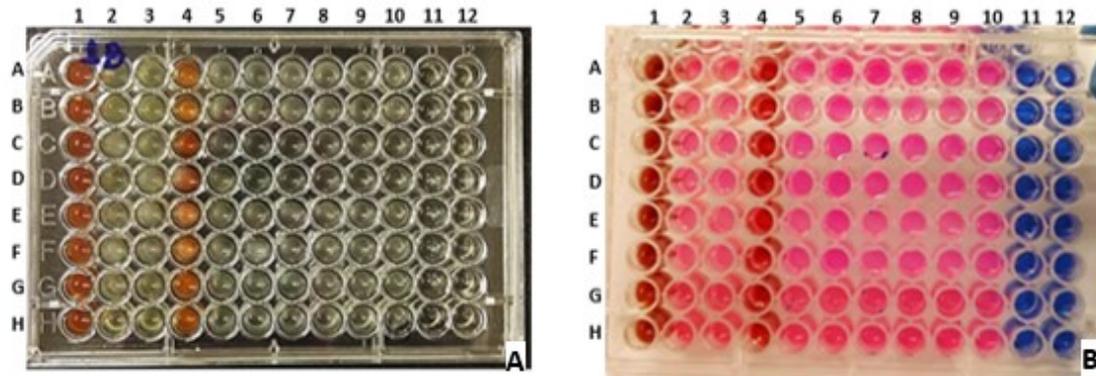
Esquema representativo da organização da triagem dos compostos fornecidos pelo Pathogen Box®.



**A:** 400 compostos do Pathogen Box foram triados para as cepas *S. aureus* 29213 e *E. coli* 25922 **B:** cada placa do Pbox foi dividida em duas para realizar a triagem em duplicata, cada uma com 40 compostos. **C:** Microplaca 1: compostos A2-D11; Microplaca 2: 40 compostos E2-H11. **D:** Placa D2 do isolado *E. coli* 25922<sup>TM</sup> (1), contém 40 compostos da placa D do Pathogen Box® (compostos E2-H11). Os compostos estão distribuídos em duplicatas lineares nas fileiras A-G e colunas 1-12; na fileira H temos os controles: H1-3 = controle de inibição do crescimento pelo antimicrobiano; H4-9 = controle de esterilidade do meio de cultura; H10-12 = controle de crescimento bacteriano. Ensaio de resazurina após 4 horas de reação, onde é possível verificar os compostos que apresentaram inibitória para este isolado, as duplicatas na cor azul (B5-6; D9-10). **E:** Esquema visual representativo das 5 microplacas do Pathogen Box® com os compostos que apresentaram atividade inibitória na triagem 100µM para as cepas *S. aureus* 29213 (lilás – 44 compostos) e *E. coli* 25922 (rosa – 25 compostos).  
Fonte: Elaborado pela autora

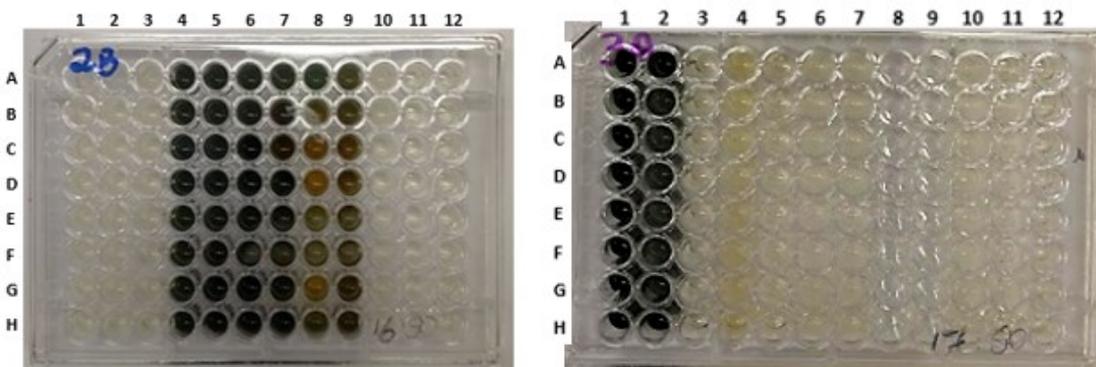
### APÊNDICE C – Ensaio de extratos naturais com interferência de coloração

C1 - Microplaca demonstrativa da interferência da coloração dos extratos na leitura visual e no ensaio da resazurina.



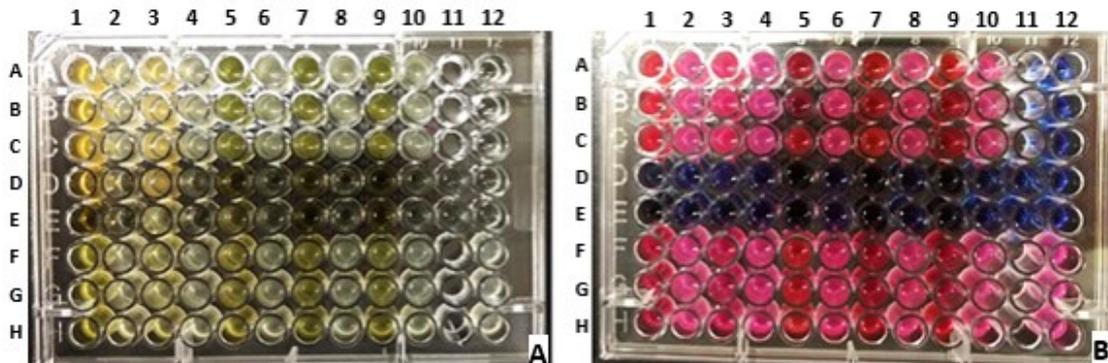
Microplaca com os extratos coloridos 1 e 4 representados na leitura visual de crescimento por turvação e no ensaio com resazurina. **A:** presença de turvação e interferente colorimétrico dos extratos (coluna 1= extrato 1; coluna 4= extrato 4) com alteração de cor. **B:** revelação com resazurina: Os controles do ensaio estão organizados nas colunas 10 – 12. Na coluna 10 (controle positivo de crescimento) apresenta turvação e coloração rosa fluorescente que evidencia viabilidade das células bacterianas. Nas colunas 11 (controle de inibição com antibiótico) e 12 (controle de esterilidade do meio) não houve turvação e após adição da resazurina os poços ficaram azuis, indicando que os isolados não conseguiram se reproduzir. Fonte: Elaborado pela autora.

