



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTINSTITUCIONAL  
EM BIOTECNOLOGIA**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS  
ANAMORFOS DA AMAZÔNIA COM AÇÃO  
ANTIMICOBACTERIANA**

**ORMEZINDA CELESTE CRISTO FERNANDES**

**MANAUS-AMAZONAS  
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTINSTITUCIONAL  
EM BIOTECNOLOGIA**

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS  
ANAMORFOS DA AMAZÔNIA COM AÇÃO  
ANTIMICOBACTERIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Multinstitucional em Biotecnologia da Universidade  
Federal do Amazonas, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, na área de concentração  
em Saúde

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

**MANAUS-AMAZONAS  
2007**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F363m	<p>Fernandes, Ormezinda Celeste Cristo Metabólitos Secundários de Fungos Anamorfos da Amazônia com Ação Antimicobacteriana / Ormezinda Celeste Cristo Fernandes. 2007 115 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Fungos anamorfos. 2. Mycobacterium smegmatis. 3. Metabólitos secundários. 4. Atividade antimicobacteriana. 5. Bioautografia. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

## DEDICO

**A Deus**, porque tudo começa com Ele, por estar presente na minha vida, na luta de cada dia e na alegria do dever cumprido. **A Jesus Cristo**, porque Nele descobrimos quem somos e o propósito de nossas vidas.

## OFEREÇO

Aos meus queridos **PAIS** Jorge Sotto Mayor Fernandes e Maria Excelsa Cristo Fernandes, pelo intenso amor, carinho e coragem com que me ensinaram a viver, pela minha formação, por seus exemplos de fé e força, por dedicarem suas vidas a seus filhos, **pôr serem exemplos de vida e por acreditarem em mim.**

Aos meus **irmãos** Jorge Filho, Maria do Carmo e Francisco José, a minha cunhada Cris e meus sobrinhos Lena Rosa, Gabriel e Jorge Neto, pelo carinho, amizade, paciência, apoio em todos os momentos e pela **FELICIDADE** de tê-los na minha **VIDA.**

**Amo muito vocês !!!!!**

## **MENÇÃO ESPECIAL**

À professora Doutora **Maria Francisca Simas Teixeira**,  
não apenas pela orientação prestada durante a realização  
deste trabalho, mas pela amizade, confiança, carinho, respeito  
e por estar constantemente presente em todos esses anos de  
**Convivência. O meu eterno Reconhecimento.**

## Agradecimentos Especiais

A Deus que sempre esteve comigo e me permitiu encerrar mais esta etapa e me anima para as próximas;

A minha família, pela compreensão das ausências e o incessante incentivo;

A família Simas Teixeira pela compreensão de muitas vezes ter a ausência da matriarca nos momentos de lazer em família;

A Universidade Federal do Amazonas por todos estes incríveis anos que dela tenho feita minha casa e por mais uma vez ter me acolhido e proporcionado um grande crescimento profissional;

Aos amigos do laboratório de Micologia da UFAM ( Elton, Herlom, Michel, July, Tereza, Ana, Ivone, Josy, Bruno, Ritinha, Lincon, Antonio). Obrigada do fundo do meu coração pelo companheirismo, amizade, disposição e valiosas sugestões;

Aos colegas do laboratório de Microbiologia da UFAM Nely, Jaque, Takeshi,, Becman pelo incentivo e carinho;

Ao Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane / FIOCRUZ - Amazônia na pessoa do Diretor Dr. Roberto Sena, pelo apoio incondicional para a conclusão deste trabalho;

Aos amigos do laboratório de biodiversidade em saúde do IPLMD Sergio, Salete, Juracy, Marizete, Michele, Adriana, Hugo, Sônia, Claudia, Ani, Felipe, Iana, Luciano, Lincon. Vivien, Nete, Mota, Obrigada pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos;

Ao professor Doutor Jamal pela ajuda com o CG-EM

Ao pessoal do Laboratório LAPEC, em especial a Diana, Diego, Katuska, pela execução dos espectros e amizade;

A mais nova amiga Ana Lucia Basílio Carneiro e família, por quem eu tenho uma grande admiração;

As pibiquianas e amigas Karla Barbosa e Rita de Cássia de Oliveira, que colaboraram na primeira fase do trabalho;

As queridas amigas Michele (Micha), Salete, Meire, Kilma, Cris, Alessandra, Sandra, Marisa, Juracy, Mari, por todos os nossos cafés da manhã, Almoços, jantares e agradáveis conversas (sempre muito construtivas);

Ao corpo docente do PPGBiotec por sua valiosa contribuição em minha formação;

Aos professores Doutores Spartaco Astolfi Filho e Jose Odair Pereira pela firmeza e compreensão na hora dos sim e não, como coordenadores do PPGBiotec;



Aos funcionários da Secretaria Biotec na pessoa da Alessandra, Roberto e em especial a Ângela (Angelita), pela atenção, carinho e incentivo dispensado comigo;

Aos queridos amigos

Raimundo Felipe (Féee), Januário Gama dos Santos (Tio Janu) e Tereza Castillo (Tê),

Quero ser um amigo que esta sempre em seu caminho.....

..... E quem tem amigos nunca está sozinho.....

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando.....

A certeza de que precisamos continuar....

A certeza de que seremos interrompidos antes de  
terminar.....

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo....

Da queda, um passo de dança....

Do medo, uma escada....

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro....

Fernando Pessoa

## RESUMO

As infecções por espécies de *Mycobacterium* são de difícil tratamento devido à resistência desses microrganismos a maioria dos antibióticos comuns e aos agentes quimioterápicos. Este estudo teve o objetivo de selecionar *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* da região amazônica produtor de biocompostos e avaliar *in vitro* a atividade contra *M. smegmatis* e a citotoxicidade. Os 102 microrganismos selecionados, aleatoriamente, *Penicillium* (n=34), *Trichoderma* (n=34) e *Aspergillus* (n=34) foram analisados pelo método do bloco de gelose. As espécies produtoras de biomoléculas ativas contra *M. smegmatis* foram cultivadas em YES para a extração desses compostos em solventes orgânicos de diferentes polaridades. A prospecção dos constituintes químicos foi realizada por Cromatografia de camada delgada – CCD e Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG/EM). O potencial antimicrobiano dos extratos promissores foi avaliado por métodos bioautográficos, concentração inibitória mínima (CIM) e o grau de citotoxicidade usando como modelo microcrustáceo *Artemia franciscana*. Dos 102 fungos anamorfos analisados pelo método do Bloco de gelose, 75,5 % deles inibiram o crescimento de *M. smegmatis*. Entre esses, *A. niger* CFAM 1000 (halo=40 mm), *P. implicatum* CFAM 297 (halo=30 mm) e *T. pseudokoningii* CFAM 784 (halo=60 mm), expressaram os maiores halos. As análises de CCD demonstraram que entre os 99 extratos analisados, o maior número de biocompostos foi observado nos extratos orgânicos de *A. niger* DPUA1260 (28 compostos) e *A. tamaritii* DPUA 1395 (21 compostos). Em *P. fellutanum* CFAM 190 e CFAM 295 foram evidenciados 23 e 20 biocompostos, respectivamente, enquanto em *T. pseudokoningii* CFAM 767 e *T. harzianum* CFAM 428 foram revelados somente 12 biocompostos. Os dados obtidos em CG/EM mostraram que nos extratos de acetato de etila (AcOEt) e etanólico (EtOH) de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, os principais constituintes químicos, entre outros, foram compostos aromáticos, ésteres graxos, álcoois, dióis, hidrocarbonetos de cadeia longa e esteróis. Por bioautografia, apenas os extratos de *A. niger* DPUA 1266, *A. tamaritii* DPUA 1395, *A. oryzae* DPUA 1412 e *A. flavo-furcatis* DPUA 1532 [AcOEt (n= 4) e EtOH (n=4)] demonstraram atividade antimicobacteriana frente a *M. smegmatis*. Desses extratos, o EtOH de *A. oryzae* DPUA 1412 e *A. flavo-furcatis* DPUA 1532 foram os de maior eficiência contra o microrganismos-teste com CIM de 31 µg/mL. Quanto a citotoxicidade em *Artemia franciscana* tais extratos apresentaram percentual de letalidade (%L) >50 %, 62,5 % expressaram valores de CL<sub>50</sub> inferiores a 80 µg/mL, portanto tóxicos e os demais, 37,5 % moderadamente tóxicos. Os dados apresentados são inéditos e contribuem para o conhecimento de novos compostos bioativos que podem vir a ser usado como matrizes para a descoberta de novos fármacos.

Palavras Chave: Fungos anamorfos, *Mycobacterium smegmatis*, Metabólitos secundários, Atividade antimicobacteriana, Bioautografia.

## ABSTRACT

The infections by *Mycobacterium* species have a hard treatment due the resistance of those microorganisms in relation a most common antibiotics and chemotherapeutic agents. This study had objective to select biocomposts producing *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* from the Amazon region and to evaluate *in vitro* the activity against *M. smegmatis* and its cytotoxicity. The 102 selected microorganisms aleatorily, *Penicillium* (n=34), *Trichoderma* (n=34) and *Aspergillus* (n=34) were analyzed by the gelose block. The species producing of active biomolecules against *M. smegmatis* were cultivated in YES for the compositions extraction in different polarities organic solvents. The chemical representatives search was accomplished by Thin Layer Chromatography - TLC and Chromatography in Gaseous Phase Coupled to the Spectrometer of Mass (GC/SM). The promising extracts antimicrobial potential was evaluated by bioautography methods, minimum inhibitory concentration (MIC) and the cytotoxicity level using as model microcrustaceous *Artemia franciscana*. On the 102 anamorphs moulds analyzed by the gelose Block 75,5 % inhibited the *M.smegmatis* growth. Among those, *A. niger* CFAM 1000 (halo = 40 mm) *P. implicatum* CFAM 297 (halo = 30 mm) and *T. pseudokoningii* CFAM 784 (halo = 60 mm) expressed the largest halos. The TLC analyses demonstrated among 99 analyzed extracts the largest biocomposts number was observed in *A. niger* DPUA1260 organic extracts (28 composts) and *A. tamaris* DPUA 1395 (21 composts). In *P. fellutanum* CFAM 190 and CFAM 295 were evidenced 23 and 20 biocomposts, respectively, while in *T. pseudokoningii* CFAM 767 and *T. harzianum* CFAM 428 only 12 biocomposts were founded. The data obtained in GC/SM showed in ethyl acetate extracts (EtOAc) and ethanolic (EtOH) of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* species the principals chemical representatives, among others, were composts aromatic, fatty esters, alcohols, diols, long chain hydrocarbons and sterols. With bioautography only extracts of *A. niger* DPUA 1266, *A. tamaris* DPUA 1395, *A. oryzae* DPUA 1412 and *A. flavo-furcatis* DPUA 1532 [EtOAc (n = 4) and EtOH (n=4)] demonstrated activity antimicrobacterial against *M. smegmatis*. Of those extracts EtOH of *A. oryzae* DPUA 1412 and *A. flavo-furcatis* DPUA 1532 showed more efficiency against the microorganism-test with MIC of 31 µg/mL. As the cytotoxicity in *Artemia franciscana* extracts presented lethality percentile (% L) >50 %, 62,5 % expressed CL<sub>50</sub> values inferior to 80 µg/mL, therefore poisonous and the others, 37,5 % moderately poisonous. The presented data are unpublished and contributes to the new bioativos composts knowledge and can come to be used as broiler breeder for new pharms discovery.

Key words: Moulds anamorphs, *Mycobacterium smegmatis*, Secondary metabolits, Antimicrobial Activity, Bioautography

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais fungos imperfeitos (Hyphomycetes) produtores de antibióticos, (A) <i>Aspergillus</i> sp., (B) <i>Penicillium</i> sp., (C) <i>Fusarium</i> sp., (D) <i>Trichoderma</i> sp. ....	22
Figura 2	Estruturas características do gênero <i>Aspergillus</i> .....	35
Figura 3	Estruturas características do gênero <i>Penicillium</i> .....	27
Figura 4	Estruturas características do gênero <i>Trichoderma</i> .....	31
Figura 5	Seletividade de antibióticos nos respectivos sítios de ação na célula bacteriana .....	37
Figura 6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> : característica morfológica .....	41
Figura 7	Características macroscópicas e microscópicas dos fungos anamorfos <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> em análise .....	61
Figura 8	Determinação da atividade antibiótica dos fungos anamorfos contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607 em ágar nutritivo - Técnica do Ágar <i>Plug</i> .....	76
Figura 9	Atividade antimicrobiana de 19 espécies de <i>Aspergillus</i> frente a <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607, determinada em meio sólido, a 37 °C por 24 horas, selecionadas para análise cromatográfica.....	78
Figura 10	Atividade antimicrobiana de seis espécies de <i>Penicillium</i> frente a <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607, determinada em meio sólido, a 37 °C por 24 horas, selecionadas para análise cromatográfica .....	79
Figura 11	Atividade antimicrobiana de oito espécies de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607, determinada em meio sólido, a 37 °C por 24 horas, selecionadas para análise cromatográfica .....	79
Figura 12	Bioautograma do biocomposto, presente no extrato de AcOEt produzido por <i>Aspergillus niger</i> DPUA 1266, demonstrando positividade para <i>M.smegmatis</i> ATCC 607, após 24 horas de incubação a 37 °C .....	90
Figura 13	CIM contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607 dos extratos etanólico de <i>Aspergillus oryzae</i> DPUA 1412 .....	92
Figura 14	Figura comparativa dos valores de $CI_{50}$ para as espécies de <i>Aspergillus</i> frente a <i>Artemia salina</i> .....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fungos filamentosos de diferentes categorias taxonômicas produtores de compostos com atividade antibiótica .....	23
Tabela 2	Classificação dos antibióticos segundo o sítio de ação e atividade biológica.....	38
Tabela 3	Casos de incidência da tuberculose por sexo e por 100.000 habitantes nos municípios do estado do Amazonas, 2000 .....	47
Tabela 4	Quantitativo Numérico dos fungos anamorfos analisados .....	60
Tabela 5	Distribuição de freqüência do diâmetro médio dos halos de 77 (75,49%) fungos anamorfos ( <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> ) determinado em meio sólido (ágar nutritivo) .....	76
Tabela 6	Diâmetro médio dos halos expressados dos metabólitos produzidos por fungos anamorfos frente à <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607, determinada em ágar nutritivo a 37 ° C por 24 horas .....	77
Tabela 7	Mobilidade dos biocompostos das espécies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> com maior diversidade de spots obtidos pelo método cromatográfico em camada delgada – CCD, no sistema de eluição tolueno-acetato de etila - ácido fórmico 90% - TAF (5:4: 1; v/v/v) .....	81
Tabela 8	Biocompostos identificados nos extratos AcOEt e EtOH de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> utilizando CG/EM.....	88
Tabela 9	Extratos orgânicos de espécies de <i>Aspergillus</i> e seus respectivos Rfs com ação antimicobacteriana frente à <i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607, selecionados pela técnica da bioautografia. ....	91
Tabela 10	Determinação da CIM pela técnica de diluição em microplacas e da CBM dos extratos de AcOEt e EtOH das espécies de <i>Aspergillus</i> com ação antimicobacteriana pelo método bioautográficos .....	94
Tabela 11	Resultado do teste de toxicidade de extratos orgânicos das espécies de <i>Aspergillus</i> usando como modelo a <i>Artemia franciscana</i> , durante 24 horas. ....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<	Sinal de menor
%	Porcentagem
∅	Diâmetro
µg/mL	Microgramas por mililitros
mg/mL	Miligramas por mililitros
mg	Miligramas
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
ATCC	American Type Culture Collection
mL	Mililitros
µL	Microlitros
G	Gramas
µm	Micra
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
Rf	Razão de frente
TAF	Sistema de eluição tolueno-acetato de etila - ácido fórmico 90%
v/v/v	Volume por volume
EtOH	Etanol
AcOEt	Acetato de etila
DMSO	Dimetilsulfóxido
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CBM	Concentração bactericida mínima
CG/EM	Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
TCC	Cloreto de Trifeniltetrazoliun
% M	Porcentagem de mortalidade
%L	Percentual de letalidade

CL <sub>50</sub>	Concentração letal média
TB	Tuberculose
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
RMP	Rifampicina
INH	Isoniazida
PZA	Pirazinamida
EMB	Etambutol
ETH	Etionamida
SM	Estreptomicina
TAS	<i>Artemia salina</i> Leach
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CGS	Cromatografia gás-sólido
CLS	Cromatografia líquido-sólido
CL/EM	Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas
CSS	Cromatografia supercrítica em fase estacionária sólida
CL	Cromatografia líquida
DPUA	Coleção de Cultura do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas
CFAM	Coleção de Cultura de Fungos da FIOCRUZ/AMAZÔNIA
YES	Ágar extrato de levedura e sacarose
MEA	Ágar Malte
INCQS	Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde



## Sumário

	pg
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. JUSTIFICATIVA .....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1 - Potencial dos Produtos Naturais como Fontes de Substâncias Ativa .....	20
3.2 - Fungos Produtores de Antibióticos .....	22
3.2.1 O gênero <i>Aspergillus</i> : características biológicas e importância.....	24
3.2.2 O gênero <i>Penicillium</i> : características biológicas e importância .....	26
3.2.3 O gênero <i>Trichoderma</i> : características biológicas e importância .....	29
3.3 – Antibióticos naturais .....	32
3.3.1 - Classificação dos antibióticos .....	33
3.3.2 - Resistência dos microrganismos aos antibióticos .....	39
3.4 – Doenças infecciosas .....	39
3.4.1 Tuberculose .....	40
3.4.1.2 Agente Transmissor .....	40
3.4.2 Quimioterapia da Tuberculose .....	42
3.4.3 Problemática da tuberculose .....	44
3.5 - Ensaio de Atividade Antimicrobiana .....	47
3.5.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana .....	47
3.6. Teste de Toxidez Frente à Microcrustáceos .....	49
3.7. Métodos Cromatográficos para identificação de substâncias bioativas .....	50
3.7.1. Cromatografia por adsorção .....	52
3.7.2. Cromatografia em Camada Delgada – CCD .....	53
3.7.3. Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas - CG/EM ...	54
3.7.4. Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas – CL/EM ...	55
4. OBJETIVOS .....	58
4.1 GERAL .....	58
4.2 ESPECÍFICOS .....	58
5. METODOLOGIA .....	59
5.1 Microrganismos .....	59

5.2. Reativação e manutenção dos fungos preservados em água destilada esterilizada (Castellani, 1965) e sílica gel (Smith e Onions, 1983). .....	61
5.3. Reativação e manutenção do microrganismo-teste .....	62
5.4. Seleção de fungos anamorfos produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana em meio sólido .....	62
5.5. Determinação dos Metabólitos Secundários Atividade Antimicrobiana por Diferentes Métodos Cromatográficos. ....	63
5.5.1 Detecção do metabólito secundário com Atividade Antibiótica – Modificada (Técnica do Ágar <i>Plug</i> ) .....	63
5.5.2 Análise por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplado a Espectrometria de Massa (CG/EM) .....	65
5.5.3 Bioautografia .....	66
5.5.3.1 Preparação e aplicação da amostra .....	67
5.5.3.1.2 Preparação dos Extratos orgânicos dos fungos anamorfos para os testes bioautográficos .....	67
5.5.3.1.3 Preparação das placas e cuba cromatográfica .....	67
5.5.3.1.4 Aplicação dos extratos orgânicos na placa de cromatografia .....	67
5.5.3.1.5 Inoculação da Suspensão de Esporos em Ágar Nutritivo .....	68
5.5.3.1.6 Exposição das Placas Cromatográficas ao Ágar Nutritivo Adicionado de Suspensão de Esporos .....	68
5.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CIM dos Extratos Orgânicos Promissores .....	69
5.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória por Diluição em Caldo Com Adição de Corante de Viabilidade Celular .....	69
5.6.1.1. Preparação do Inoculo do Microrganismo Teste .....	70
5.6.1.2. Preparação dos Extratos Orgânicos Seleccionados .....	70
5.6.1.3. Solução de Indicador de Viabilidade Celular .....	70
5.6.1.4 Método de Determinação de CIM em Placa de Microdiluição .....	71
5.6.1.5. Determinação da Concentração Bactericida Mínima – CBM .....	71
5.7. Estudo da Toxidez dos Extratos Seleccionados Frente à <i>Artemia franciscana</i> .....	72
5.7.1 Percentual de Mortalidade de <i>Artemia franciscana</i> .....	72
5.7.1.1. Obtenção das Larvas de <i>Artemia franciscana</i> .....	72
5.7.1.2. Ensaio da toxidez dos extratos frente à <i>Artemia franciscana</i> .....	73
5.7.2. CL <sub>50</sub> do Percentual de Mortalidade de <i>Artemia franciscana</i> .....	74

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
6.1 Seleção de Microrganismos Produtores de Antibióticos em Meio Sólido.....	75
6.2 Determinação do Perfil Cromatográfico dos Biocomposto Produzidos por Espécies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> .....	78
6.2.1 – Identificação de Biocompostos das Espécies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Trichoderma</i> por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas CG/EM).....	81
6.2.3 Bioautografia.....	88
6.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos Extratos Orgânicos Seleccionados nos testes bioautográficos.....	91
6.4 Teste de Toxicidade Para <i>Artemia Franciscana</i> .....	94
7. CONCLUSÃO.....	99
8. REFERÊNCIAS.....	101
9. TRABALHOS FUTUROS .....	117

## 1 INTRODUÇÃO

A presença dos fungos na antiga e moderna micotecnologia, está associada a capacidade desses organismos em metabolizar e excretar substâncias. Em consequência dessas características, nas últimas décadas, muitas espécies vêm sendo usadas em processos biotecnológicos nas diversas áreas industriais (BENNET, 1998; BONONI, 1998, DEACON, 1997).

Aproximadamente 50.000 metabólitos secundários são produzidos por microrganismos. Dentre esses, dos 12.000 antibióticos identificados, 22% são oriundos de fungos filamentosos, dos quais, as penicilinas, cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico são clinicamente importantes e biossintetizados por *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cephalosporium* (CRUEGER; CRUEGER, 1990; LEMOS, 1999; MANFIO 2002; PEARCE, 1997).

Estima-se que 40 % dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos de fontes naturais: 25 % de plantas, 13 % de microrganismos e 3 % de animais (CALIXTO, 2003). Os produtos naturais de origem vegetal e de microrganismos envolvem pesquisas diferentes como, autenticidade da identidade, determinação da composição química e da ação farmacológica, bem como a elucidação das estruturas químicas ativas (CALIXTO& YUNES, 2001).

Os biocompostos, especialmente aqueles produzidos por fungos são fontes potenciais de novas substâncias químicas. Estes podem transformar-se em promissores protótipos bioativos entre os quais, têm destaque os antibióticos, os redutores de

colesterol, os antitumorais, antifúngicos, imunossupressores, antiprotozoários e enzimas (DEMAIN, 1999; GÖHRT, ZEECK, 1992; NEWMAN, 2000; SOTERO - MARTINS, 2004, SILVA NEVES et al, 2006).

Os antibióticos são compostos pertencentes a diferentes famílias químicas, tóxicos para micro-organismos, isto é, interferem de forma seletiva nos processos metabólicos, a exemplo os  $\beta$ -lactâmicos que atuam sobre a parede celular das bactérias (MATEOS, 2004).

Os micro-organismos adquirem resistência a agentes antimicrobianos assim que estes são introduzidos no mercado (COHEN et al, 1997). Tal fenômeno passou a ser um problema da atualidade devido ao uso excessivo de medicamentos como os antibióticos em países desenvolvidos e paradoxalmente, a subutilização desses compostos nos países em desenvolvimento, principalmente em decorrência da pobreza associada à carência de medidas efetivas de saúde coletiva (BRUNDTLAND, 2000).

As substâncias de origem natural são biodegradáveis e renováveis, características de grande interesse na sociedade atual, especialmente quando se pensa não apenas na ocupação sustentável de uma região, mas sim de todo o planeta e ainda, na conscientização das populações a fim de garantir um ecossistema viável no futuro.

Fundamentando-se na importância da realização de estudos para selecionar microrganismos potencialmente exploráveis na micotecnologia, principalmente quanto à produção de antibióticos. Esta pesquisa teve como objetivo analisar fungos anamorfos da Região Amazônica com toxicidade seletiva em relação a agentes de doença infecto contagiosa recrudescente, como a tuberculose.

## 2 JUSTIFICATIVA

O otimismo que se seguiu ao aparecimento dos antibióticos, no período pós-guerra, fez com que se acreditasse que as doenças infecciosas poderiam ser eliminadas ou, até erradicadas, num futuro próximo.

Em relação à tuberculose (TB), observou-se, de fato, um declínio progressivo da ocorrência entre os anos 50 e como consequência, as doenças infecciosas deixaram ser uma prioridade em Saúde Pública (MS, 1998).

Apesar de novos e eficazes antimicrobianos serem comercializados, não se verificou a esperada eliminação das doenças infecciosas, em alguns casos, como na TB. Verificou-se aumento dessa doença e, além disso, essa infecção adquiriu características diferentes com relação à epidemiologia, ao quadro clínico, ao padrão sensibilidade aos antimicrobianos, bem como em relação ao prognóstico.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde - OMS, um terço da população Mundial (dois milhões de pessoas) está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. Anualmente registram-se 8,8 milhões de novos casos de tuberculose -TB, significando 1.000 novos casos por hora.

Considera-se que a TB vem sendo a principal causa de morte, em adultos, a nível mundial. Calcula-se que nos próximos 20 anos, um bilhão de indivíduos esteja

infectado por *M. tuberculosis* e 200 milhões de pessoas irão desenvolver TB, número que corresponderá a 35 milhões mortes (MS, 1994; 1998; 2002a).

Tal situação agrava-se com o aparecimento do bacilo resistente às drogas habituais, fruto, na maioria das vezes, de tratamentos irregulares e dos altos percentuais de abandono (MS, 2002a). Outros fatores, como a epidemia de AIDS, a progressiva pauperização de parte da população mundial associado ao aumento de populações marginais, migrações e dificuldade de acesso aos serviços de saúde são os responsáveis pelo recrudescimento da doença no mundo (KRITSKI *et al.*, 2000).

Diante da exacerbação da tuberculose, de outras doenças infectocontagiosas afins e da falência do atual arsenal terapêutico frente à resistência dos microrganismos, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas visando à descoberta de novos compostos com ação de amplo espectro contra os agentes causadores de tais doenças (OMS, 2002a).

De acordo com o exposto, justifica-se a continuidade e a efetivação de programas de *screening* de microrganismos potencialmente produtores de substâncias biocidas e biostáticas.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 - Potencial dos Produtos Naturais como Fontes de Substâncias Ativa.**

Vegetais superiores e microrganismos, inclusive os marinhos representam de grande potencial biológico por produzirem substâncias bioativas estruturalmente diferenciadas. Os microrganismos pelas diversas áreas industriais estão sendo investigados, como fontes de recursos renováveis de novas substâncias ativas, considerando-se todo o avanço no planejamento racional de fármacos, síntese química e química combinatória (HARVEY, 2000; PETSKO, 1996).

Os compostos naturais são classificados como, (a) **metabólitos primários** - fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do organismo; (b) **metabólitos secundários** - geralmente referidos como não essenciais ao crescimento vegetativo do organismo produtor (BEPPU, 1992; DEACON, 1997).

Alguns dos metabólitos secundários produzidos por fungos e actinomicetes são conhecidos como sinalizadores químicos da diferenciação sexual de espécies filamentosas. Exercem a função de indutores da diferenciação celular no organismo produtor ou de outros seres vivos (BEPPU, 1992).

Quando o metabólito secundário atua contra outro organismo, a função benéfica do produtor torna-se discutível, como no caso dos antibióticos, compostos que promovem a inibição do crescimento ou a eliminação de determinadas espécies, fenômeno que contribui para seleção evolutiva de vários microrganismos nos diferentes ecossistemas (BEPPU, 1992; BRIZUELA, 1998).



A explicação para a excreção de substâncias bioativas está relacionada às mudanças do ambiente natural, incluindo as mudanças nutricionais, infecções e competição (DEMAIN, 1999; MACIAS et al, 2000; MEDENTESEV, AKIMENKO, 1996; STROHI, 2000).

Na medicina moderna os produtos naturais desempenham as seguintes funções (DEMAIN,1999;ROBBERS et al, 1996):

I – fornecem um considerável numero de fármacos úteis, para os quais a síntese comercial é difícil ou inviável (ex: morfina, vicristina, vinblastina, taxol);

II – servem de compostos básicos que podem ser modificados para aumentar a atividade ou diminuir a toxicidade (ex: hidromorfina a partir de morfina);

III – constituem protótipos ou modelos para fármacos sintéticos que possuem atividades fisiológicas semelhantes as originais (ex: propoxifeno a partir de morfina);

IV – os que não apresentam atividades podem ser modificados por métodos químicos ou biológicos para a obtenção de fármacos potentes (ex: obtenção do taxol a partir de bacatinal).

As pesquisas a cerca dos antibióticos contribuíram para a obtenção desses compostos a partir de microrganismos e, após vários estudos verificou-se a produção deles também por vegetais superiores como o jacarandá (*Jacaranda mimosaeifolia* D. Don), a caviúna (*Machaerium scleroxylon*) e várias outros espécies.

### **3.2 - Fungos Produtores de Antibióticos**

Os antibióticos são produzidos por diversas espécies de microrganismos e certos grupos de vegetais superiores que têm propriedade inibitória contra microrganismos patogênicos, podendo eventualmente destruí-los (DEACON, 1997; PELCZAR et al., 1997). Dentre os microrganismos citados como produtores de metabólitos biologicamente ativos são destacados os fungos anamorfos e aqueles que constituem os filos Ascomycota e Basidiomycota (BENNETT, 1998; OKUNADE et al, 2004).

Comumente os fungos anamorfos, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (Figura 1), são os que mais produzem antibióticos, raramente tais compostos são produzidos por espécies do filo Zygomycota (DEACON, 1997).

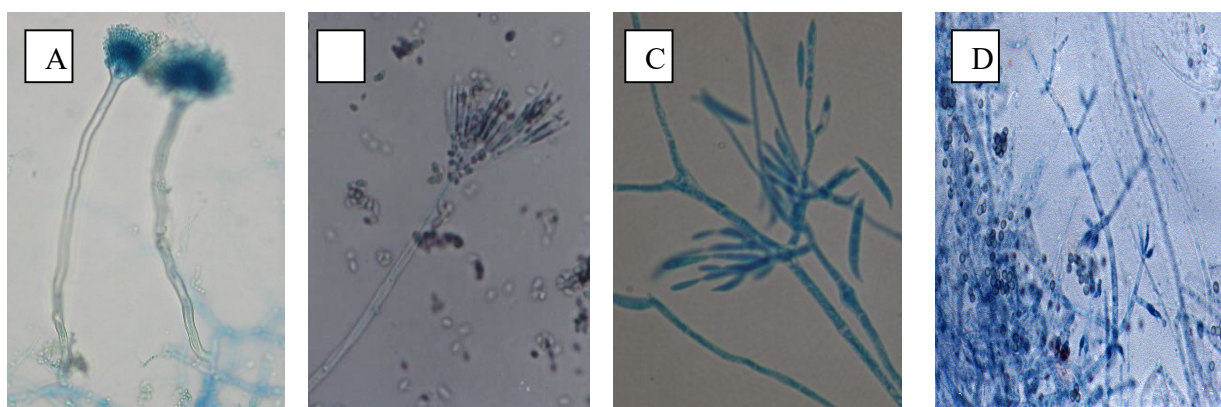


Figura 1 Principais fungos imperfeitos (Hyphomycetes) produtores de antibióticos, (A) *Aspergillus* sp., (B) *Penicillium* sp., (C) *Fusarium* sp., (D) *Trichoderma* sp.

A tabela 1 mostra exemplos de antibióticos e os respectivos fungos que os produzem, os quais estão sendo utilizados na indústria farmacêutica. Novos compostos têm sido investigados em escala de *screening* farmacológico industrial, como agentes antitumorais e anticâncer, inibidores enzimáticos, imunomoduladores e agentes

cardiovasculares (BONONI, 1998; BRIZUELA et al, 1998; DEACON, 1997; MANFIO, 2002; OKUNADE et al, 2004; SUGUE et al, 2001).

Microrganismo	Antibiótico	Classificação do Microrganismo
<i>Aspergillus flavus</i>	Ácido aspergílico	Fungo anamorfo
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus giganteus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Flavicina	Fungo anamorfo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigacina	Fungo anamorfo
<i>Cephalosporium salmosynne</i>	Cefalosporina N	Fungo anamorfo
<i>Cephalosporium sp.</i> <i>Paecilomyces variotii</i>	Cefalosporina	Fungo anamorfo Fungo anamorfo
<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium notatum</i>	Penicillina	Fungo anamorfo
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Fungo anamorfo
<i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium puberulum</i>	Ácido penicílico	Fungo anamorfo
<i>Penicillium griseofulvin</i>	Griseofulvina	Fungo anamorfo
<i>Penicillium spinulosum</i>	Espinulosa	Fungo anamorfo
<i>Trichoderma artroviridis</i>	Neoartroviridinas	Fungo anamorfo
<i>Chaetomium cochlioides</i>	Chaetomina	Ascoomycota
<i>Chaetomium violaceum</i>	Violaceína	Ascoomycota
<i>Chaetomium iodinium</i>	Iodinina	Ascoomycota
<i>Ágaricus xantodermus</i>	Ágaridina	Basidiomycota
<i>Ágaricus xantodermus</i>	Ágaridina	Basidiomycota
<i>Cyathas sp.</i>	Pleoromufilina	Basidiomycota
<i>Cyathas sp.</i>	Pleoromufilina	Basidiomycota
<i>Pleurotus sp.</i>	Escoradanina	Basidiomycota
<i>Pleurotus sp.</i>	Escoradanina	Basidiomycota

Tabela 1 Fungos filamentosos de diferentes categorias taxonômicas produtores de compostos com atividade antibiótica.