C2 - Microplacas representativas dos extratos coloridos



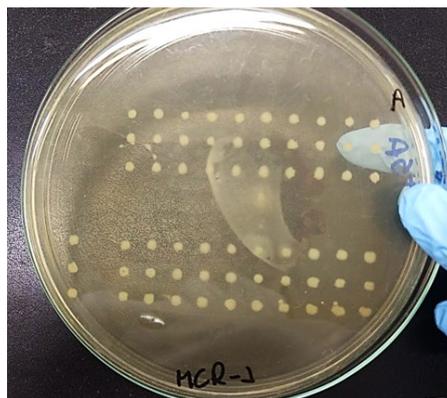
Microplacas 2B e 3A com os extratos coloridos representados. Figura 16A: Microplaca 2B, onde tem-se: colunas 4 – 9 = extratos 13 a 18 respectivamente; Figura 16B: Microplaca 3A, onde: coluna 1= extrato 19; coluna 2= extrato 20. Fonte: elaborado pela autora.

C3 - Leitura visual da turvação e com resazurina das microplacas após diluição dos extratos escuros.



Microplaca de diluição dos extratos coloridos *E. coli* MCR-1. Esquema representativo de uma microplaca dividida em duas partes, nas fileiras A, B e C tem-se as triplicatas biológicas para as duas diluições dos extratos 1 a 15 (colunas 1 a 10), na fileira D tem-se os extratos puros dos extratos e diluições correspondentes as respectivas colunas (ex. D-3 = extrato 4 puro na concentração 2 mg/mL); nas fileiras F, G e H tem-se as triplicatas biológicas para as duas diluições dos extratos 16 a 20 (colunas 1 a 10) na fileira E tem-se os extratos puros dos extratos e diluições correspondentes as respectivas colunas (ex. E-8 = extrato 19 puro na concentração 200 ug/mL) CP= extrato puro sem adição de inóculo bacteriano; a = diluição 2 mg/mL b = diluição 200 ug/mL; C. Cresc.= controle de crescimento bacteriano; C. Atb= controle de inibição do crescimento pelo antimicrobiano; C. meio= controle de esterilidade do meio de cultura, Triplicata= triplicata biológica de cada um dos isolados. **A:** leitura visual de crescimento por presença de turvação **B:** revelação com resazurina. Fonte: Elaborado pela autora

C4 – Placa representativa do ensaio realizado para confirmar ausência de atividade inibitória ou possível interferência da precipitação dos extratos naturais na leitura dos resultados de turvação.



Repique realizado com auxílio de um repicador para placa com meio Mueller-Hinton. A microplaca de extratos diluídos representada foi avaliada contra a cepa MCR-1, onde é possível ver que todas as triplicatas cresceram como na microplaca, o controle do meio e de inibição por antimicrobiano foram inibidos e o controle positivo cresceu como as triplicatas. Fonte: Elaborado pela autora

## ANEXO 1 – Compostos contidos no Pathogen Box

PLACA	POSIÇÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
A	A02	MMV010764	Malária		320,44	C14H16N4OS2
A	A03	MMV688472	Toxoplasmose		393,82	C21H16N3O3Cl
A	A04	MMV688416	Dengue		456,99	C23H25N4O2ClS
A	A05	MMV689758	Composto Referência	Bedaquilina	669,55	C32H31N2O2Br
A	A06	MMV688796	Cinetoplastídeos		354,38	C19H19N4O2F
A	A07	MMV676526	Tuberculose		385,82	C21H17NO3ClF
A	A08	MMV688553	Tuberculose		343,38	C18H21N3O4
A	A09	MMV676501	Tuberculose		346,21	C11H5N3O2Cl2S2
A	A10	MMV676449	Tuberculose		344,84	C19H21N2O2Cl
A	A11	MMV676412	Tuberculose		344,77	C16H9N2O3ClS
A	B02	MMV1110498	Wolbachia		327,31	C15H16N3O2F3
A	B03	MMV000907	Malária		457,28	C11H13N5O
A	B04	MMV688889	Tuberculose		349,82	C19H16N5Cl
A	B05	MMV688776	Cinetoplastídeos		313,78	C17H16N3OCl
A	B06	MMV688934	Cinetoplastídeos	Tolfenpirad	383,87	C21H22N3O2Cl
A	B07	MMV676389	Tuberculose		368,43	C20H24N4O3
A	B08	MMV676603	Tuberculose		431,39	C17H16N3O5F3S
A	B09	MMV676401	Tuberculose		308,38	C18H20N4O
A	B10	MMV102872	Tuberculose		367,71	C16H9N3O2ClF3
A	B11	MMV676477	Tuberculose		383,47	C19H21N5O2S
A	C02	MMV084603	Malária		377,51	C22H23N3OS
A	C03	MMV688548	Toxoplasmose		267,33	C15H17N5
A	C04	MMV688888	Tuberculose		349,40	C20H20N5F
A	C05	MMV690028	Cinetoplastídeos		546,66	C30H38N6O4
A	C06	MMV688943	Cinetoplastídeos	Difenoconazol	406,26	C19H17N3O3Cl2
A	C07	MMV053220	Tuberculose		252,27	C15H12N2O2
A	C08	MMV676584	Tuberculose		314,79	C12H8N2OCIF5S2
A	C09	MMV676439	Tuberculose		302,82	C16H15N2ClS
A	C10	MMV676395	Tuberculose		307,30	C17H13N3O3
A	C11	MMV676379	Tuberculose		321,17	C15H13O3Br
A	D02	MMV687762	Cinetoplastídeos		320,39	C20H20N2O2
A	D03	MMV1028806	Malária		339,39	C18H14N3OFS
A	D04	MMV661713	Tuberculose		435,33	C21H19N6Br
A	D05	MMV688793	Cinetoplastídeos		337,37	C19H19N3O3
A	D06	MMV688942	Cinetoplastídeos	Bitertanol	337,42	C20H23N3O2
A	D07	MMV688554	Tuberculose		321,39	C15H19N3O3S
A	D08	MMV676555	Tuberculose		283,76	C16H14N3Cl
A	D09	MMV676383	Tuberculose		319,40	C14H13N3O2S2
A	D10	MMV676444	Tuberculose		345,44	C19H27N3O3
A	D11	MMV676409	Tuberculose		329,35	C16H12N3O2FS
A	E02	MMV688514	Cinetoplastídeos		263,29	C16H13N3O
A	E03	MMV676350	Malária		345,85	C17H16N3OCIS
A	E04	MMV553002	Tuberculose		239,25	C10H9NO4S
A	E05	MMV688797	Cinetoplastídeos		331,38	C18H22N3O2F
A	E06	MMV688756	Tuberculose	Sutezolida	353,41	C16H20N3O3FS
A	E07	MMV090930	Tuberculose		375,42	C16H13N3O4S2