Fonte – DEACON, 1997; PELCZAR et al, 1997

Muitos antibióticos naturais foram descobertos entre 1940 e 1950, período que foi denominado de “a idade de ouro dos antibióticos”. Após esse período, as pesquisas se multiplicaram, mas objetivando a procura sistemática de drogas com atividades diferentes de antinfeciosos (BENNETT, 1998).

### 3.2.1 O gênero *Aspergillus*: características biológicas e importância

O gênero *Aspergillus* foi catalogado primeiro em 1729 pelo padre italiano e biólogo Pietro Antônio Micheli. Ao observá-lo sob microscópio, fez lembrar-lhe a forma de um aspergillum (irrigador de água benta), e nomeando o gênero adequadamente (RAPER e FENNELL, 1977).

Taxonomicamente o reconhecimento desse gênero se baseia na estrutura celular de reprodução assexuada, resultando dessa forma na denominação forma-gênero, isto é, nome dado ao *taxon* e fundamentado em particular na descrição de uma parte do organismo (RAPER e FENNELL, 1977).

Tipicamente essa forma-gênero é reconhecida por apresentar distinto conidióforo, que se diferencia terminalmente em uma vesícula onde são formados os esterigmas ou fiálides (Figura 2). As fiálides podem ser formadas diretamente na vesícula ou sobre metulas. Nesta última estrutura celular, são formados os conídios de várias cores, dependendo da espécie. Algumas espécies podem formar massas de células chamadas células de *Hülle* que quando produzidas permanecem dispostos em cadeia (RAPER e FENNELL, 1977).

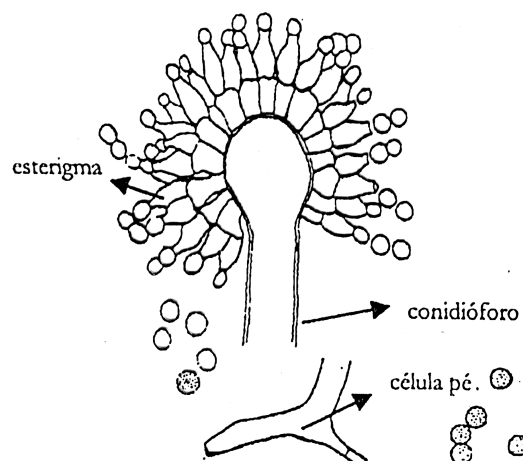


Figura 2. Estruturas características do gênero *Aspergillus*.

*Aspergillus* é um fungo filamentoso, cosmopolita e onipresente achado na natureza. Geralmente isolado do solo, escombros de planta, e ambiente de ar em recinto fechado. O estado teleomorfo só foi descrito para algumas das espécies de *Aspergillus*, outros são ser anamorficos, sem qualquer produção de esporo sexual conhecida. O gênero *Aspergillus* inclui mais de 185 espécies. Destes somente 20 espécies têm sido relatadas como agentes de infecções oportunistas no homem (RAPER e FENNELL, 1977).

Espécies de *Aspergillus* são altamente aeróbias e são achadas em quase todos ambientes ricos em oxigênio onde eles geralmente se desenvolvem como moldes na superfície de um substrato, como resultado da tensão de oxigênio alta. Geralmente, fungos são crescidos em substratos ricos em carbono, principalmente monossacarídeos como glicose. Porém, *Aspergillus* também pode segregar, por exemplo, enzimas como as amilases que permitem usar polissacarídeos (goma) como uma fonte de carbono. Como resultado disto, espécies de *Aspergillus* são contaminante comuns de comidas engomadas, por exemplo, pão e batata, e crescem dentro ou em muitas plantas e árvores. Muitas espécies de *Aspergillus* são capazes de crescer em ambientes nutricionalmente escassos. Este gênero pode ser achado crescendo em paredes

úmidas, ou como componente principal das contaminações (RAPER e FENNELL, 1977).

Espécies de *Aspergillus* são sem dúvida microrganismos importante na micotecnologia, uma vez que seus metabólitos secundários possuem diversas aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromas, inseticidas, enzimas e etc. Estes metabólitos possuem ampla variedade de estruturas e podem ser encontrados em diversas espécies do gênero (DEMAIN, 1999; NEWMAN, 2000; SOTERO - MARTINS, 2004).

### **3.2.2 O gênero *Penicillium*: características biológicas e importância**

O gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809. As espécies que compõem o gênero *Penicillium* são amplamente distribuídas por todo o mundo e são consideradas saprófitos. Muitas delas vivem no solo ou em matéria orgânica em decomposição (PITT, 1985; SAMSON, 2004).

A estrutura que caracteriza o gênero *Penicillium*, é o conidióforo ou célula conidiogênica que se apresenta em forma de pincel. A morfologia da estrutura é que da nome ao gênero ( *Penicillus* é de origem do latim e significa pincel pequeno). Os conídios se apresentam em cadeias e são originados a partir de uma célula especializada: a fiálide. O conidióforo esta unido ao micélio mediante a estipe. Entre estas e as fiálides podem aparecer diferentes células. Estas células se apresentam

agrupadas partindo de um mesmo ponto de origem. A partir das fiálides, os pontos se ramificam num só, em dois ou excepcionalmente em três ao longo do conidióforo. A célula de suporte da fiálide é denominada metula e a célula de suporte da metula se denomina ramo, nas espécies que as apresentam. Estas ramas partem da estipe ou ainda podem partir de outras ramas, agora denominadas de râmulo (figura 3) (PITT, 1985; SAMSON, 2004).

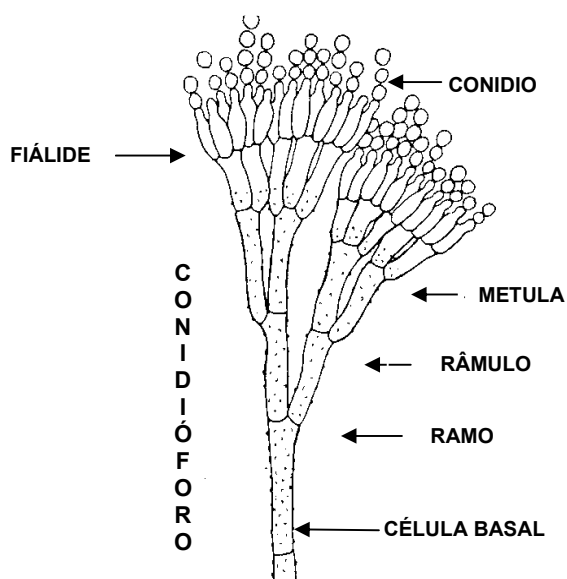


Figura 3. Estruturas características do gênero *Penicillium*.

A morfologia do conidióforo também é responsável pela classificação das espécies de *Penicillium*, que são divididas em quatro subgêneros. Desta maneira, o conidióforo mais simples, que apresenta uma única ramificação desde o conídio até a estipe pertence ao subgênero *Aspergilloides*. Estas espécies apresentam varias fiálides que partem diretamente da estipe. Por outro lado, o conidióforo mais complexo pertence ao

subgênero *Penicillium*. As espécies pertencentes a estes subgênero apresentam todas as estruturas descritas: fiálides, metulas, ramos, com ou sem ramos intermediários, e a estipe. Os demais conidióforos são os chamados biverticilados. Este tipo de conidióforo apresenta, entre o conídio e a estipe nesta ordem, fiálides e metulas.

Os biverticilados englobam dois subgêneros. As espécies de *Biverticillium* apresentam fiálides acerosa, mais estreitas e delicadas que as presentes no resto dos subgêneros, de tamanho similar e longitudinal as metulas. Os conídios deste subgênero podem ser elípticos, o que o diferencia da maioria das espécies dos outros subgêneros. Os conidióforos do subgênero *Furcatum* apresentam metula maior que as fiálides e as fiálides são ampuliformes (PITT, 1985; SAMSON, 2004)

O primeiro e maior uso industrial do gênero *Penicillium*, tem sido a produção da penicilina. A descoberta deste metabólito de *Penicillium notatum* por Alexander Fleming em 1928, fez com que nos anos seguintes aumentasse os estudos no gênero em busca de cepas que apresentavam uma grande produção de penicilina e em busca de novos antibióticos. Algumas espécies de *penicillium* são responsáveis pela elaboração de queijos, devido a produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas, o crescimento do fungo da ao queijo a textura característica. O aroma e sabor se deve aos ácidos graxos livres produzidos na lipólises, aos produtos obtidos da proteólises e a formação de outros compostos aromáticos, entre eles destacam-se cetonas e álcoois. Outras espécies de *Penicillium* são utilizadas industrialmente para a obtenção de enzimas,



principalmente, pectinases, gluco-oxidases, celulases e catalases (DEMAIN, 1999; SAMSON, 2004).

As espécies do gênero *penicillium*, assim como outros fungos, compartilham muitas rotas metabólicas com animais superiores e plantas, possuem ainda a capacidade de sintetizar metabólitos muito complexos, como as benzodiazepinas. Muitos desses metabólitos são similares a moléculas presentes em organismos superiores e alguns são utilizados como fármacos. Estudos recentes citam a capacidade de varias espécies de *Penicillium*, sintetizarem substâncias anticâncer, precursores da pravastatina, fármaco utilizado no tratamento de hipercolesterolemia, entre outros (MELO, 2005; BUENO-GOMES, 2000).

### **3.2.3 O gênero *Trichoderma*: características biológicas e importância**

O gênero *Trichoderma* está amplamente distribuído por todo o mundo e ocorre em quase todos os tipos de solos e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo materias orgânicas (ESPOSITO e SILVA, 1998). Muitas espécies do gênero são também encontradas na rizosfera de muitas plantas. O fato das espécies do gênero se desenvolverem em uma diversidade de substratos e em uma série de condições ambientais torna este grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO e SILVA, 1998).

O conhecimento do que constitui uma espécie do gênero a nível morfológico ainda não está definido, nem mesmo as inter-relações entre as espécies do gênero (SAMUELES, 1996). O fato de que, no gênero *Trichoderma*, as características morfológicas que definem umas espécies serem bastante variáveis, os taxonomistas utilizam o termo de agregado de espécies, sendo definido como grupos morfológicamente muito semelhantes. Rifai (1969) propôs inicialmente nove agregados de espécies, os quais foram elevados ao nível de seção por Bisset (1984; 1991 a, b, e c). Devido ao isolamento de espécies de *Trichoderma* a partir de ascósporos do gênero *Hypocrea*, estes são atualmente classificados como formas anamórficas deste gênero e de gêneros relacionados (SAMUELES, 1996).

As espécies do gênero são caracterizadas por apresentarem crescimento rápido, atingindo de dois a nove centímetros de diâmetro após quatro dias de crescimento em meio de cultura (ESPOSITO e SILVA, 1998). As colônias podem se apresentar dispersas e flocosas ou compactadas em tufo. O tamanho e o formato dos conídios é muito variável e de limitado valor taxonômico. São observados nas espécies de *Trichoderma* a existência de clamidósporos, os quais são esporos assexuais originados pela modificação de segmentos da hifa, podendo ser intercalares ou terminais. Os conídios podem ser verdes, amarelos ou em tons verdes amarelados e ainda incolores. Não existem em *Trichoderma* conidióforos definidos (SAMUELES, 1996), tendo os seus conídios formados na extremidade das fiálides em determinadas hifas diferenciadas. Os conídios tendem a se agregar em massas, sendo estes agregados constituídos de hifas

contendo fiálides (Figura 4). Em algumas espécies do gênero existe uma dependência de luz para esporulação (GRESSEL e HARTMANN, 1968).

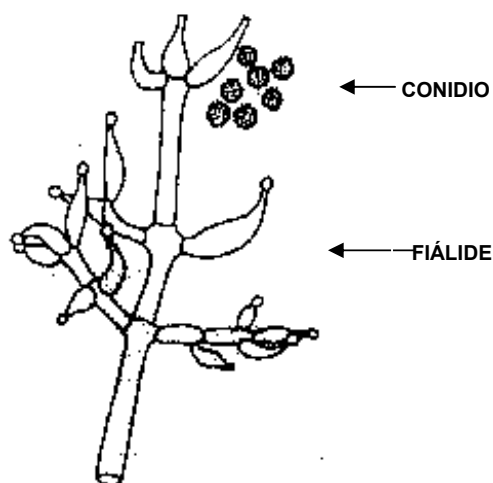


Figura 4. Estruturas características do gênero *Trichoderma*

Os primeiros trabalhos científicos provando a produção de antibióticos por *Trichoderma* spp, foram realizadas por Weidling(1934), que conseguiu identificar os antibióticos gliotoxin e viridin. Já Dennis e Webster (1971 a, b.e c) demonstraram que isolados deste gênero foram capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, com efeito inibitório sobre o crescimento de vários fungos. Entre os metabólitos voláteis, há gases como: etileno e cianeto de hidrogênio, acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono, que afetam o crescimento microbiano.

O gênero *Trichoderma* apresenta um excelente potencial para a aplicação em varias áreas de interesse agrícola, ambiental e industrial. Portanto, um melhor conhecimento da taxonomia, da identificação de espécie, assim como estudos do ciclo de vida, formas de reprodução e recombinação, estudos fisiológicos, bioquímicos entre outros, tornam-se necessários para um melhor aproveitamento do potencial destes fungos nas diversas áreas de interesse (ESPOSITO e SILVA, 1998).

### **3.3 – Antibióticos naturais**

O termo antibiótico deriva da palavra antibiose, este termo foi definido pela primeira vez em 1889 por Vuillemin para designar o fenômeno de antagonismo entre os microrganismos. Nesse processo natural de seleção, um ser vivo destrói um outro para assegurar a própria sobrevivência, sendo o primeiro inteiramente ativo e o segundo passivo; um se opõe, sem restrições, a vida do outro (LANPERT; SANGLIER, 1989; PELCZAR et al, 1997; TAVARES, 2002).

Os antibióticos são substâncias químicas de origem natural ou sintética que matam ou inibem o crescimento de microrganismos na concentração de  $100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  ou menos. São tipicamente compostos do metabolismo secundário de fungos filamentosos e bactérias do grupo dos actinomicetos (BROCK et al, 2000; DEACON, 1997; LANPERT; SANGLIER, 1989).

Estão descritos mais de 3.100 antibióticos, dos quais 2.400 são originários de microrganismos, sabendo-se, no entanto, que a maioria não apresenta toxicidade seletiva e são também tóxicos tanto sobre o parasita quanto ao hospedeiro (JAUREGUI, 1997)

De acordo com as citações de Tavares (2002), o primeiro trabalho científico sobre a atividade dos fungos contra outros microrganismos foi realizado por Ernest Duschesne, em 1897. A partir dessa data descobriu-se que a concorrência biológica entre os microrganismos seria de utilidade profilática e terapêutica.

A identificação da concorrência biológica permitiu novos avanços, a exemplo da descoberta do primeiro antibiótico por Fleming em 1928, a Penicilina, metabólito secundário produzido por *Penicillium notatum*. Na época, a descoberta de Fleming não foi valorizada, pois a atenção da sociedade científica estava voltada para as sulfonamidas, que haviam demonstrado atividade terapêutica contra infecções bacterianas sistêmicas (TAVARES, 2002).

O uso dos antibióticos causou uma revolução na prática médica contribuindo para a busca de novos compostos de maior eficiência e menor toxicidade, como a estreptomicina de uma amostra de *Streptomyces*. Esse antibiótico foi isolado em 1944 por Selman Waskman e Albert Schatz, quando se constituiu no primeiro fármaco revolucionário na terapêutica anti-infecciosa humana e, sobre tudo, por sua ação efetiva contra a tuberculose (TAVARES, 2002).

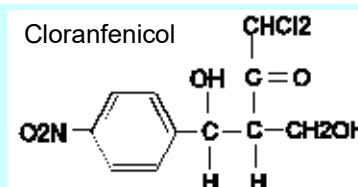
A partir dos estudos bioquímicos dos antibióticos naturais foi possível a obtenção das respectivas fórmulas estruturais o que proporcionou a produção de antibióticos sintéticos. Além disso, o conhecimento da estrutura química e do núcleo ativo permitiu o desenvolvimento de antibióticos semi-sintéticos, dentre os quais, os mais produzidos são os derivados da penicilina, cefalosporina, tetraciclina e eritromicina (TAVARES, 2002).