PLACA	POSIÇÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
A	E08	MMV676431	Tuberculose		317,77	C17H16N03Cl
A	E09	MMV676571	Tuberculose		433,43	C24H20N3O4F
A	E10	MMV676445	Tuberculose		281,35	C17H19N3O
A	E11	MMV676589	Tuberculose		365,43	C21H23N3O3
A	F02	MMV026020	Malária		420,49	C23H20N2O4S
A	F03	MMV688471	Toxoplasmose		343,38	C21H17N3O2
A	F04	MMV676388	Tuberculose		330,36	C15H14N4O3S
A	F05	MMV202553	Cinetoplastídeos		269,30	C15H15N3O2
A	F06	MMV688936	Tuberculose		386,86	C18H15N4O2ClS
A	F07	MMV676476	Tuberculose		380,43	C23H24O5
A	F08	MMV676377	Tuberculose		318,13	C13H8N3O2Br
A	F09	MMV676406	Tuberculose		475,61	C26H29N5O2S
A	F10	MMV676461	Tuberculose		357,43	C18H19N3O3S
A	F11	MMV676509	Tuberculose		376,84	C22H17N2O2Cl
A	G02	MMV688470	Toxoplasmose		464,58	C24H28N6O2S
A	G03	MMV688704	Toxoplasmose		391,29	C19H20N4OCl2
A	G04	MMV188296	Cinetoplastídeos		312,34	C18H17N2O2F
A	G05	MMV688958	Cinetoplastídeos		308,40	C18H16N2OS
A	G06	MMV063404	Tuberculose		345,87	C19H24N3OCl
A	G07	MMV676558	Tuberculose		371,45	C22H17N3OS
A	G08	MMV688555	Tuberculose		339,84	C15H18N3O2ClS
A	G09	MMV676597	Tuberculose		343,42	C18H25N5O2
A	G10	MMV676588	Tuberculose		258,38	C15H18N2S
A	G11	MMV676554	Tuberculose		335,36	C19H17N3O3
A	H02	MMV688350	Dengue		465,50	C24H20N3O4FS
A	H03	MMV688360	Cinetoplastídeos		421,53	C25H31N3O3
A	H04	MMV099637	Cinetoplastídeos		297,33	C17H16N3OF
A	H05	MMV688798	Cinetoplastídeos		365,45	C21H19N03S
A	H06	MMV676539	Tuberculose		332,35	C20H16N2O3
A	H07	MMV202458	Tuberculose		319,79	C17H18N03Cl
A	H08	MMV676474	Tuberculose		336,43	C21H24N2O2
A	H09	MMV461553	Tuberculose		419,37	C18H14N03F5S
A	H10	MMV676520	Tuberculose		364,39	C21H20N2O4
A	H11	MMV676512	Tuberculose		347,39	C18H13N5OS
B	A02	MMV676480	Oncocercose		474,53	C26H22N2O5S
B	A03	MMV652003	Cinetoplastídeos		321,06	C15H11N03BF3
B	A04	MMV000062	Composto Referência	Pentamidina	592,69	C19H24N4O2
B	A05	MMV006372	Malária		269,35	C15H19N5
B	A06	MMV688854	Criptosporidíase		452,98	C24H28N6O
B	A07	MMV011903	Malária		374,40	C20H18N6O2
B	A08	MMV020591	Malária		385,47	C24H23N3O2
B	A09	MMV020623	Malária		414,51	C25H26N4O2
B	A10	MMV020512	Malária		415,49	C25H25N3O3
B	A11	MMV688761	Esquistossomose		461,51	C20H19N3O6S2
B	B02	MMV012074	Tuberculose		299,76	C16H14N3OCl
B	B03	MMV676604	Cinetoplastídeos		371,46	C18H21N5O2S
B	B04	MMV002529	Composto Referência	Praziquantel	312,41	C19H24N2O2

PLACA	POSICÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
B	B05	MMV687776	Filariose Linfática		609,20	C28H23N2O4BCI2F4
B	B06	MMV687800	Composto Referência	Clofazimina	473,40	C27H22N4Cl2
B	B07	MMV020982	Malária		374,44	C22H22N4O2
B	B08	MMV020120	Malária		354,54	C23H34N2O
B	B09	MMV676605	Malária		421,49	C26H23N5O
B	B10	MMV007638	Malária		416,52	C20H20N2O4S2
B	B11	MMV021057	Malária	Azoxistrobina	403,39	C22H17N3O5
B	C02	MMV690027	Cinetoplastídeos		584,71	C33H40N6O4
B	C03	MMV676600	Cinetoplastídeos		474,55	C26H30N6O3
B	C04	MMV676382	Esquistossomose		377,44	C20H23N7O
B	C05	MMV001625	Composto Referência		236,60	C6H12N2O2F2
B	C06	MMV001493	Oncocercose		371,39	C19H21N3O5
B	C07	MMV020136	Malária		366,46	C15H18N4O3S2
B	C08	MMV020710	Malária		399,84	C19H18N5O3Cl
B	C09	MMV020517	Malária		364,45	C21H24N4O2
B	C10	MMV019721	Malária		437,97	C19H20N3O3ClS2
B	C11	MMV688763	Esquistossomose		351,83	C13H10N5OCIS2
B	D02	MMV020537	Malária		334,82	C16H15N2O2ClS
B	D03	MMV637953	Composto Referência	Suramina	1435,28	C51H40N6O23S6
B	D04	MMV676536	Esquistossomose		373,49	C18H19N3O2S2
B	D05	MMV000063	Composto Referência	Sitamaquine	515,71	C21H33N3O
B	D06	MMV689255	Criptosporidíase	D-Eritadenine	253,21	C9H11N5O4
B	D07	MMV019838	Malária		412,29	C18H10N4OF6
B	D08	MMV020520	Malária		417,51	C25H27N3O3
B	D09	MMV019234	Malária		382,44	C20H18N2O4S
B	D10	MMV016136	Malária		349,82	C19H16N5Cl
B	D11	MMV688762	Esquistossomose		353,46	C24H23N3
B	E02	MMV676386	Tuberculose		335,36	C19H17N3O3
B	E03	MMV688773	Composto Referência	Benznidazol	260,25	C12H12N4O3
B	E04	MMV000011	Composto Referência	Doxicilina	480,90	C22H24N2O8
B	E05	MMV687775	Filariose Linfática		462,03	C19H14NO3BCI2F4
B	E06	MMV002817	Oncocercose	Iodoquinol	396,95	C9H5NOI2
B	E07	MMV676442	Malária		415,53	C25H29N5O
B	E08	MMV020152	Malária		278,31	C17H14N2O2
B	E09	MMV024397	Malária		335,45	C21H25N3O
B	E10	MMV019807	Malária		323,78	C18H14N3OCl
B	E11	MMV560185	Malária		289,38	C19H19N3
B	F02	MMV019189	Malária		309,39	C17H15N3OS
B	F03	MMV688774	Composto Referência	Posaconazol	700,78	C37H42N8O4F2
B	F04	MMV003270	Ancilostomíase	Zoxazolamina	168,58	C7H5N2OCl
B	F05	MMV637229	Tricuríase	Clemastine	459,97	C21H26NOCl
B	F06	MMV688853	Criptosporidíase		389,88	C19H23N5O2
B	F07	MMV020321	Malária		386,80	C18H18N2O2ClF3
B	F08	MMV019087	Malária		420,39	C19H19N6O2F3
B	F09	MMV676528	Malária		433,88	C20H17N3O3ClFS
B	F10	MMV020320	Malária		359,39	C20H17N5O2
B	F11	MMV085210	Malária		445,97	C22H24N3O3ClS