### 3.3.1 - Classificação dos antibióticos

Os antibióticos podem ser classificados de diversas maneiras, assim Goodman (1996); Katzung (2003); Larpent; Sanglier (1989); Tavares (2002) recomendam a classificação com base na estrutura química, conforme relacionado a seguir:

#### 1 Derivados de aminoácidos

- a) Derivados mono-peptídicos: Ciclocerina
- b) Derivados polipeptídicos
  - b.1) Clássicos: polimixinas
  - b.2) Catiônicos recentes: magaininas
- c) Derivados de aminopropanodiol: cloranfenicol e tianfenicol
- d) Derivados β-Lactâmicos
  - d.1) Penamas: penicilinas
  - d.2) Penemas: ritipeném
  - d.3) Carbapenemas: tienamizina, meropeném, ácidos olivânicos
  - d.4) Cefemas: cefalosporinas e cefamicinas
  - d.5) Oxacefemas: latamoxef
  - d.6) Carbacefenas: locarbef
  - d.7) Inibidores de β-Lactamases: ácido clavulânico, subactam
  - d.7) Monobactâmicos: azetreonan, tigmonam



d.8) Trinemas: sanfetriném

e) Derivados glicopeptídicos: vancomicina e teicoplanina

f) Derivados lipoptídicos: daptomicina

## 2 Derivados de açúcares

a) Heterosídeos macrolídeos: eritromicina, roxitromicina

a.1) Azalídas: azitromicina

a.2) Cetolídeos: telitromicina

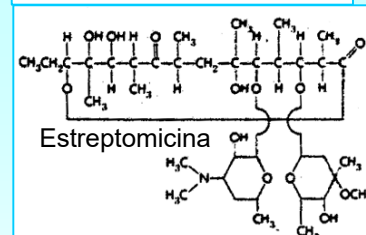
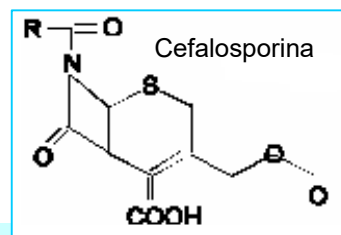
b) Lincosamidas: lincomicina e clindamicina

c) Aminociclitois: estreptomicina, gentamicina, amicasina, neomicina, soframicina, canamicina

d) Glicosídeos ácidos: novobiocina

e) Estreotograminas: pristinamicina, quinospristina, virgiamicina

f) Oligosacarídeos: everninomicinas



## 3 Derivados de Acetato e propionatos

a) Poliênicos: nistatina, anfotericina B, metilpartricina

b) Aromáticos

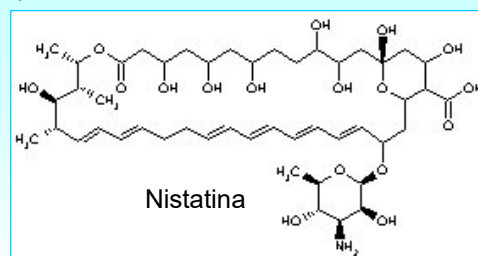
b.1) Tetraciclinas

b.2) Glicoclinas

b.2) Ansaminas: rifamicinas

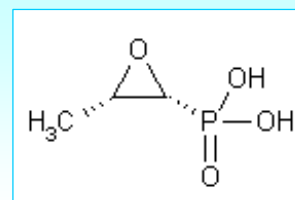
c) Esteróides: ácido fusídico

d) Derivados do grísano: griseofuvina



## 4. Outros

a) Fosfomicina



b)Variotina

c)Mumeidomicinas

d)Equinocandinas

Fosfomicina

Quanto ao efeito sobre os microrganismos, os antibióticos podem também ser classificados em bactericida e bacteriostático (tabela 2). Bactericida são aqueles que provocam alterações incompatíveis com a sobrevivência bacteriana, isto é, matando os microrganismos durante a fase de crescimento logarítmico, onde há aumento da susceptibilidade devido ao aumento da atividade metabólica; ou bacteriostáticos que atuam apenas prevenindo o crescimento microbiano, conseqüentemente inibindo a reprodução bacteriana sem provocar a morte imediata (SILVA, 1998; SOUZA et al., 2003; TAVARES, 2002).

Teoricamente seria possível obter ação bactericida de qualquer antibiótico sobre um microrganismo, desde que a concentração da droga seja aumentada. Entretanto, na prática as concentrações de um medicamento são limitadas por fatores ligados à administração do medicamento, tolerância individual, absorção, distribuição e toxicidade da droga para o hospedeiro. O inverso também é verdadeiro, ou seja, um antibiótico bactericida pode em baixas concentrações ter um efeito apenas bacteriostático (FARMAINDUSTRIA, 1999).

Outro critério de classificação dos antibióticos fundamenta-se na forma de atuação no microrganismo, ou seja, sobre a parede celular, na membrana citoplasmática, na síntese dos ácidos nucléicos e na síntese de proteínas (Tabela 2 e figura 5) (FARMAINDUSTRIA, 1999; PELCZAR, 1997; TAVARES, 2002).



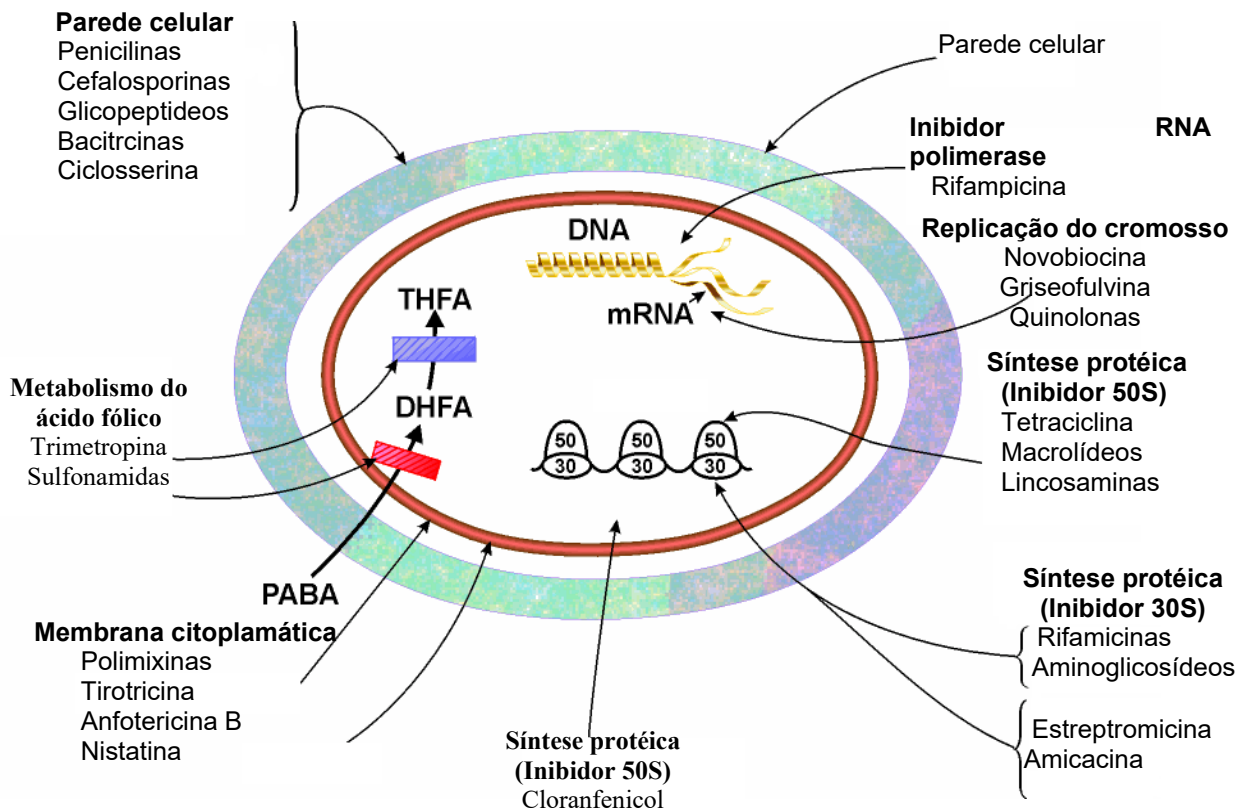


Figura 5 - Seletividade de antibióticos nos respectivos sítios de ação na célula bacteriana.  
 Fonte: JAUREGUI (1997)

Famílias/Grupo	Sítio de ação	Ação biológica	Origem
1 $\beta$ -Lactâmicos* Penicilinas Cefalosporinas Cefamicinas	Parede celular	Bactericida	<i>Penicillium</i> , Semi-síntese <i>Cefalosporium</i> , Semi-síntese <i>Streptomyces</i> , Semi-síntese
2 Aminoglicosídeos	Ribossomos 30S	Bactericida	<i>Streptomyces</i> , <i>Micromonospora</i>
3 Cloranfenicol	Ribossomos 50S	Bacteriostático	<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , Semi-síntese
4. Tetraciclínas*	Ribossomos 50S	Bacteriostático	<i>Streptomyces</i> , Semi-síntese
5 Macrolídeos* Eritromicina 6 Lincosaminas 7 Streptograminas	Ribossomos 50S	Bacteriostático ou Bactericida	<i>Streptomyces</i>
8 Polipeptídeos	Membrana citoplasmática	Bactericida	<i>Bacillus</i>
9 Rifamicinas*	RNA polimerase	Bactericida	<i>Streptomyces</i> ; <i>Nocardia</i>
10 Quinolonas*	DNA girase	Bactericida	Síntese
11 Sulfonamidas* 12 Trimetroprima	Inibidores competitivos do metabolismo	Bacteriostática	Síntese
13 Vancomicina 14 Novobiosina 15 Fosfomicina	Parede celular	Bactericida	<i>Streptomyces</i>
16 Ácido fusídico 17 Nitrofuranas	DNA	Bacteriostática	<i>Fusidium</i> ; Síntese

\* Antibióticos de maior comercialização mundial.

Tabela 2. Classificação dos antibióticos segundo o sítio de ação e atividade biológica. (PELCZAR et al., 1997; TORTORA et al., 2001)

### **3.3.2 – Resistência bacteriana**

#### 3.3.2.1 Histórico

Com a descoberta da penicilina em 1929, Fleming se tornou primeiro observador da resistência natural dos microrganismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias do grupo colitifoide e *Pseudomonas aeruginosa* não eram inibidas pelos antibióticos. O advento do uso clínico de sulfonamidas, em 1933, levou a constatação de que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies de bactérias ou ser adquiridas por cepas individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 2002).

No ano de 1944 foi demonstrado que algumas linhagens de *Staphylococcus aureus* eram capazes de inativar a penicilina G devido a produção de uma enzima chamada de penicilinase que bloqueia a ação da penicilina no organismo humano (BRODY, 1997).

Em estudos realizados por dois microbiologistas japoneses na década de 50 foram isoladas linhagens de bactérias patogênicas conhecidas por *Shigella dysenteriae* de pacientes com disenteria bacilar. Com esta pesquisa, eles verificaram que algumas destas cepas foram resistentes a sulfonamidas, tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol. E assim concluíram que a resistência não era causada por alteração cromossômica, mas devido a um DNA extracromossômico transmissível hoje chamado de plasmídeo (PELCZAR, 1997).

### 3.3.2.2 Conceitos e classificação

A resistência bacteriana ocorre quando bactérias são capazes de crescer, *in vitro*, nas concentrações terapêuticas que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrado por via oral (TRABULSI,2002).

Esta resistência também pode ser definida como um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos, os quais codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas.

A resistência pode ser natural, quando os genes de resistência fazem parte do código genético do microrganismo, ou adquirida, quando os genes de resistência não estão normalmente presentes no código genético do germe, sendo a ele incorporados (SAUNDERS, 1984).

Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antimicrobianos, chamada também de resistência primária, pois somente concentrações inviáveis *in vivo* exerceriam efeitos sobre elas (FUCHS,1998).

A resistência natural a uma determinada droga é uma característica necessária à autodefesa nos microrganismos produtores desta droga (CUNDLIFFE, 1984). Assim esta característica é hereditária sendo transmitida às células filhas, através da ação de genes cromossômicos que determinam na célula bacteriana a ausência de receptores para a ação dos antibióticos ou a existência de estruturas ou mecanismos que impedem a ação da droga (DAVIES; BENVENISTE,1984).

Um outro tipo de resistência é conhecido como resistência adquirida, no qual ocorre do surgimento o fenômeno da resistência a um ou a vários antimicrobianos numa população bacteriana primitivamente sensível a estes mesmos antimicrobianos, tratando-se de uma propriedade nova que surgem em espécies bacterianas que em um determinado momento não sofrem mais ação de drogas que antigamente eram efetivas contra esta população (MURRAY, 1983).

A resistência adquirida ou secundária também tem uma origem genética decorrente de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula, que bloqueiam a ação dos antimicrobianos. Este tipo de resistência é o mais importante devido à crescente participação de microrganismos com resistência adquirida na origem de quadros clínicos infecciosos (TRABULSI, 2002).

Enquanto a resistência natural não possui grande significado prático, pode ser previsível e constante, bastando-se conhecer o espectro de ação de um antibiótico para evitá-la, por outro lado à resistência adquirida é a causa de importantes problemas clínicos, devido o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (TAVARES, 2002).

Existem outros conceitos importantes no estudo da resistência bacteriana, podendo destacar a resistência simples, no qual o microrganismo é resistente a uma só

droga. Resistência múltipla quando o germe é resistente a duas ou mais drogas e existe também a resistência cruzada que é um mecanismo bioquímico de resistência a uma droga é o mesmo para outras (TRABULSI, 2002).

### 3.3.2.3 Mecanismos de resistência bacteriana

#### 3.3.2.3.1 Mecanismos de resistência natural

Um dos mecanismos de resistência natural das bactérias é a impermeabilidade à droga, pois existe no microrganismo estruturas que impedem que o antibiótico se ligue a seu receptor específico, como por exemplo, os bacilos Gram-negativos que apresentam uma composição própria das membranas externas da sua parede celular impedindo desta forma que a penicilina G atravesse esta estrutura e possa se ligar ao seu receptor (MURRAY, 2000).

Esta resistência natural pode ser observada entre as espécies de micoplasmas, no qual devido à ausência de parede celular, os antibióticos beta-lactâmicos não podem agir, pois esses microrganismos não apresentam um local de ação para estes antibióticos. Um outro exemplo são as bactérias Gram-negativas resistentes aos macrolídeos, que devido a ausência de um receptor específico nos ribossomas, os antibióticos citados não podem ter uma ação eficaz contra estas bactérias (TAVARES,2002).

O efeito mais importante dos antibióticos na resistência do hospedeiro talvez seja a sua ação na flora normal. A administração excessiva de antibióticos pode remover os efeitos inibidores exercidos pela flora normal sensível ao agente. Podendo permitir o estabelecimento de microrganismos de origem exógena ou o crescimento excessivo de microrganismos endógenos (CRAIG,1994).

#### 3.3.2.3.2 - Mecanismos de resistência adquirida

O estudo dos mecanismos de resistência adquirida às drogas vem apresentando notável avanço nos últimos anos, mostrando um resultado melhor sobre o conhecimento da estrutura e da genética microbiana. A aquisição da resistência por uma célula bacteriana sensível ocorre sempre de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente, e esta alteração pode ser determinada por mutações no cromossoma bacteriano ou pela transferência de genes de resistência de uma célula para outra inserindo na célula receptora fragmentos do DNA contendo genes de resistência (TAVARES, 2002).

A resistência por mutação ou também chamada cromossômica é geralmente específica a um antimicrobiano, pois dificilmente uma bactéria sofre mutações simultâneas para dois ou mais antibióticos. A mutação é um fenômeno espontâneo possível de acontecer no momento da divisão celular, pois é caracterizado por uma modificação genética súbita e estável, transmissível hereditariamente. Porém é um processo raro que ocorre na frequência de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  de produção de bactérias mutantes resistentes a um determinado antibiótico (SILVA,2002).

O mecanismo de resistência adquirida através da mutação pode ser observado na resistência à estreptomicina (mutação ribossômica), quinolonas (mutação gene girase), rifampicina (mutação do gene da RNA-polimerase) e também constitui a base da resistência a agentes antituberculosos que ocorre em *Mycobacterium tuberculosis*. Em outros casos, bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* quando expostas a rifampicina originam mutantes altamente resistentes em consequência de uma mutação que ocorre em uma única etapa na RNA-polimerase, de modo que a proteína não se liga ao fármaco.