PLACA	POSIÇÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
B	G02	MMV069458	Tuberculose		222,56	C6H2N4ClF3
B	G03	MMV688991	Composto Referência	Nitazoxanida	307,28	C12H9N3O5S
B	G04	MMV687801	Composto Referência	Etambutol	277,23	C10H24N2O2
B	G05	MMV689480	Composto Referência	Buparvaquona	326,43	C21H26O3
B	G06	MMV003152	Composto Referência	Mebendazol	295,30	C16H13N3O3
B	G07	MMV006239	Malária		368,24	C18H14N3OBr
B	G08	MMV000858	Malária		399,92	C16H18N3O3ClS2
B	G09	MMV006741	Malária		378,48	C22H26N4O2
B	G10	MMV688768	Esquistossomose		325,47	C19H23N3S
B	G11	MMV000023	Composto Referência	Primaquina	455,35	C15H21N3O
B	H02	MMV676602	Cinetoplastídeos		460,57	C25H32N8O
B	H03	MMV000016	Composto Referência	Mefloquina	414,78	C17H16N2OF6
B	H04	MMV687803	Composto Referência	Linezolida	337,35	C16H20N3O4F
B	H05	MMV668727	Oncocercose		384,28	C17H10N4F6
B	H06	MMV019742	Malária		410,50	C21H22N4O3S
B	H07	MMV009054	Malária		351,19	C15H12N4O2Cl2
B	H08	MMV006901	Malária		306,37	C18H18N4O
B	H09	MMV020391	Malária		394,92	C19H23N2O3ClS
B	H10	MMV676380	Malária		370,79	C18H15N4O3Cl
B	H11	MMV688994	Composto Referência	Estreptomicina	725,50	C21H39N7O12
C	A02	MMV675997	Cinetoplastídeos		424,51	C24H29N4O2F
C	A03	MMV676204	Oncocercose		334,39	C21H19N2OF
C	A04	MMV687239	Tuberculose		341,35	C19H17N3OF2
C	A05	MMV688122	Tuberculose		320,37	C16H12N6S
C	A06	MMV688852	Toxoplasmose		333,79	C16H17N5ClF
C	A07	MMV687145	Tuberculose		267,35	C12H17N3O2S
C	A08	MMV688327	Tuberculose	Radezolida	474,91	C22H23N6O3F
C	A09	MMV008439	Malária		384,52	C23H32N2O3
C	A10	MMV595321	Cinetoplastídeos		458,54	C21H26N6O4S
C	A11	MMV687747	Tuberculose		385,25	C19H17N2O2Br
C	B02	MMV020388	Malária		365,90	C19H28N3O2Cl
C	B03	MMV688547	Cinetoplastídeos		613,47	C21H21N7O
C	B04	MMV688466	Tuberculose		502,00	C24H24N5O2FS
C	B05	MMV687749	Tuberculose		448,95	C24H24N6O
C	B06	MMV688846	Tuberculose		383,84	C20H21NOCIF3
C	B07	MMV054312	Tuberculose		240,31	C15H16N2O
C	B08	MMV689060	Cinetoplastídeos		313,23	C14H18N4Cl2
C	B09	MMV689061	Cinetoplastídeos		422,50	C24H27N4O2F
C	B10	MMV689028	Cinetoplastídeos		474,57	C26H26N4O3S
C	B11	MMV688371	Cinetoplastídeos		449,76	C22H19N2O2Cl3
C	C02	MMV688508	Tuberculose		358,36	C19H19N2O4F
C	C03	MMV688283	Cinetoplastídeos		495,00	C24H23N6O2ClS
C	C04	MMV687243	Tuberculose		336,18	C15H14N3O3Br
C	C05	MMV687730	Tuberculose		384,52	C22H32N4O2
C	C06	MMV687251	Tuberculose		275,30	C8H9N3O4S2
C	C07	MMV687254	Tuberculose		305,37	C19H19N3O
C	C08	MMV688509	Toxoplasmose		455,52	C28H26N3O2F