A outra forma das bactérias adquirirem resistência é a chamada de resistência transferível no qual o material genético e os plasmídios podem ser transferidos através dos seguintes mecanismos: transformação, transdução, conjugação e transposição (PAGE, 1999).

O mecanismo de transformação ocorre quando uma célula receptora capta DNA proveniente do cromossoma ou plasmídeo liberado no meio por uma bactéria doadora. A transformação é um mecanismo possível de aquisição de resistência, pois uma bactéria pode incorporar ao seu material genético os genes de resistência existentes em outra bactéria (TAVARES, 2002).

No processo da transdução o DNA bacteriano é transferido de uma célula doadora para uma célula receptora dentro de um vírus que infectam bactérias,



denominados bacteriófagos ou fagos. Este tipo de transferência de resistência foi descrita pela primeira vez em 1952 por Zinder e Lederberg entre *Salmonellas*. Porém, o processo de transdução é limitado, pois somente ocorre entre bactérias da mesma espécie (TORTORA, 2002).

A transdução pode ocorrer de duas formas: transdução generalizada, onde qualquer gene pode ser transferido sendo que o vírus transporta basicamente DNA bacteriano e a outra forma é a transdução especializada, no qual ocorre transferência de genes bacterianos específicos que estão localizados próximos do sítio de integração viral. (TRABULSI, 2002).

Outro mecanismo de transferência é a conjugação, onde há necessidade de contato físico entre as células doadoras e receptoras realizado por uma organela denominada fímbria sexual que estabelece conexões entre duas células bacterianas do mesmo gênero ou de gêneros diferentes e também através do contato direto célula a célula (SILVA, 2002).

A fímbria sexual é formada pela bactéria doadora que possui um plasmídeo ou fator F, no qual ocorre a passagem deste plasmídeo para a célula receptora através das fímbrias presentes nesta célula.

Assim a fímbria sexual serve como porta de entrada de material genético na conjugação, esta forma de transferência pode ser observada entre os bacilos Gram-

negativos. Além do fator F (fertilidade) também foi descrito o fator R que transportam genes que tornam os portadores resistentes à certos antibióticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

A transferência pelo contato célula a célula é observada entre os cocos Gram positivos onde a célula doadora secreta uma substância chamada de feromônio. O processo ocorre através da adesão e a agregação das células doadoras com as células receptoras, possibilitando a transferência de plasmídios (TAVARES, 2002).

O último mecanismo de transferência é o da transposição, em que ocorre uma troca de seqüências curtas de DNA que somente transportam alguns genes entre um plasmídeo e outro ou entre um plasmídeo e uma porção do cromossomo bacteriano no interior de uma célula bacteriana (PAGE, 1999).

Esta transferência acontece através de transposons, pequenos segmentos de DNA que possa se mover de uma região de uma molécula de DNA para outra. Os transposons são também chamados de genes saltadores e não são capazes de replicar-se isoladamente, dessa forma os transposons ao se incorporarem em plasmídeo ou no cromossomo bacteriano podem manter-se estáveis e replicar-se junto com o DNA do receptor (TORTORA, 2002).

#### 3. 3. 2.3.3. Resistência extracromossômica

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos constituídos de uma fita dupla de DNA circular, que possui a capacidade de auto-replicação independente do cromossomo bacteriano. Este DNA extracromossômico contém genes que conferem à célula características biológicas adicionais, entre as quais a expressão de resistência aos antimicrobianos, conhecidos como plasmídeo R (SILVA, 2002).

Existem outras formas de plasmídeo que podem apresentar determinantes genéticos que aumentam a virulência do microrganismo (plasmídeo de virulência), codificam a produção de toxinas, a aderência da bactéria e a capacidade invasiva do germe (TAVARES, 2002).

O primeiro plasmídeo a ser descrito é o chamado de fator sexual ou fator F, hoje conhecido como plasmídeo conjugativo. Estes são capazes de transferir cópias de DNA à células receptoras através de uma estrutura filamentosa denominada fímbria ou pilus sexual. A existência de plasmídios conjugativos permite a bactéria transmitir características genéticas tanto a sua progênie quanto as bactérias com quem faz o processo de conjugação (TRABULSI, 2002).

Os fatores R ou plasmídeos de resistência foram descobertos no Japão, no final da década de 50, após várias epidemias de disenteria. No qual, em algumas destas epidemias o agente infeccioso era resistente ao antibiótico utilizado e a uma série de antibióticos diferentes. Estes pesquisadores também descobriram que a resistência adquirida por cepas de *Escherichia coli* da flora normal foi transferida através da

disseminação de genes de um organismo para outro, e por isso os plasmídeos que mediaram esta transferência foram chamados de fatores R (TORTORA, 2002).

A maioria das espécies bacterianas patogênicas para o homem apresenta plasmídeos que contêm genes que conferem resistência a um ou a vários antimicrobianos, que podem existir de maneira autônoma ou integrados a plasmídeos conjugativos. Quando isolados os plasmídeos de resistência são transmitidos apenas aos descendentes da célula bacteriana, porém os plasmídeos R integrados com plasmídios conjugativos podem ser transmitidos a outras bactérias através do mecanismo de conjugação (TAVARES, 2002).

Cada gene de resistência ao antibiótico do plasmídeo R codifica uma enzima que destrói ou inativa um determinado antibiótico. Muitas cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de hospitais contêm um plasmídeo R apresentando um gene que codifica a beta-lactamase (enzima que inativa muitas penicilinas) (TRABULSI, 2002)

Em muitos casos, a resistência de várias bactérias mediadas por plasmídeos à antibióticos utilizados, torna difícil o tratamento das infecções por estes medicamentos. Assim o uso indiscriminado dos antibióticos no tratamento de pacientes pode aumentar a incidência de bactérias resistentes à vários antibióticos (PELCZAR, 1997).

#### 3.3.2.3.4. Resistência bacteriana por mecanismos bioquímicos

As bactérias podem apresentar diferentes tipos de mecanismos bioquímicos que resultarão em resistência a certos antimicrobianos. Os principais mecanismos são: inativação da droga por enzimas, alteração da permeabilidade bacteriana à droga e modificação do sistema metabólico ativo para à droga (TRABULSI, 2002).

Um dos mais importantes processos bioquímicos é a produção de enzimas que destroem ou inativam o fármaco. Esta inativação enzimática foi descrita pela primeira vez por Abraham e Chain, 1940 ao desenvolverem a partir de culturas de *Escherichia coli* uma enzima capaz de inativar a ação da penicilina, chamada de penicilinase. As enzimas beta-lactamases catalisam a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas e outros beta-actâmicos transformando esses antibióticos em produtos inativos. Assim, as bactérias que apresentam concentrações significativas dessa enzima são resistentes a muitas penicilinas e cefalosporinas (BRODY, 1997).

A inativação enzimática dos aminoglicosídeos constitui o principal mecanismo de resistência das bactérias a estes antibióticos. As enzimas inativadoras são codificadas em genes presentes em transposons ou plasmídeos, estas enzimas modificam as moléculas dos aminoglicosídeos reduzindo suas atividades de fixação às proteínas ribossômicas e são classificadas em três grupos: Fosfo-transferases, adenil-transferases e acetil-transferases (TRABULSI, 2002).

A resistência bacteriana ao cloranfenicol deve-se a síntese também de uma enzima que inativa este fármaco, denominada cloranfenicol acetil-transferase (CAT). A

produção desta enzima é freqüentemente mediada por plasmídios, por transposons ou por origem cromossômica. A ação das enzimas modificadoras ocorre no meio intracelular obtendo como resultado a incapacidade do antibiótico ligar-se ao ribossoma bacteriano perdendo desta forma a capacidade de exercer a atividade antimicrobiana (SHAW, 1984).

O mecanismo da alteração da permeabilidade apenas acontece nas bactérias gram-negativas resultando em uma diminuição da permeabilidade da membrana externa, através de alterações ou perda de uma ou mais proteínas porinas. Assim as bactérias Gram-negativas representam um desafio a entrada das drogas, favorecendo apenas as drogas lipofílicas ou aquosas de baixo peso molecular que são capazes de penetrar através dos canais das porinas (SILVA, 2002).

Alterações nestas proteínas porinas ou na membrana externa podem resultar em resistência devido a uma permeabilidade reduzida aos antibióticos. Outras alterações podem ocorrer na parede celular das bactérias que levam também a uma redução na permeabilidade para a entrada de um antibióticos ou vários na célula bacteriana, desta forma surge a multi-resistência (PAGE, 1999).

As mutações também afetam as membranas citoplasmáticas das bactérias, reduzindo a diferença de potencial da membrana e como consequência ocorre a diminuição da entrada de aminoglicosídeos nestes microrganismos. Este é o principal mecanismo de resistência de bactérias patogênicas à amicacina (TRABULSI, 2002).

Um exemplo importante de resistência bacteriana através das alterações em receptores de ação dos antibióticos foi observado em 1988 quando cepas de *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* mostraram-se resistentes a vancomicina devido a presença de um gene que promove a formação de um novo precursor do peptidoglicano da parede bacteriana. Pois este antimicrobiano atua bloqueando a síntese da parede celular das bactérias sensíveis através da ligação a precursores de peptídicos que irão constituir o peptidoglicano, impedindo a formação deste elemento fundamental da parede bacteriana (TAVARES, 2002).

### **3.4 – Doenças infecciosas**

Infecção é o processo pelo qual um agente biológico penetra, desenvolve-se ou multiplica-se no organismo de outro ser vivo. O processo pode ser inaparente ou evoluir com manifestações clínicas. Doença Infecciosa é a denominação mais encontrada em clínica e em patologia, reflete a existência de um processo biológico produzido por um agente infeccioso.

As doenças infecciosas são indubitavelmente as mais freqüentes na população humana. Contudo, nos últimos cinquenta anos, a investigação médica e farmacêutica conquistou importantes vitórias contra as doenças infecciosas. Com a produção industrial da penicilina e a vacinação em massa, muitas doenças deixaram de constituir

uma ameaça para a vida humana. Mas isto não significa que a guerra tenha terminado. A fronteira da investigação continua aberta, confrontando-se com desafios cada vez mais importantes e, no terceiro milênio, este desafio entra numa fase crucial. O aparecimento recente da AIDS, o recrudescimento epidemiológico da tuberculose, a expansão de doenças bacterianas raras, a propagação de novas infecções virais e a crescente resistência de numerosas bactérias aos antibióticos, representam uma séria e real ameaça à saúde pública.

### **3.4.1 Tuberculose**

#### **3.4.1.2 Agente Transmissor**

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pela *Mycobacterium tuberculosis*. Trata-se de uma micobactéria do tipo bacilo delgado, aeróbico obrigatório. As micobactérias são relativamente resistentes aos procedimentos convencionais de coloração. As células coradas com carbol fucsina não podem ser descoradas com álcool ou ácido, e assim esses microrganismos são denominados bacilos álcool-ácido-resistentes (TORTORA, 2000).

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família *Mycobacteriaceae*, apresenta-se na forma de bacilos curvos ou retos, com 0,2 a 0,7 µm de largura por 1,0 a 10,0 µm de comprimento e possui a propriedade de álcool-ácido resistência, devido a grande quantidade de lipídios presentes em sua parede celular (figura 3).



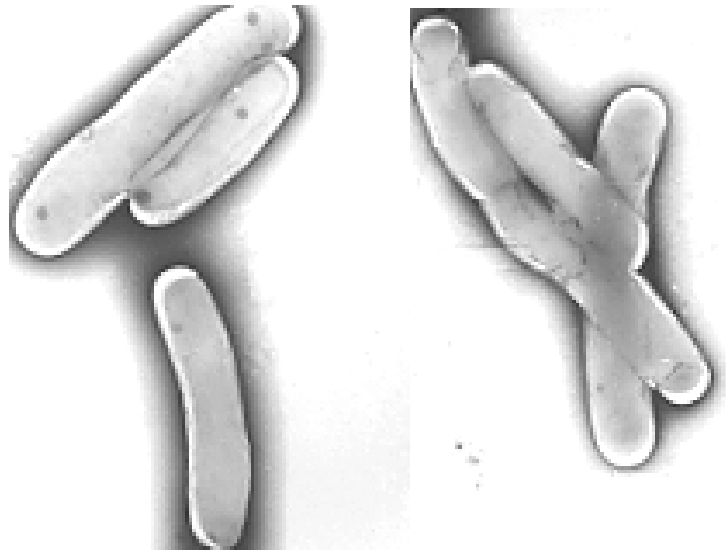


Figura 6 - *Mycobacterium tuberculosis*: característica morfológica.

São aeróbios e classificados de acordo com o seu tempo de crescimento, sendo considerados de crescimento rápido quando requerem menos de 7 dias para produzir colônias visíveis, e de crescimento lento, aquelas que requerem mais de 7 dias para produzir colônias visíveis quando inoculadas em meios de cultura sólidos (KONEMAN *et al*,2001; AL-HAJJAJ *et al.*,2001; BARRETO *et al.*,1994; FREIRE,1989; HART *et al.*,1996).

A parede celular das micobactérias é formada de ácidos graxos, chamados de ácido micólicos e ceras. Calcula-se que esses componentes representem 60 % do peso celular (TRABULSI *et al*, 2002).

As micobactérias têm hábito intracelular facultativo, se proliferam no interior dos macrófagos, o que as torna resistentes a drogas de pouca penetração (KATZUNG, 2001).

### **3.4.2 Quimioterapia da Tuberculose**

O esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) em 1979 é composto por isoniazida, rifampicina e pirazinamida, durante dois meses e isoniazida e rifampicina mantidos por mais quatro meses (Esquema I) (BRASIL. Ministério da Saúde, 1999; TELLES et al.1997; VERONESI & FOCACCIA,1996).

O tratamento pode ser dividido em duas fases, a primeira chamada de ataque e a segunda de manutenção sob a finalidade de evitar resistência microbiana e persistência bacilar (BRASIL. Ministério da Saúde, 2002; DINIZ *et al.* 1995).

As drogas têm locais diferentes de ação, a rifampicina (RMP) e isoniazida (INH) são eficazes em população bacilares de crescimento rápido, já em populações bacilares intracelulares o emprego da pirazinamida (PZA) é fundamental (BRASIL.Ministério da Saúde, 2002). No fracasso do esquema I é indicado o esquema de retratamento (Esquema IR) que é composto por Rifampicina (RMP), Isoniazida (INH), Pirazinamida (PZA), Etambutol (EMB), durante dois meses e Rifampicina (RMP), Isoniazida (INH) e Etambutol (EMB) durante quatro meses. Caso os esquemas I e IRI venham a falhar é possível instalar o esquema III, composto por Estreptomicina (SM), Etionamida (ETH), Etambutol (EMB), Pirazinamida (PZA), que compreendem três meses e a segunda fase

é composta por Etionamida (ETH) e Etambutol (EMB) durante nove meses (SCHECHTER, 2001).

A resistência do *M. tuberculosis* aos medicamentos utilizados relaciona-se as mutações genéticas das populações bacilares, variando normalmente de acordo com a droga. Quanto mais drogas forem utilizadas de forma inadequada, mais resistência irá aparecer. A multiresistência é estabelecida no Brasil, como a falência dos esquemas I e III e ou resistência a importantes drogas usuais como RMP, INH, SM, EMB e ou PZA (JARDIM et al. 2001).

O aparecimento de inúmeras cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* é alarmante, tendo em vista que poucos fármacos efetivos enquadram o arsenal terapêutico para tuberculose. Em pesquisa realizada no *Centers for Disease Control - CDC* durante o primeiro trimestre de 1991, foram encontrados isolados de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a, no mínimo, uma droga antituberculosa em 14,9% dos casos; 3,3% dos isolados eram resistentes a isoniazida e rifampicina.

Em certas localidades, sobretudo na cidade de Nova York, foram recuperadas cepas resistentes a, no mínimo, uma droga, incluindo resistência emergente as fluoroquinolonas, em 33% dos casos, e a incidência a isoniazida e a rifampicina foi de 19%. A evolução aleatória da resistência das micobactérias às drogas independe da exposição aos agentes antimicrobianos (KONEMAN et al. 2001; KRITSKI et al., 1993; LEITE et al., 1995; OLIVEIRA, 1994; ISEMAN, 1993).

Quando da associação tuberculose/Aids, a resistência do bacilo da tuberculose aos diferentes fármacos utilizados, está diretamente relacionada com a influência dirigida pela imunodeficiência gerada pelo HIV. A depleção dos linfócitos T e conseqüentemente de linfócitos T auxiliares CD4+, a inibição de resposta proliferativa e estímulos mitogênicos ou antigênicos desencadeados por proteína transmembrana gp41, diminuição gradual de reação de sensibilidade ao teste tuberculínico, linfócitos TCD4 inferior a 50 mm<sup>3</sup>, inúmeros fatores que cooperam para o comprometimento da tuberculose (TIERNEY JR *et al.*, 2001).

### **3.4.3 Problemática da tuberculose**

A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa grave, com relatos de médicos, na Grécia e na Roma antiga e, atualmente, acredita-se que esta doença já era conhecida também no antigo Egito, já que os pesquisadores encontraram lesões de tuberculose, em múmias. No entanto, somente em 1882, a bactéria responsável pela doença, a *Mycobacterium tuberculosis*, foi isolada pelo cientista alemão, Robert Koch; em sua homenagem, o bacilo da tuberculose ficou conhecido como bacilo de Koch (BK) (SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

A doença milenar, até meados do século XX, era comum entre artistas e intelectuais, sendo relacionada a um estilo de vida boêmio considerada, uma "doença romântica". Atualmente, sabe-se, que muitos são os fatores contribuintes, podendo destacar-se, a desigualdade social, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios e o envelhecimento da população. No entanto, a partir da década de 80,

voltou a ocupar papel de destaque, entre as principais doenças infectocontagiosas preocupando as autoridades de saúde, não só dos países do terceiro mundo, onde ela sempre esteve presente, por ser considerada "doença de pobre", mas também dos países desenvolvidos, chamados de primeiro mundo (SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

A tuberculose é considerada um problema de saúde pública de relevância mundial. Estima-se que, em 1990, adoeceram em todo o mundo 8 milhões de indivíduos por tuberculose e morreram entre 2,6 a 2,9 milhões de pessoas. Diante desse quadro, em 1993, a Organização Mundial de Saúde – OMS recomendou que os países adotassem procedimentos severos de contenção da endemia (MS, 1994; 1998; 2002a).

A divulgação dos números da Conferência Ministerial sobre a Tuberculose e o Desenvolvimento Sustentável, em março de 2000, em Amsterdã (Holanda) é dramática, reflete uma realidade tão comum quanto cruel: a tuberculose é o espelho da injustiça social entre os países (LAGOEIRO, 2000).

Em 2001, de acordo com o Ministério da Saúde (2003), o número de casos notificados de tuberculose no Brasil foi 82.866 e o coeficiente de incidência de 48,0/100.000 habitantes. No mesmo ano, o número de óbitos foi 5.396 e o coeficiente de mortalidade de 3,1 por 100.000 habitantes. Segundo o Ministério da Saúde (2002) a taxa de abandono do Brasil é de 12%.

As regiões Sudeste e Norte do Brasil são as regiões que mais produzem notificações de Tuberculose, tendo apresentado no ano de 2001 um coeficiente de incidência de 55,07 e de 51,66 por 100.000 habitantes, respectivamente. O estado do Amazonas tem importante contribuição neste quadro, tendo registrado um coeficiente de incidência de 74,8 por 100.000 habitantes no ano de 2000 (SINAN, 2003) e 83./100.000 habitantes no ano de 2001 (MS,2003), período em que o coeficiente nacional foi 48,0/100.000 habitantes.

A tabela 3 aponta os municípios que apresentaram incidência maior que a nacional no ano de 2000. A precariedade da informação sobre a tuberculose no Amazonas vem de longa data. Há demonstração da elevada proporção de municípios (30,6% em média) sem notificação da doença nos anos de 1993, 1994 e 1995 (MARREIROS et al, 1997).

No ano de 2000, dos 62 municípios do estado, apenas um não estava cadastrado no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Dos notificantes, 8% apresentaram coeficientes de incidência de tuberculose superiores ao do estado (acima de 74,78 por 100.000 habitantes); 13% apresentaram coeficientes de incidência abaixo das médias do estado, mas superiores aos valores nacionais; 61% apresentaram coeficientes que variam entre 3,0 e 47,5 por 100.000 habitantes e 18% não notificaram nenhum caso.

Os municípios de São Gabriel da Cachoeira, Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga e Manaquiri, no Estado do Amazonas, estão entre os municípios do interior do estado que apresentam coeficientes de incidência maiores que os do estado. Com exceção do último, todos os outros são municípios com presença marcante de indígenas em sua população.

Município	POP	Casos	C I	Masculino			Feminino		
				POP	Casos	C I	POP	Casos	C I
S. Gabriel da Cachoeira	29.947	57	190,3	15.455	27	174,7	14.492	30	207,0
Manaus	1405.835	1.598	113,7	68.544	934	1362,6	720391	664	92,2
Manaquiri	2.711	3	110,7	6.710	1	14,9	6.001	2	33,3
Sta Isabel do Rio Negro	10.561	11	104,2	5.567	7	125,7	4.994	4	80,1
Tabatinga	37.919	32	84,4	19.297	19	98,5	18.622	13	69,8
Novo Airão	9.651	7	72,5	4.959	5	100,8	4.692	2	42,6
Tefé	64.457	42	65,2	32.945	25	75,9	31.512	17	53,9
Atalaia do Norte	10.049	6	59,7	5.229	-	-	4.820	6	124,5
Beruri	11.038	6	54,4	5.831	3	51,4	5.207	3	57,6
Itacoatiara	72.105	38	52,7	37.095	23	62,0	35.010	15	42,8
Humaitá	32.796	17	51,8	17.133	11	64,2	15.663	6	38,3
Parintins	90.150	46	51,0	46.165	20	43,3	43.985	26	59,1
Santo Antonio do Içá	28.213	14	49,6	14.707	6	40,8	13.506	8	59,2

Tabela 3 - Casos de incidência da tuberculose por sexo e por 100.000 habitantes nos municípios do estado do Amazonas, 2000

- CI-Coeficiente de incidência

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN-2003

### 3.5 - Ensaios de Atividade Antimicrobiana

#### 3.5.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios para verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* seguem diferentes técnicas e métodos, como por exemplo:

1 - Métodos de difusão em ágar: a substância pesquisada é colocada em um reservatório, podendo este ser disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície, em contato com meio de cultura sólido previamente inoculado com o microorganismo teste. A leitura, que é qualitativa, é realizada após o período de incubação, medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano formado.

2 - Métodos de diluição: uma quantidade de amostra é dissolvida homogeneamente em um meio sólido ou líquido. São feitas diluições da amostra original, inoculando-se o microorganismo teste. A leitura é realizada pós o período de incubação considerando a primeira diluição em que não se observa turvação. Através deste método, que é quantitativo, pode-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, este método também possui a vantagem de ser utilizado tanto por amostras hidrossolúveis como lipossolúveis. Os métodos de diluição *in vitro* detectam possíveis atividades antimicrobianas de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico.

3 - Métodos de bioautografia: a amostra complexa é eluída em cromatografia em camada delgada e posteriormente imersa em um meio de cultura sólido fundido previamente inoculado com o microorganismo teste. Após o período de incubação verifica-se a formação do halo de inibição no composto com atividade antimicrobiana



presente na amostra. (COWAN, 1999; ELLOF, 1998; HAMBURGER et al., 1987; ISENBERG, 1992; KONEMAN et al., 1997; SOUZA et al., 2003).

Os microrganismos testados são preferencialmente cepas padronizadas, podendo ser utilizados microrganismos isolados de materiais biológicos. Geralmente são selecionados gêneros e espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos (SOUZA et al., 2003).

### **3.6- Teste de Toxidez Frente à Microcrustáceos**

Os laboratórios de produtos biotecnológicos, sejam de origens naturais ou de síntese orgânica têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento ou monitoramento, diversos ensaios biológicos simples. Geralmente, esses ensaios são pouco viáveis em laboratórios de química, pois estes não estão devidamente equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais tecidos ou órgãos isolados, fazendo-se necessário realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos (CAVALCANTE et al., 2000).

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida, e os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxidez geral e, portanto

é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (SIQUEIRA et al., 1998).

Dentre esses bioensaios, encontra-se a toxidez sobre *Artemia salina* Leach (TAS), que se caracteriza por ser de baixo custo e rápido. A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizada como alimento vivo para peixes. O primeiro trabalho relativo ao uso da TAS em bioensaios foi para avaliar resíduos de pesticidas. E a partir daí, inúmeros artigos têm sido publicados na literatura em estudos ambientais, utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas (SIQUEIRA et al, 1998).

### **3.7 - Métodos Cromatográficos para identificação de substancias bioativas**

De modo geral, as técnicas cromatográficas são de larga aplicação em química e bioquímica, na pesquisa e na indústria. Segundo Collins e Bonato (1990) estas técnicas variam desde as de extrema simplicidade, que podem ser facilmente manipuladas por não-peritos, até as de alta sofisticação, realizadas somente por especialistas. Entre estes dois extremos existem muitas variações de maior ou menor complexidade.

Os termos “cromatografia”, “cromatogramas” e “métodos cromatográficos” são atribuídos ao botânico Mikhael Semenovitch Tswett, que em 1906, utilizou-os em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, onde usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos,

finamente divididos, e arrastou os componentes com éter de petróleo. O nome deriva-se das palavras gramas “chrom” (cor) e “graphe” (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto para visualização dos componentes separados.

Dentre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, sozinha ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS e BONATO, 1990).

A cromatografia é uma técnica de separação de moléculas ou íons, baseada na diferença das suas estruturas e/ou composições. Em geral, a cromatografia envolve diferentes interações dos materiais a serem separados (fase móvel) com um suporte estacionário (fase estacionária). As partículas que interagem mais fortemente com o suporte tenderão a mover-se mais lentamente através dele do que aquelas que apresentam interações de menor intensidade. Assim, diferentes tipos de partículas podem ser separadas umas das outras à medida que se movem no suporte material.

Entretanto, considera-se a classificação mais importante aquela que baseia-se no mecanismo de separação, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos. Os processos físicos são de sorção-adsorção (partição) e são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals), incluindo a formação das pontes de hidrogênio.

Quando se trata de um sólido, como sílica ou alumina, como fase estacionária, a adsorção do soluto ocorre na interfase entre o sólido e fase móvel, devido a presença de grupos ativos nas superfícies. A dessorção do soluto implica na volta deste a fase móvel. Este é o mecanismo mais comumente encontrado em cromatografia de camada delgada (CCD), em cromatografia gás-sólido (CGS), cromatografia líquido-sólido (CLS) e cromatografia supercrítica em fase estacionária sólida (CSS).

De fato, a cromatografia tem como finalidades a purificação ou a detecção de vestígios de qualquer substância solúvel ou volátil sendo a sua eficiência dependente das condições de operação e de adequados material adsorvente e fluido transportador. Estas performances tornaram a cromatografia numa técnica de excelência em áreas como a Biotecnologia e a Petroquímica.

### **3.7.1 – Cromatografia por adsorção**

Empiricamente considera-se a cromatografia quando se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material que está em excesso na fase móvel e estacionária. Esta cromatografia em coluna (adsorção) pode ser primeiramente escolhida por ser tecnicamente mais simples não exigindo instrumentação esmerada. Dependendo do tamanho da coluna usada é facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorada, principalmente, por

cromatografia em camada delgada. A fase móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quando mais fracamente o componente for adsorvido mais rápido é sua passagem pela coluna, e vice versa. Portanto, conclui-se, que quanto maior a diferença entre coeficientes de adsorção mais completa será a separação do composto (terá maior grau de pureza). A separação dos componentes de uma mistura é devido às diferenças nas forças de adsorção (forças eletrostáticas de van der waals) entre eles e o adsorvente (COLLINS e BONATO, 1990).

### **3.7.2 – Cromatografia em Camada Delgada - CCD**

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial obre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica teve inicio com os trabalhos de Izmailov e Shraiber em 1938, sendo que somente a partir da década de 60 passou a ser largamente utilizada, de tal forma que hoje é praticamente indispensável em qualquer laboratório que envolva análise de substancias orgânicas ou organometálicas.

A grande vantagem dessa técnica é a consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser

de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada adsorvente e da amostra em análise (COLLINS e BONATO, 1990).

O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Entretanto, usando fases estacionárias tratadas pode ocorrer também por partição ou troca iônica, que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas. A CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende a separação rápida e identificação visual. Ela tem demonstrado ser de valor extraordinário na análise de substâncias orgânicas e inorgânicas, acompanhamento de reações em síntese e de processos de purificações. Seria muito difícil relacionar todas as aplicações da CCD; mais fácil seria citar que ela está presente em quase todos os laboratórios de química e de biologia, a existência de diferentes fases moveis e estacionárias, diferentes técnicas de desenvolvimento e visualização, a sua rápida execução, a sua reprodutibilidade e a seu custo elevado (COLLINS e BONATO, 1990).

### **3.7.3 Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas - CG/EM**

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados, utilizando a técnica denominada "Cromatografia Gasosa". A separação baseia-se na diferente distribuição da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A cromatografia gasosa é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, análises de dezenas de substâncias presentes em uma mesma amostra. Um dos principais motivos que tornam a cromatografia gasosa de uso bastante acentuado é a sua sensibilidade. Dependendo do tipo de substância analisada e de detector empregado, consegue-se detectar cerca de  $10^{-12}$ g. Essa sensibilidade faz com que haja necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra, o que em certos casos, é um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas. É importante salientar que a mesma também é uma excelente técnica quantitativa, sendo possível a obtenção de resultados quantitativos em concentração que variam de picogramas a miligramas.

A espectrometria de massas (EM) utiliza o movimento de íons em campos elétricos e magnéticos para classificá-los de acordo com sua relação massa-carga. Portanto, a espectrometria de massas é uma técnica analítica por meio da qual as substâncias são identificadas, através da separação de íons gasosos de acordo com o campo elétrico e magnético. O instrumento que realiza essa operação é conhecido como espectrômetro de massas. A EM oferece informação qualitativa e quantitativa sobre a composição atômica e molecular de materiais inorgânicos e orgânicos (COLLINS e BONATO, 1990).

A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG/EM) tem sido considerada uma técnica analítica adequada para análise de misturas complexas.

Tem, no entanto, a grande limitação de ser aplicável apenas a molécula relativamente voláteis e termicamente estáveis.

### **3.7.4 – Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas – CL/EM**

A cromatografia líquida (CL) nasceu essencialmente como uma técnica de separação, mas com os recursos que ela apresenta atualmente, passou a ocupar um lugar de grande destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa (COLLINS e BONATO, 1990).

Os estudos utilizando o acoplamento da CL com espectrometria de massas já vem sendo usada há cerca de 25 anos e as vantagens que incentivaram o desenvolvimento desta técnica multidimensional são: detector universal para CL; potencial para análises de compostos não voláteis; potencial para análise de compostos termolábeis; evita a necessidade de derivação do analito; baixos limites de detecção ; identificação não ambígua dos analitos e avaliação de pureza dos picos. No entanto a história da CL/EM tem sido caracterizada pelas muitas tentativas em resolver as incompatibilidades fundamentais geradas entre estas duas técnicas (COLLINS e BONATO, 1990).

A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG/EM) tem sido considerada uma técnica analítica adequada para análise de misturas complexas. Tem, no entanto, a grande limitação de ser aplicável apenas a molécula relativamente



voláteis e termicamente estáveis. Um acoplamento semelhante entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa (CL/EM) é de todo o interesse, para a análise de compostos sem aquelas características, para os quais a análise por CG/EM só podia ser utilizada recorrendo a derivatização que tornam o processo analítico muito demorado.

Uma das maiores dificuldades nesta combinação tem sido a diferença fundamental entre as condições de operação, salientando entre elas, os fluxos de líquido do CL incompatíveis com o sistema de vácuo do EM da ordem de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  Pa. Várias interfaces têm sido desenvolvidas, sendo que a interface à pressão atmosférica (API) quando operada no modo “electrospray” é única no seu grande potencial para análise de uma variedade de moléculas com uma vasta gama de massas moleculares, com uma sensibilidade da ordem dos femtomole. A ionização por “electrospray” requer um fornecimento constante de líquido e é por isso facilmente acoplada a um sistema de separação, tal como um cromatógrafo líquido. Uma fonte de “electrospray” funciona, portanto, como interface para CL/EM (COLLINS e BONATO, 1990).

Com o desenvolvimento e modernização instrumental, a CL/EM tornou-se uma técnica que pode ser aplicada num grande número de áreas, como, por exemplo, ambiente e bioanálise.

r fungos anamorfos da Região Amazônica produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e caracteriza-los por métodos cromatográficos.

#### **4.2 ESPECÍFICOS**

- ◆ Selecionar espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* com atividade contra *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, em meio sólido;
- ◆ Caracterizar os extratos brutos com atividade antimicrobiana por métodos cromatográficos e bioautográficos;
- ◆ Determinar a concentração mínima inibitória (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos brutos que apresentarem positividade nos testes bioautográficos;
- ◆ Avaliar o potencial da citotoxicidade dos extratos brutos que apresentarem positividade nos testes bioautográficos, usando como modelo o microcrustáceo *Artemia franciscana*.