PLACA	POSIÇÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
C	C09	MMV688361	Cinetoplastídeos		357,41	C21H19N5O
C	C10	MMV689029	Cinetoplastídeos		490,57	C26H26N4O4S
C	C11	MMV022236	Malária		439,48	C21H28N5O2F3
C	D02	MMV688410	Cinetoplastídeos		384,90	C21H25N4OCl
C	D03	MMV676048	Cinetoplastídeos		325,23	C16H18N2OCl2
C	D04	MMV687703	Tuberculose		377,48	C22H27N5O
C	D05	MMV687248	Tuberculose		320,32	C18H13N4OF
C	D06	MMV688125	Tuberculose		427,60	C24H33N3O2S
C	D07	MMV687188	Tuberculose		352,38	C20H20N2O4
C	D08	MMV690103	Cinetoplastídeos		349,43	C19H23N7
C	D09	MMV688124	Tuberculose		443,65	C25H37N3O2S
C	D10	MMV688845	Tuberculose		435,54	C24H25N3O3S
C	D11	MMV1030799	Malária		330,39	C20H18N4O
C	E02	MMV675994	Criptosporidíase		336,78	C18H13N4OCl
C	E03	MMV676057	Cinetoplastídeos		420,50	C24H28N4O3
C	E04	MMV687699	Tuberculose		388,17	C16H10N3OCl2F3
C	E05	MMV687146	Tuberculose		298,42	C19H26N2O
C	E06	MMV687696	Tuberculose		557,01	C29H28N4O2ClF3
C	E07	MMV687170	Tuberculose		340,76	C17H13N4O2Cl
C	E08	MMV690102	Cinetoplastídeos		417,46	C22H23N7O2
C	E09	MMV689709	Cinetoplastídeos		351,40	C19H21N5O2
C	E10	MMV021375	Malária		280,37	C17H20N4
C	E11	MMV1029203	Malária		375,45	C20H17N5OS
C	F02	MMV676053	Criptosporidíase		357,79	C18H16N3O3Cl
C	F03	MMV688179	Cinetoplastídeos		476,19	C18H16N6OCl2
C	F04	MMV023969	Tuberculose		453,01	C24H24N4OS
C	F05	MMV687138	Tuberculose		339,41	C19H17N3O3S
C	F06	MMV688262	Tuberculose	Delamanida	534,48	C25H25N4O6F3
C	F07	MMV687189	Tuberculose		336,38	C20H20N2O3
C	F08	MMV687807	Tuberculose		383,67	C15H8NO2ClF6
C	F09	MMV676478	Tuberculose		435,58	C24H29N5OS
C	F10	MMV062221	Malária		279,35	C16H17N5
C	F11	MMV688921	Dengue		451,86	C23H18N3O5Cl
C	G02	MMV676191	Criptosporidíase		244,29	C15H16O3
C	G03	MMV675993	Criptosporidíase		313,35	C16H19N5O2
C	G04	MMV021660	Tuberculose		425,90	C20H21N6Cl
C	G05	MMV688417	Toxoplasmose		326,78	C16H15N6Cl
C	G06	MMV687273	Tuberculose		330,55	C22H38N2
C	G07	MMV687180	Tuberculose		458,48	C24H25N4O2F3
C	G08	MMV1088520	Malária		327,45	C18H21N3OS
C	G09	MMV688891	Tuberculose		442,18	C18H11NO4BrF3
C	G10	MMV023370	Malária		311,74	C14H10N7Cl
C	G11	MMV688703	Toxoplasmose		335,42	C21H22N3F
C	H02	MMV675969	Oncocercose		340,46	C21H28N2O2
C	H03	MMV688313	Esquistossomose		373,45	C23H23N3O2
C	H04	MMV687172	Tuberculose		387,48	C23H25N5O
C	H05	MMV688844	Tuberculose		424,92	C23H25N4O2Cl

PLACA	POSIÇÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
C	H06	MMV1198433	Esquistossomose		339,39	C19H21N3O3
C	H07	MMV024311	Tuberculose		364,32	C19H21N3
C	H08	MMV1019989	Malária		328,46	C18H28N6
C	H09	MMV1037162	Malária		355,46	C18H21N5OS
C	H10	MMV689437	Cinetoplastídeos		364,23	C15H15N7Cl2
C	H11	MMV688955	Toxoplasmose		334,71	C15H11N2O5Cl
D	A02	MMV026468	Malária		310,78	C18H15N2OCl
D	A03	MMV020670	Malária		387,44	C22H21N5O2
D	A04	MMV023953	Malária		400,53	C25H28N4O
D	A05	MMV010576	Malária		370,43	C19H18N2O4S
D	A06	MMV032967	Malária		369,35	C19H14N5F3
D	A07	MMV031011	Malária		436,99	C25H29N4OCl
D	A08	MMV688178	Esquistossomose		363,41	C24H17N3O
D	A09	MMV688362	Cinetoplastídeos		360,41	C21H20N4O2
D	A10	MMV687706	Cinetoplastídeos		356,85	C19H20N4O
D	A11	MMV026356	Malária		397,48	C20H27N7O2
D	B02	MMV011511	Malária		367,54	C23H33N3O
D	B03	MMV007625	Malária		409,56	C22H27N5OS
D	B04	MMV007471	Malária		424,88	C23H21N2O4Cl
D	B05	MMV024829	Malária		380,54	C23H32N4O
D	B06	MMV045105	Cinetoplastídeos		321,38	C19H19N3O2
D	B07	MMV022029	Malária		449,62	C26H31N3O2S
D	B08	MMV676064	Oncocercose		376,42	C23H21N2O2F
D	B09	MMV688180	Cinetoplastídeos		495,43	C21H24N6O2Cl2S
D	B10	MMV024035	Malária		502,46	C25H23N3O2S
D	B11	MMV688941	Tuberculose		349,42	C22H23NO3
D	C02	MMV020291	Malária		407,58	C21H33N3O3S
D	C03	MMV006833	Malária		414,95	C19H27N2O4ClS
D	C04	MMV026490	Malária		372,47	C23H24N4O
D	C05	MMV687246	Malária		499,59	C26H25N7O2S
D	C06	MMV676162	Cinetoplastídeos		358,35	C21H14N2O4
D	C07	MMV024114	Malária		443,33	C19H15N4O2BrS
D	C08	MMV688467	Cinetoplastídeos		410,53	C22H26N4O2S
D	C09	MMV675998	Cinetoplastídeos		408,28	C17H17N7O
D	C10	MMV659010	Cinetoplastídeos		344,34	C18H15N4F3
D	C11	MMV676008	Cinetoplastídeos		441,39	C24H15N3O6
D	D02	MMV676269	Malária		356,43	C21H25N2O2F
D	D03	MMV020081	Malária		381,45	C22H24N3O2F
D	D04	MMV026550	Malária		321,42	C20H23N3O
D	D05	MMV675995	Oncocercose		284,35	C17H20N2O2
D	D06	MMV688274	Cinetoplastídeos		521,97	C27H25N5O3ClF
D	D07	MMV023860	Malária		370,43	C18H18N4O3S
D	D08	MMV688407	Cinetoplastídeos		387,44	C21H21N7O
D	D09	MMV023949	Malária		429,53	C24H27N7O
D	D10	MMV676050	Criptosporidíase		450,56	C23H26N6O2S
D	D11	MMV024406	Malária		428,32	C21H19N5OCl2
D	E02	MMV023233	Malária		260,30	C16H12N4