#### **6 METODOLOGIA**

## 6.1 Microrganismos

Para a seleção de fungos anamorfos da região amazônica produtores de metabólitos secundários com atividade antimicobacteriana foram analisadas 102 amostras de fungos preservados em água destilada esterilizada ou sílica gel pertencentes ao acervo da Coleção de Cultura do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas - DPUA e da Coleção de Cultura de Fungos da FIOCRUZ/AMAZÔNIA - CFAM instaladas, respectivamente, na Universidade Federal do Amazonas – UFAM e no Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane - CPqLMD/FIOCRUZ-A. O quantitativo dos microrganismos citados na tabela 4 está representado com 34 amostras do gênero *Aspergillus* spp, 34 de *Penicillium* spp e 34 de *Trichoderma* spp, sendo 17 de cada Coleção correlacionados também com a sua disponibilidade .

Nesta pesquisa, utilizou-se como microrganismo-teste, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, obtida do Instituto Nacional e Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ.

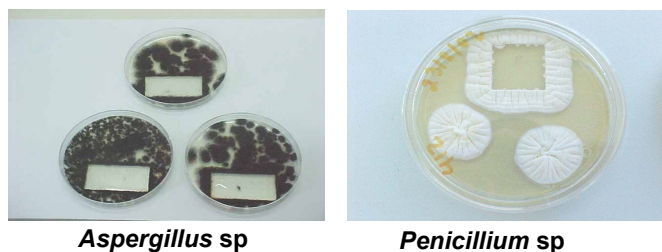
ITEM	ESPÉCIE	COLEÇÃO	ITEM	ESPÉCIE	COLEÇÃO
1	<i>Aspergillus ambiguus</i> Sappa	DPUA 1279	52	<i>P. implicatum</i> Biourge	CFAM 110
2	<i>A. awamorii</i>	DPUA 1266	53	<i>P. implicatum</i> Biourge	CFAM 279
3	<i>A. flavo-furcatis</i> Batista & Maia	DPUA 1532	54	<i>P. implicatum</i> Biourge	CFAM 297
4	<i>A. flavo-furcatis</i> Batista & Maia	DPUA1493	55	<i>P. puberulum</i> Bainer	CFAM 302
5	<i>A. flavus</i> Link	DPUA 031	56	<i>P. purpurogenum</i> Stoll	CFAM 01
6	<i>A. fumigatus</i> Fresenius	DPUA 032	57	<i>P. purpurogenum</i> Stoll	CFAM 219
7	<i>A. japonicus</i> Saito	DPUA 1273	58	<i>P. rugulosum</i> Thom	CFAM 183
8	<i>A. niger</i> van Tieghem	DPUA 1260	59	<i>P. waksmanii</i> Zaleski	CFAM 294
9	<i>A. niger</i> van Tieghem	DPUA 1269	60	<i>P. waksmanii</i> Zaleski	CFAM 299
10	<i>A. niger</i> van Tieghem	DPUA 006AD1	61	<i>P. waksmanii</i> Zaleski	CFAM 47
11	<i>A. niger</i> van Tieghem	DPUA 4A	62	<i>P. decumbens</i> Thom	CFAM 284
12	<i>A. oryzae</i> Cohn	DPUA 1412	63	<i>P. decumbens</i> Thom	CFAM 290
13	<i>A. oryzae</i> Cohn	DPUA 1350	64	<i>P. fellutanum</i> Biourge	CFAM 155
14	<i>A. parasiticus</i> Speare	DPUA 1495	65	<i>P. fellutanum</i> Biourge	CFAM 190
15	<i>A. penicilloides</i> Spegazzini	DPUA 1278	66	<i>P. fellutanum</i> Biourge	CFAM 23
16	<i>A. tamarii</i> Kita	DPUA 1395	67	<i>P. fellutanum</i> Biourge	CFAM 295
17	<i>A. tamarii</i> Kita	DPUA1396	68	<i>P. fellutanum</i> Biourge	CFAM 511
18	<i>A. awamori</i> Nakazawa	CFAM 501	69	<i>T. harzianum</i> Rifai	DPUA 740
19	<i>A. candidus</i> Link	CFAM 04	70	<i>T. harzianum</i> Rifai	DPUA 722
20	<i>A. flavus</i> Link	CFAM 902	71	<i>T. hamatum</i> Bain	DPUA 1437
21	<i>A. flavus</i> Link	CFAM 762	72	<i>T. koningii</i> Oudem	DPUA 832
22	<i>A. flavus</i> Link	CFAM 1097	73	<i>T. koningii</i> Oudem	DPUA 827
23	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 138	74	<i>T. koningii</i> Oudem	DPUA 822
24	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 1123	75	<i>T. koningii</i> Oudem	DPUA 153
25	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 11424	76	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	DPUA 1130
26	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 02	77	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	DPUA 809
27	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 1000	78	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	DPUA 817
28	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 554	79	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	DPUA 648
29	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 568	80	<i>T. virens</i> von Arx	DPUA 071
30	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 580	81	<i>T. virens</i> von Arx	DPUA 074
31	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 658	82	<i>T. virens</i> von Arx	DPUA 1445
32	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 737	83	<i>T. virens</i> von Arx	DPUA 1850
33	<i>A. niger</i> van Tieghem	CFAM 98	84	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray	DPUA 178
34	<i>A. oryzae</i> Cohn	CFAM 17	85	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray	DPUA1249
35	<i>Penicillium alutaceum</i> Scott	DPUA 1393	86	<i>T. hamatum</i> Bain	CFAM 44
36	<i>P. citrinum</i> Thom	DPUA 573	87	<i>T. koningii</i> Oudem	CFAM 244
37	<i>P. fellutanum</i> Biourge	DPUA 1405	88	<i>T. koningii</i> Oudem	CFAM 497
38	<i>P. fellutanum</i> Biourge	DPUA1420	89	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	CFAM 459
39	<i>P. janthinellum</i> Biourge	DPUA 572	90	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	CFAM 560
40	<i>P. janthinellum</i> Biourge	DPUA 1387	91	<i>T. virens</i> von Arx	CFAM 529
41	<i>P. melinii</i> Thom	DPUA 1403	92	<i>T. virens</i> von Arx	CFAM 837
42	<i>P. oxalicum</i> Currie and Thom	DPUA 1580	93	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	CFAM 767
43	<i>P. oxalicum</i> Currie and Thom	DPUA1381	94	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	CFAM 784
44	<i>P. glabrum</i> Westling	DPUA 1435	95	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	CFAM 823
45	<i>P. jaczewynskii</i> Zaleski	DPUA 1408	96	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	CFAM 561
46	<i>P. jaczewskii</i> Zaleski	DPUA 1293	97	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray	CFAM 346
47	<i>P. purpurogenum</i> Stoll	DPUA 1275	98	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray	CFAM 354
48	<i>P. raistrick</i> G. Smith	DPUA1390	99	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray	CFAM 354
49	<i>P. waksmanii</i> Zaleski	DPUA1236	100	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray	CFAM 375
50	<i>P. rugulosum</i> Thom	DPUA1384	101	<i>T. harzianum</i> Rifai	CFAM 356
51	<i>P. simplicissimum</i> Thom	DPUA1379	102	<i>T. harzianum</i> Rifai	CFAM 428

Tabela 4 Quantitativo Numérico dos fungos anamorfos analisados

### 8.1 ativação e manutenção dos fungos preservados em água destilada esterilizada (Castellani, 1965) e sílica gel (Smith e Onions, 1983).

Os fungos foram reativados e mantidos em ágar Malte (MEA), em placa de Petri (90 mm X 110 mm) e tubo de ensaio (10 mm x 150 mm). Os cultivos em triplicata foram mantidos a 25 °C entre sete a 10 dias, seguindo-se as análises macroscópicas e microscópicas para comprovar a autenticidade das espécies através da visualização da morfologia e das estruturas vegetativas e reprodutivas, conforme literatura especializada, para posterior determinação da atividade antimicrobiana (BISSETT,1991; PITT, 1987; RAPER E FENNELL ,1987)

#### Características Macroscópicas



#### Características Microscópicas

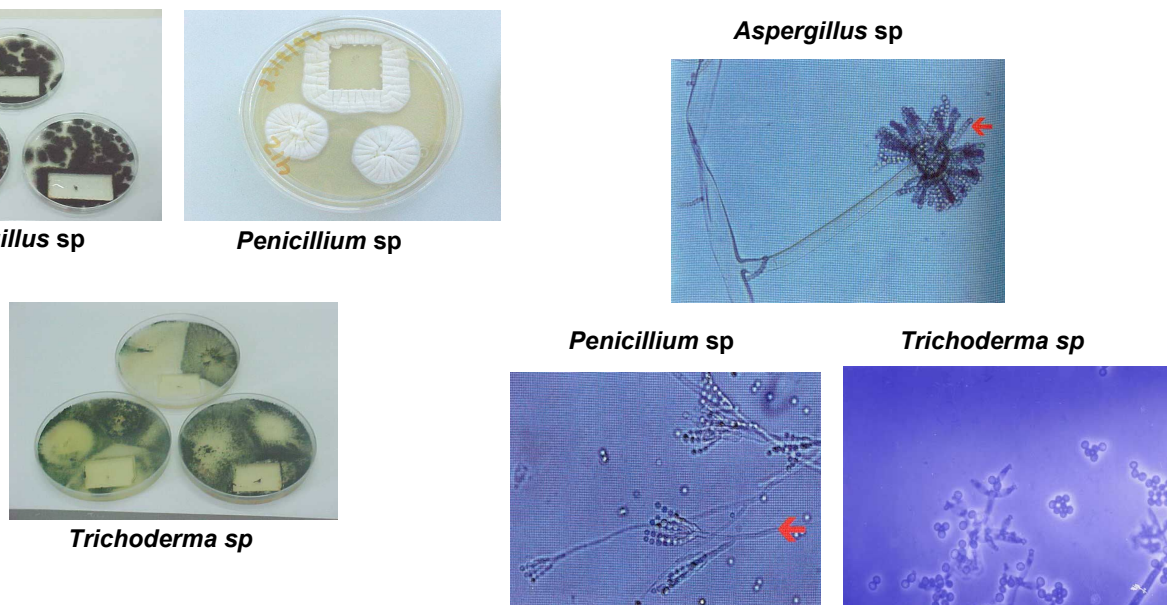


Figura 7 - Características macroscópicas e microscópicas dos fungos anamorfos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* em análise.

### 5.3 Reativação e manutenção do microrganismo-teste

*Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 foi reativado em triplicata no ágar Lowenstein-Jensen contido em placa de Petri (90 mm X 110 mm) a 37 °C, por 48 horas, e em tubo de ensaio (10mm x 150mm), mantido sob refrigeração em ágar Lowenstein-Jensen e ágar nutritivo (TRABULZI et al (2002).

#### **5.4 Seleção de fungos anamorfos produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana em meio sólido**

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo Método do Bloco de Gelose (LARPENT e SANGLIER, 1989). Este método qualitativo de difusão consiste em parear várias culturas frente a um único microrganismo-teste.

Para selecionar os produtores de antibiótico, os fungos foram cultivados em ágar extrato de levedura e sacarose (YES) e a *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 (bactéria teste) em ágar nutritivo. Os cultivos em triplicata foram mantidos a 25 °C e 37 °C, por 7 dias e 24 horas, respectivamente. Das culturas obtidas em ágar nutritivo preparou-se uma suspensão de esporos adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada, utilizando-se como base a escala de Mac Farland para verificar a turvação no tubo que deveria estar entre 0,5 e 1,0 da referida escala, desta retirou-se 500 µL para ser semeado na superfície do ágar nutritivo contido em placa de Petri de 90 mm X 110 mm, formando uma camada uniforme. Imediatamente, nestes cultivos bacterianos foram superpostos três *plugs* (de 10 mm de diâmetro) retirados do centro da cultura dos fungos em meio ágar malte. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 24 horas. A

determinação da atividade antimicrobiana foi verificada pela inibição do crescimento, indicada por um halo em torno do bloco da cultura sob análise, cujo diâmetro foi medido em milímetros.

## **5.5 Determinação dos Metabólitos Secundários Atividade Antimicrobiana por Diferentes Métodos Cromatográficos.**

A cromatografia é um método moderno de estudo que permite efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas por si mesma ou em conjunto com outras formas instrumentais (SOUZA et al, 2004). Nesse contexto, as espécies que apresentaram atividade antimicrobiana igual ou superior a 25 mm foram analisadas pela técnica do ágar *plug* modificado (RAZACK et al, 1999), por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de Massas – CG/EM e a bioautografia.

### **5.5.1 Detecção do metabólito secundário com Atividade Antibiótica – Modificada (Técnica do Ágar *Plug*)**

Para detecção do metabólito com atividade antibiótica, as espécies selecionadas foram cultivadas na superfície de ágar extrato de levedura sacarose (YES), em placa de Petri (diâmetro de 90 mm x 110 mm). Após sete dias de crescimento a 25 °C foram retirado três *plugs* do centro da colônia, com auxílio de um furador (10 mm diâmetro) previamente esterilizado.

Para a identificação dos perfis cromatográficos dos extratos com atividade antimicrobiana, foram utilizadas cromatoplasmas para cromatografia de camada delgada (CCD) da marca MERCK, com sílica gel sílica gel 60, indicador de fluorescência F<sub>254</sub> e suporte em alumínio com 0,2 mm de espessura medindo 5 x 10 cm.

A modificação deste método descrito por RAZACK et al (1999) consistiu em substituir o *imprint* de cada *plug* nas cromatoplasmas, pela extração dos compostos com solventes orgânicos (hexano, acetato de etila e etanol), dos *plugs* retirados da área central das colônias fúngicas.

Procedeu-se a extração a partir dos *plugs* segundo a metodologia descrita por Mattos (1997). No processamento de extração para separação prévia dos compostos, foram utilizados 10mL dos solventes em ordem crescente de polaridade.

Os extratos foram aplicados sobre as cromatoplasmas de camada delgada (CCD) com auxílio de um capilar de vidro ( $\varnothing = 50$  mm), a 1 cm da borda inferior e 0,5 cm da borda lateral e a uma distância de aproximadamente 1 cm entre as aplicações das amostras. Como padrão foi utilizado a rifampicina (10 mg/mL) dissolvida em água destilada esterilizada.

Cada cromatoplasma foi acondicionada em uma cuba cromatográfica, contendo a fase móvel [tolueno-acetato de etila-ácido fórmico 90% (5:4:1: v/v/v)] e para manter a saturação no recipiente foi colocado papel de filtro Whatman nº 1 medindo 15 x 15 cm. Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram secas em temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C e reveladas sob luz branca e luz ultravioleta (a 254 e 365 nm), determinando-se os valores de razão de frente (Rf) segundo, a seguinte equação:



$$R_f = \frac{\text{Distância do centro da mancha à linha de partida}}{\text{Distância da frente do eluente à linha de partida}}$$

### 5.5.2 Análise por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplado a Espectrometria de Massa (CG/EM)

As análises por GC/MS foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo à Gás modelo Varian 3900 acoplado a um Espectrômetro de massas Íon Trap 2000, com ionização por impacto de elétrons (IE) com energia padrão de 70 eV, inserido em um sistema com bomba turbo molecular; Injetor tipo *split/splitless* 1177. No GC foi utilizada uma Coluna VF-5ms LB com dimensões de 30 m x 25 mm e 0,25 µm de espessura de filme, fase estacionária 100 % metilpolisiloxano. Utilizou-se como gás de arraste Hélio (He), fluxo da coluna em 1,0 mL min<sup>-1</sup> e split 1:10. As injeções das amostras foram da ordem de 1 µL de solução. Os espectros obtidos foram comparados com os dados da biblioteca Nist 12 e Wiley do sistema

As condições analíticas empregadas foram as seguintes:

- Temperatura do injetor 250 °C
- Temperatura do forno: 50 °C a 290 °C com taxa de aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup>;
- Temperaturas do espectrômetro de massas: interface: 200 °C, *mainfold*: 50 °C e analisador de íons (*ion trap*): 190 °C, faixa de massas: *m/z* 40-600.

- Fluxo da coluna em 1,0 mL.min<sup>-1</sup>
- Taxa de divisão (*split*) 1:10.
- Tempo de corrida: 58 min.

Os extratos obtidos da extração com solventes orgânicos, através de um sistema de injeção, foram introduzidos em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientemente no local de injeção da amostra e da coluna possibilitou a vaporização desta substância que, de acordo com suas propriedades e as das fases estacionárias, são retidas por tempos determinados e chegam à saída em diferentes tempos. A presença de um detector adequado na saída da coluna possibilita a detecção e a quantificação das substâncias. A cromatografia gasosa é atualmente, uma das técnicas de análise de maior uso.