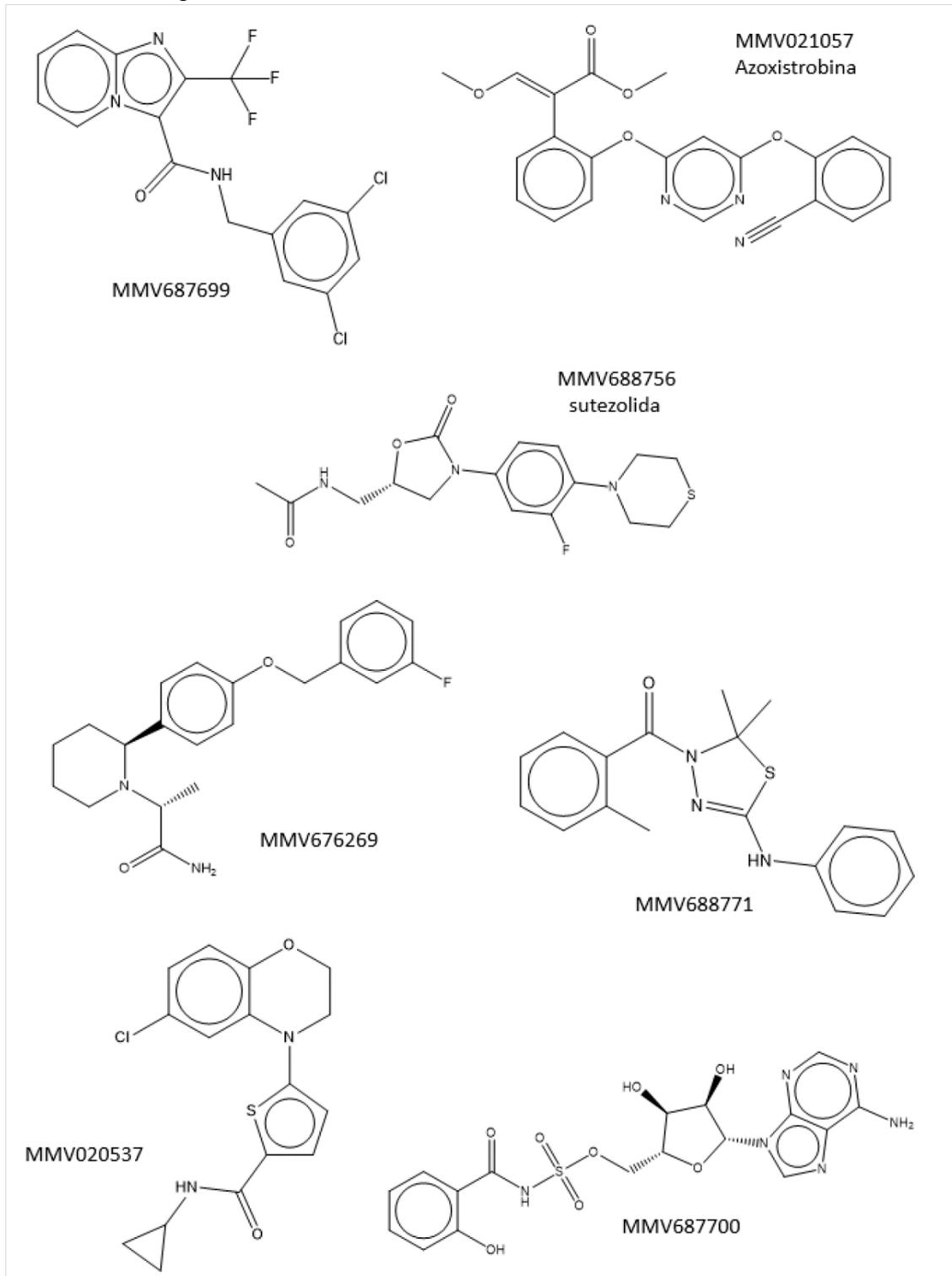
PLACA	POSIÇÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
D	E03	MMV085230	Malária		316,40	C18H24N2O3
D	E04	MMV085071	Malária		348,41	C19H20N6O
D	E05	MMV659004	Cinetoplastídeos		364,88	C21H21N4Cl
D	E06	MMV676260	Malária		329,35	C17H17N5F2
D	E07	MMV688364	Toxoplasmose		459,54	C25H29N7O2
D	E08	MMV032995	Malária		400,20	C17H13NO2BrF3
D	E09	MMV688279	Cinetoplastídeos		397,94	C23H28N3OCl
D	E10	MMV688271	Cinetoplastídeos		476,19	C18H16N6OCl2
D	E11	MMV019790	Malária		372,43	C22H20N4O2
D	F02	MMV009135	Malária		388,47	C22H24N6O
D	F03	MMV011765	Malária		358,73	C13H6N4OCIF3S
D	F04	MMV024937	Malária		453,85	C20H18N5O2F3
D	F05	MMV085499	Malária		315,34	C18H13N5O
D	F06	MMV023985	Malária		324,38	C18H20N4O2
D	F07	MMV024195	Malária		424,57	C22H28N6OS
D	F08	MMV676063	Oncocercose		489,62	C30H36N3O2F
D	F09	MMV676186	Cinetoplastídeos		469,45	C26H19N3O6
D	F10	MMV688474	Cinetoplastídeos		477,47	C21H21N7O
D	F11	MMV687812	Tuberculose		534,51	C24H26N8O2F4
D	G02	MMV007803	Malária		321,83	C16H16NO2ClS
D	G03	MMV001059	Malária		379,44	C17H24NO3F3S
D	G04	MMV011691	Malária		391,43	C21H21N5O3
D	G05	MMV676877	Malária		315,79	C18H18NO2Cl
D	G06	MMV663250	Malária		366,90	C21H23N4Cl
D	G07	MMV407539	Wolbachia		448,54	C24H24N4O3S
D	G08	MMV688372	Cinetoplastídeos		401,44	C23H20N5OF
D	G09	MMV658993	Cinetoplastídeos		402,90	C19H19N4O2ClS
D	G10	MMV676182	Criptosporidíase		372,47	C22H24N6
D	G11	MMV676411	Tuberculose		325,38	C17H15N3O2S
D	H02	MMV007133	Malária		413,50	C21H23N3O4S
D	H03	MMV022478	Malária		545,93	C23H21N6OCl
D	H04	MMV024101	Malária		461,76	C16H12N6O2S
D	H05	MMV676881	Malária		300,27	C14H10N6F2
D	H06	MMV024443	Malária		328,37	C20H16N4O
D	H07	MMV688469	Toxoplasmose		275,31	C16H13N5
D	H08	MMV023388	Malária		385,39	C21H18N3OF3
D	H09	MMV675968	Criptosporidíase		359,81	C17H18N5O2Cl
D	H10	MMV675996	Oncocercose		352,47	C22H28N2O2
D	H11	MMV688980	Malária		335,40	C16H18N3O2FS
E	A02	MMV011229	Malária		292,26	C14H11N4F3
E	A03	MMV676468	Tuberculose		335,44	C10H8NOClS
E	A04	MMV688771	Esquistossomose		325,43	C18H19N3OS
E	A05	MMV687798	Composto Referência	Levofloxacino	361,37	C18H20N3O4F
E	A06	MMV688775	Composto Referência	Rifampicina	822,94	C43H58N4O12
E	A07	MMV676159	Cinetoplastídeos		339,82	C19H18N3OCl
E	A08	MMV393144	Malária		310,38	C18H19N4F
E	A09	MMV007920	Malária		329,35	C20H15N3O2

PLACA	POSIÇÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
E	A10	MMV688270	Esquistossomose		359,42	C22H21N3O2
E	A11	MMV019993	Malária		362,36	C17H17N6F3
E	B02	MMV687794	Malária		384,29	C15H18N3O2BrS
E	B03	MMV676470	Tuberculose		299,36	C18H21NO3
E	B04	MMV688938	Tuberculose		356,46	C20H21N2OFS
E	B05	MMV689000	Composto Referência	Anfotericina B	924,08	C47H73NO17
E	B06	MMV004168	Cinetoplastídeos		314,86	C19H23N2Cl
E	B07	MMV676161	Cinetoplastídeos		335,40	C20H21N3O2
E	B08	MMV023183	Malária		402,54	C25H30N4O
E	B09	MMV047015	Tuberculose		256,23	C12H11N2OF3
E	B10	MMV688795	Cinetoplastídeos		297,39	C18H23N3O
E	B11	MMV688352	Dengue		525,00	C29H25N6O2Cl
E	C02	MMV676398	Wolbachia		360,43	C18H20N2O4S
E	C03	MMV676472	Tuberculose		424,90	C22H17N2O3ClS
E	C04	MMV671636	Oncocercose		447,36	C23H14N3O3F5
E	C05	MMV676599	Criptosporidíase		331,41	C20H21N5
E	C06	MMV689244	Cinetoplastídeos		459,89	C24H21N3OCIF3
E	C07	MMV688411	Toxoplasmose		359,43	C20H21N7
E	C08	MMV687765	Tuberculose		462,97	C25H26N6O
E	C09	MMV020165	Malária		379,38	C19H20N3O2F3
E	C10	MMV676524	Tuberculose		219,67	C11H10N3Cl
E	C11	MMV611037	Tuberculose		334,42	C14H14N4O2S2
E	D02	MMV688766	Esquistossomose		369,72	C17H11NO3ClF3
E	D03	MMV200748	Tuberculose		374,28	C19H20NO2Br
E	D04	MMV667494	Malária		494,03	C25H34N5OCIF2
E	D05	MMV028694	Malária		332,37	C18H16N6O
E	D06	MMV001499	Composto Referência	Nifurtimox	287,29	C10H13N3O5S
E	D07	MMV688345	Toxoplasmose		311,40	C16H17N5S
E	D08	MMV010545	Malária		410,46	C19H18N6O3S
E	D09	MMV023227	Malária		277,37	C18H19N3
E	D10	MMV687700	Tuberculose		584,51	C17H18N6O8S
E	D11	MMV676384	Tuberculose		307,32	C18H14N3OF
E	E02	MMV020289	Malária		361,46	C18H23N3O3S
E	E03	MMV002816	Composto Referência	Dietilcarbamazina	199,30	C10H21N3O
E	E04	MMV634140	Malária		431,97	C22H30N5O2Cl
E	E05	MMV030734	Malária		584,86	C17H19N6OC1
E	E06	MMV689243	Cinetoplastídeos		466,42	C23H20N4F6
E	E07	MMV676358	Malária		324,56	C11H7N5BrCl
E	E08	MMV687729	Tuberculose		400,42	C22H22N2O3F2
E	E09	MMV407834	Malária		437,46	C22H26N3O3F3
E	E10	MMV687813	Tuberculose		467,46	C25H23N3O4F2
E	E11	MMV153413	Tuberculose		422,33	C16H11N2O4F5S
E	F02	MMV019551	Malária		354,40	C20H22N2O4
E	F03	MMV688552	Esquistossomose		393,39	C17H14N5OF3S
E	F04	MMV016838	Malária		418,30	C22H16N3OBr
E	F05	MMV676270	Malária		356,43	C21H25N2O2F
E	F06	MMV688755	Tuberculose		359,26	C14H12N3O5F3

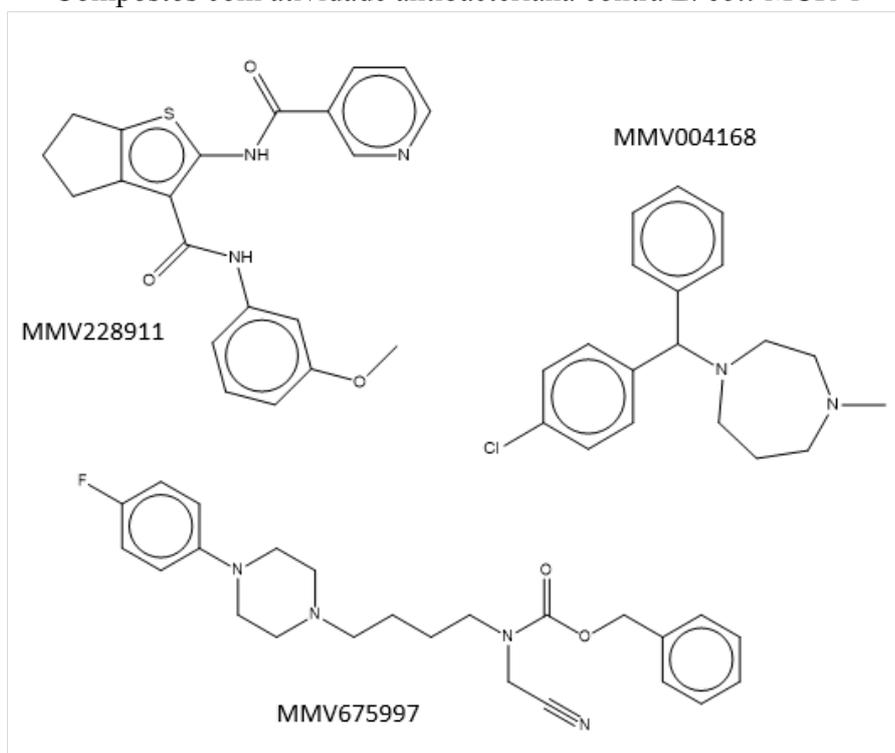
PLACA	POSICÃO	ID COMPOSTO	KIT PATOLOGIA	NOME TRIVIAL	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
E	F07	MMV228911	Tuberculose		393,46	C21H19N3O3S
E	F08	MMV272144	Tuberculose		254,27	C9H10N4O3S
E	F09	MMV026313	Malária		237,26	C14H11N3O
E	F10	MMV161996	Tuberculose		408,95	C20H25N2O3ClS
E	F11	MMV688543	Dengue		442,63	C24H46N2O5
E	G02	MMV146306	Tuberculose		364,49	C23H28N2O2
E	G03	MMV688557	Tuberculose		303,83	C12H13N2O2S2
E	G04	MMV021013	Tuberculose		294,40	C18H22N4
E	G05	MMV392832	Malária		316,36	C19H16N4O
E	G06	MMV688754	Cinetoplastídeos	Trifloxistrobina	408,37	C20H19N2O4F3
E	G07	MMV001561	Cinetoplastídeos	Fluoxetina	309,33	C17H18NOF3
E	G08	MMV658988	Cinetoplastídeos		338,84	C19H19N4Cl
E	G09	MMV084864	Malária		316,32	C17H12N6O
E	G10	MMV676492	Filariose Linfática		350,64	C9H5N3OBrClS2
E	G11	MMV688415	Cinetoplastídeos		433,54	C26H31N3O3
E	H02	MMV688330	Toxoplasmose		346,81	C18H19N2O3Cl
E	H03	MMV687796	Composto Referência	Amicacina	781,76	C22H43N5O13
E	H04	MMV688939	Tuberculose		302,37	C19H18N4
E	H05	MMV688978	Composto Referência	Auranofina	678,48	C20H34AuO9PS
E	H06	MMV688990	Composto Referência	Miltefosine	407,57	C21H46NO4P
E	H07	MMV688273	Cinetoplastídeos		394,83	C21H16N4OCIF
E	H08	MMV393995	Tuberculose		204,23	C10H12N4O
E	H09	MMV1236379	Cinetoplastídeos		232,24	C12H12N2O3
E	H10	MMV688550	Cinetoplastídeos		437,49	C23H27N5O4
E	H11	MMV495543	Tuberculose		276,36	C14H16N2O2S

## ANEXO 2 – Compostos com atividade antimicrobiana contra isolados

### Compostos com atividade antibacteriana contra *S. aureus* MRSA

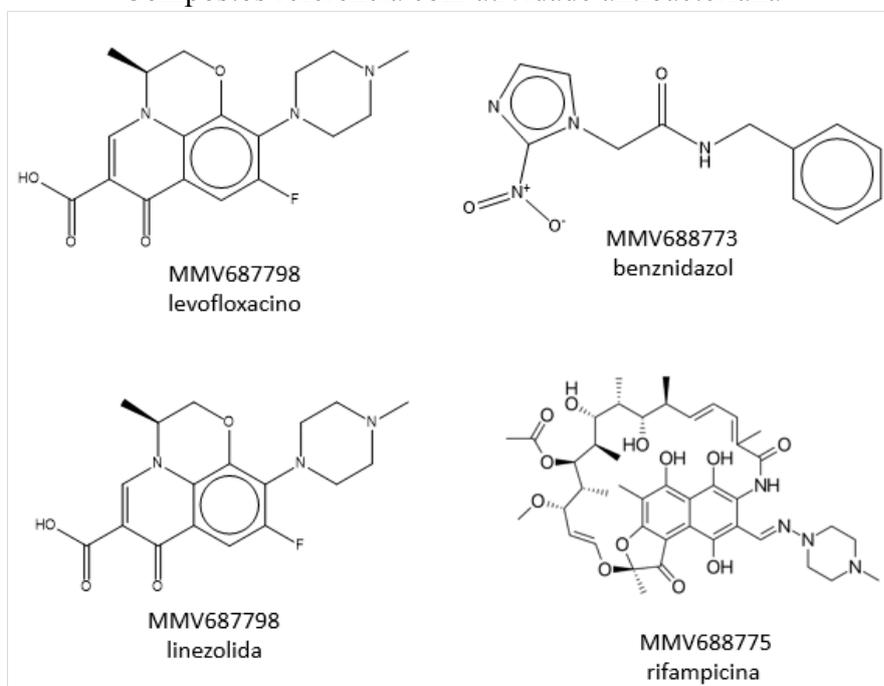


Fonte: Adaptado de MMV. disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/pathogen-box-supporting-information>.

Compostos com atividade antibacteriana contra *E. coli* MCR-1

Fonte: Adaptado de MMV. disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/pathogen-box-supporting-information>

## Compostos referência com atividade antibacteriana



Fonte: Adaptado de MMV. Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/pathogen-box-supporting-information>

**ANEXO 3 – Dados de citotoxicidade dos compostos com melhor atividade antibacteriana**

			MRC5 CC50 ( $\mu\text{M}$ )	PMM CC50 ( $\mu\text{M}$ )	PMM CC50 ( $\mu\text{M}$ )	L6 CC50 ( $\mu\text{M}$ )	HepG2 CC20 ( $\mu\text{M}$ )	HepG2 CC50 ( $\mu\text{M}$ )	HepG2 galactose CC50 ( $\mu\text{M}$ ), Experimento 1	HepG2 galactose CC50 ( $\mu\text{M}$ ), Experimento 2	HepG2 glucose CC50 ( $\mu\text{M}$ ), Experimento 1	HepG2 glucose CC50 ( $\mu\text{M}$ ), Experimento 2	CHO CC50 ( $\mu\text{M}$ )	HepG2: inibição a 10 $\mu\text{M}$ (%)
Placa	Posição	Composto												
E	B06	MMV004168	31,8	48,0										
C	A02	MMV675997	>32	>32	36,7	15,3								
E	F07	MMV228911							> 50	> 50	> 50	> 50		
A	E06	MMV688756							> 50	> 50	> 50	> 50		
E	D10	MMV687700						> 100						
C	E04	MMV687699						38,3						
D	D02	MMV676269					>80	>10						
B	D02	MMV020537						>10						
B	B11	MMV021057	>28											37
E	A04	MMV688771	>50				8						>50	

Fonte: Adaptado de MMV. Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/pathogen-box/pathogen-box-supporting-information>