### **5.5.3 Bioautografia**

Para verificar a atividade antimicobacteriana das biomoléculas presentes nos extratos orgânicos (Hexano, acetato de etila e etanol) dos fungos selecionados no item 5.4, foram submetidos à bioautografia.

A bioautografia consiste na aplicação de uma suspensão de microrganismos teste, sobre uma ou mais amostras eluídas em placa cromatográfica, na qual se observa zona de inibição de crescimento do microrganismo em análise, se houver, à luz natural ou após a aplicação de um corante (COLLINS, et al. 1997).

### **5.5.3.1 Preparação e aplicação da amostra**

#### **5.5.3.1.2 Preparação dos Extratos orgânicos dos fungos anamorfos para os testes bioautográficos**

Os extratos foram preparados conforme descrição nos item 5.5.1 e mantidos sob refrigeração. Para as análises da atividade antibiótica pela técnica de bioautografia, foram utilizadas cromatoplasmas para cromatografia de camada delgada (CCD) da marca MERCK com sílica gel 60, indicador de fluorescência F<sub>254</sub> e suporte em alumínio, com 0,2 mm de espessura medindo 5 x 10 cm.

#### **5.5.3.1.3 Preparação das placas e cuba cromatográfica**

Em uma das extremidades das CCD, traçou-se uma linha a 1 cm com lápis grafite, determinando-se o ponto de partida das amostras (extratos e padrão). Na extremidade oposta marcou-se outra linha registrando-se o limite máximo para a eluição da fase móvel. As placas foram tratadas previamente com metanol P.A em cuba cromatográfica .

#### **5.5.3.1.4 Aplicação dos extratos orgânicos na placa de cromatografia**

Em cada placa utilizada para as análises da atividade antimicrobiana foram aplicados 10 µL do antibiótico padrão (solução de rifampicina 10 mg/mL) e dos extratos, a uma distância de um centímetro entre as aplicações, seguindo-se a eluição com a fase móvel (Hexano/Acetato de etila/etanol 3:5:2 v/v) e secagem a temperatura ambiente (25 °C) (VAN DER WATT *et al.*, 2001). Para manter a saturação no recipiente foi colocado papel de filtro Whatman nº 1 medindo 15 x 15 cm. A análise foi realizada

em duplicata. Cada placa foi revelada sob luz branca e luz ultravioleta (a 254 e 365 nm), procedendo-se então o cálculo dos respectivos valores de razão de frente (Rf) de cada “spot” visualizado.

#### **5.5.3.1.5 Inoculação da Suspensão de Esporos em Ágar Nutritivo**

Para os testes bioautográficos o microrganismo teste foi cultivado conforme citado no item 5.3. A partir de uma cultura em meio sólido de 24 horas de crescimento preparou-se uma suspensão de esporos adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada, utilizando-se como base a escala de Mac Farland para verificar a turvação no tubo que deveria estar entre 0,5 e 1,0 da referida escala. Alíquota de 500 µL da suspensão de esporos ( $10^{-1}$ ) e da substância reveladora, Cloreto de Trifeniltetrazoliun (TCC) (MERCK) a 1,0 % foram adicionados em 20 mL de ágar nutritivo mantido a temperatura de 40 °C (CUNICO *et al.*, 2004).

#### **5.5.3.1.6 Exposição das Placas Cromatográficas ao Ágar Nutritivo Adicionado de Suspensão de Esporos**

Após a eluição (item 5.3.2.1.4), as cromatoplasmas foram colocadas em placa de Petri medindo 220 mm X 220 mm e sobre elas verteu-se o ágar nutritivo contendo a suspensão de esporos do *Mycobacterium smegmatis*, ATCC 607 e o revelador (TCC). Em seguida as placas devidamente fechadas foram incubadas a 37° C. Após 24 horas crescimento do *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, foi observado a ocorrência ou não de halos de inibição. Os testes foram realizados em duplicatas. Como controle

positivo utilizou-se solução de rifampicina 10 mg/mL (SPRINGFIELD, 2003; ROMEIRO, 2005).

## **5.8 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CIM dos Extratos Orgânicos**

### **Promissores**

A Concentração Mínima Inibitória - CIM dos extratos selecionados foi verificada pelo método de microdiluição em Caldo.

A CIM foi definida como a menor concentração do extrato na qual não se observou crescimento bacteriano.

### **5.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória por Diluição em Caldo com Adição de Corante de viabilidade celular**

A CIM foi determinada somente nos extratos que demonstraram positividade na Bioautografia (item 5.5.3).

O teste de diluição em caldo é o método padrão para a determinação de níveis de resistência a antimicrobianos. Diluições seriadas de produtos antimicrobianos são feitas em meios líquidos nos quais são inoculadas quantidades padronizadas de microrganismos e incubadas por um tempo determinado. A menor concentração do antimicrobiano que impede a turvação é considerada a concentração inibitória mínima (CIM). Nesta diluição, o antimicrobiano é bacteriostático (ISENBERG, 1992; KONEMAN et al. 1997; TAKAHASHI et al., 2004; ROLLINS, 2004).

Adicionalmente, a concentração bactericida mínima (CBM) pode ser determinada por uma subcultura do conteúdo dos tubos em um meio sólido livre de antibiótico e posteriormente examinando o crescimento microbiano.

A concentração bactericida mínima é quantidade mínima do agente antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis a célula bacteriana, sendo possível avaliar se o composto é bactericida ou bacteriostático (BARON e FINEGOLD,1990).

#### **5.8.1.1 Preparação do Inóculo do Microrganismo Teste**

Para a realização dos testes utilizou-se a cepa padrão *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. Para o inóculo de *M. smegmatis* ATCC 607, realizou-se os seguintes procedimentos: com auxílio de uma alça de platina transferiu-se uma alíquota de células de uma cultura em meio sólido com 24 horas de crescimento a 37 °C, para um tubo de ensaio contendo 5mL de caldo nutritivo, de maneira a obter uma suspensão com turvação entre 0,5 e 1,0 da escala de Mac Farland. O volume de uso nas microplacas foi de 25 µL.

#### **5.8.1.2 Preparação dos Extratos Orgânicos Selecionados**

Para a prova de sensibilidade por diluição em caldo foram utilizados extratos selecionados no item 5.5.1.. Foram realizadas sete diluições seriadas de cada amostra em solvente dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a obter as seguintes concentrações: 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,625 µg/mL.

### **5.8.1.3 Solução de Indicador de Viabilidade Celular**

Cloreto de Trifeniltetrazoliun (TCC) (MERCK) a 1,0 % diluído em etanol, foi usado como solução de viabilidade celular. O TCC é um sal tetrazolium que é reduzido por enzimas desidrogenases, forma cristais de formazana solúveis em etanol. A forma reduzida é de cor púrpura, isto é, indica crescimento celular. O volume de uso nas microplacas foi de 25  $\mu$ L.

### **5.6.1.4 Método de Determinação de CIM em Placa de Microdiluição. (TELLES & MOSCA, 2000).**

Em microplacas estéreis de 96 orifícios foram distribuídos 100  $\mu$ L de meio de cultura líquido (caldo nutritivo) em todos os orifícios. Na linha A da placa foi adicionado 100  $\mu$ L de uma solução do extrato orgânico a ser analisado na concentração de 100  $\mu$ g/mL. Em seguida, com uma pipeta de microdiluição de 12 canais foram feitas as diluições seriadas, transferindo-se 100  $\mu$ l da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até a linha G da placa, sendo que a última linha, a H foi deixada sem extrato (droga), utilizada como controle do crescimento bacteriano. Foram inoculados 25  $\mu$ L da suspensão bacteriana padronizada e da solução indicadora em cada um dos orifícios da placa. A placa foi selada e incubada a 37 °C por 24 horas e a leitura feita visualmente. A CIM foi determinada como a menor concentração do extrato capaz de

impedir a mudança de cor, ou seja, de inibir o crescimento celular. Os testes foram realizados em triplicata.

#### **5.6.1.5 Determinação da Concentração Bactericida Mínima - CBM**

A Concentração Bactericida Mínima – CBM foi determinada repicando-se o conteúdo de cada um dos últimos três orifícios límpidos obtido no item 5.6.1.4, em meio de cultura sólido (ágar nutritivo), desprovido de antibiótico. O resultado do efeito letal frente ao *M. smegmatis* ATCC 607 foi observado após 24 de incubação a 37° C. Os testes foram feitos em triplicata.

Para interpretação dos resultados foram considerados os seguintes critérios:

- Crescimento do microrganismo no meio de cultura, significou ação bacteriostática;
- Ausência do crescimento do microrganismo no meio de cultura, significou ação bactericida.

### **5.9 Estudo da Toxidez dos Extratos Seleccionados Frente à *Artemia franciscana*.**

#### **5.7.1 Percentual de Mortalidade de *Artemia franciscana***

Foi realizado o percentual de mortalidade dos extratos previamente seleccionados no item 5.3.

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer et al (1982).



#### **5.7.1.1. Obtenção das Larvas de *Artemia franciscana***

Os cistos de *Artemia franciscana* foram colocados para eclodir em placa de Petri (90 mm x 15 mm) contendo solução de água do mar artificial (solução salina a 3,5%), por 48 horas a temperatura ambiente (aprox. 25 a 28 °C) A criação foi coberta com papel de filtro e deixada a aproximadamente 50 cm da lâmpada, de maneira a se obter continua luminosidade. Após 48 horas, os ovos eclodiram e as larvas estavam prontas para os testes.

#### **5.7.1.2. Ensaio da toxidez dos extratos frente à *Artemia franciscana***

Após o período de eclosão dos cistos, em uma placa de multipoços 4X6 foi adicionado 1.800 mL de solução de água do mar artificial (salina 35%), foram inseridos a estes com auxílio de uma pipeta de Pasteur 10 nauplios de *Artemia franciscana* e em seguida 20 $\mu$ L do extrato de concentração conhecida de 100 mg/mL, deixou-se incubar por 24 horas a temperatura ambiente, protegido de luminosidade, este procedimento foi desenvolvido em triplicata. O controle negativo seguiu o mesmo procedimento, porém utilizou-se 20 $\mu$ L de DMSO sem adição do extrato.

A porcentagem de mortalidade (% M) foi estimada como: % M = porcentagem de sobreviventes no controle – a porcentagem de sobreviventes com composto teste (CARBALLO et al, 2002).

Aqueles extratos que apresentaram % de M maior que 50 % foram diluídos em diferentes concentrações para determinação da relação da concentração de letalidade e a avaliação da CL<sub>50</sub>.

### **5.7.2 CL<sub>50</sub> do Percentual de Mortalidade de *Artemia franciscana***

Nos extratos que apresentaram percentual de mortalidade maior que 50 %, realizaram-se o calculo da CL<sub>50</sub>.

O procedimento de eclosão dos cistos da *Artemia salina* foi semelhante ao item 5.7.1.1. Após o período de eclosão dos cistos em uma placa de multipoços 4X6 contendo 1.800 mL de solução de água do mar artificial (solução salina a 35%) foram inseridos com auxilio de uma pipeta de Pasteur 10 nauplios de *Artemia salina* e em seguida adicionou-se 20 µL de diferentes concentrações (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,625 µg/mL.) dos extratos selecionados no item 5.5.1, deixou-se incubar por 24 horas a temperatura ambiente, sob luminosidade, este procedimento foi desenvolvido em triplicata. O controle negativo seguiu o mesmo procedimento, porém utilizou-se 20µL de DMSO sem adição do extrato.

Para o cálculo da concentração letal que mata 50% das larvas (CL<sub>50</sub>), utilizou-se o log da concentração em função da percentagem de microcrustáceos mortos (método acumulativo) sendo obtidas curvas com perfil sigmoidal, fazendo-se necessário utilizar a técnica estatística de probites (BIER, 1965).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Seleção de Microrganismos Produtores de Antibióticos em Meio Sólido

Antibióticos são produtos do metabolismo secundário que inibem o processo de crescimento de outro organismo mesmo quando usados em baixas concentrações. Nesse sentido, compostos com atividade antibiótica têm sido utilizados com fins terapêuticos no tratamento de doenças infecciosas (CRUEGER e CRUEGER, 1990; MELO, 2005).

A atividade antimicrobiana dos 102 fungos anamorfos analisados em meio sólido, demonstrou que 75,5% deles inibiram o crescimento de *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. Dessa totalidade, 24,5 %, 26,5 %, e 24,5 % dos *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Trichoderma* spp., respectivamente, demonstraram atividade positiva. Esses dados estão de acordo com os citados na literatura, no entanto, a atividade antimicrobiana foi expressa em diferentes níveis e o quantitativo de fungos foi superior aos citados por Furtado et al. (2005); Melo (2005); Racic et al. (2006); Zelenkova et al. (2002).

Na tabela 5 estão citados os resultados referentes à distribuição de frequência da média do diâmetro dos halos dos 77 fungos anamorfos que produziram substâncias com atividade antimicrobiana em meio sólido (figura 8). Os resultados revelaram que entre os *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, a atividade antimicrobiana apresentou variação de 7 mm a 60 mm, predominando halo com diâmetro médio entre 21 - 27 mm e 14 - 20 mm, em 32,46% e 27,27% dos isolados, respectivamente.

Intervalo de classe [diâmetro médio (mm)]	Frequência absoluta (n)	Porcentagem da frequência relativa (%)
7-14	14	18,18
14-21	21	27,27
21-28	25	32,46
28-35	11	14,28
35-42	02	2,60
42-49	02	2,60
49-56	01	1,30
56-63	01	1,30
Total.....	77	99,99

Tabela 5 - Distribuição de frequência do diâmetro médio dos halos de 77 (75,49 %) fungos anamorfos (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*) determinado em meio sólido (ágar nutritivo).

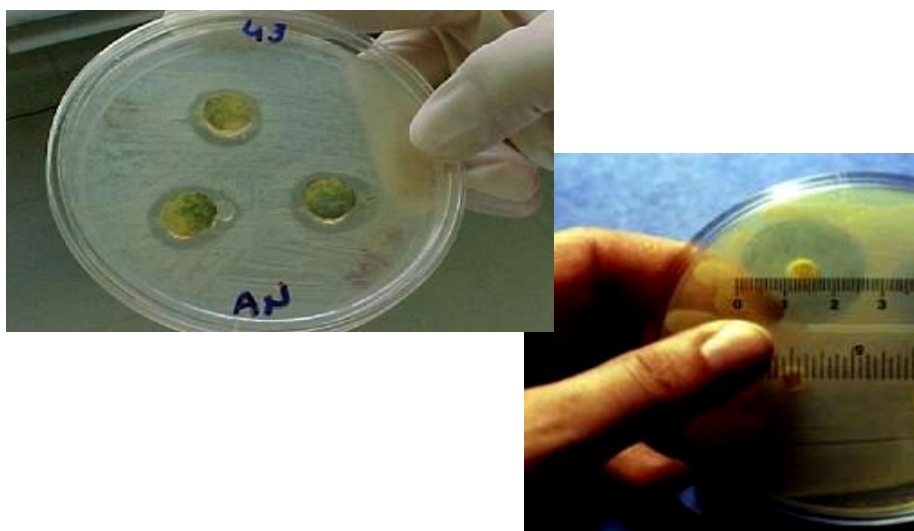


Figura 8 - Determinação da atividade antibiótica dos fungos anamorfos contra *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 em ágar nutritivo - Técnica do Ágar Plug

Na tabela 6 estão citadas os 34 representantes de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* respectivamente, que foram submetidos às análises de atividade antimicrobiana. Entre aqueles que produziram substâncias com ação antimicobacteriana, a espécie de *Aspergillus* que expressou maior atividade foi *A. niger* CFAM 1000 (halo=40 mm), entre os *Penicillium*, *P. implicatum* CFAM 297 (halo=30 mm) e dos *Trichoderma*, *T. pseudokoningii* CFAM 784 (halo=60 mm).

ITEM	ESPÉCIES	HALO (mm)	ITEM	ESPÉCIES	HALO (mm)
1	<i>Aspergillus ambiguus</i> Sappa DPUA 1279	18	52	<i>P. implicatum</i> Biourge CFAM 110	21
2	<i>A. flavo-furcatis</i> Batista & Maia DPUA 1532	26	53	<i>P. implicatum</i> Biourge CFAM 279	25
3	<i>A. flavo-furcatis</i> Batista & Maia DPUA1493	27	54	<i>P. implicatum</i> Biourge CFAM 297	30
4	<i>A. flavus</i> Link DPUA 031	(-)	55	<i>P. puberulum</i> Bainer CFAM 302	(-)
5	<i>A. fumigatus</i> Fresenius DPUA 032	(-)	56	<i>P. purpurogenum</i> Stoll CFAM 01	21
6	<i>A. japonicus</i> Saito DPUA 1273	11	57	<i>P. purpurogenum</i> Stoll CFAM 219	16
7	<i>A. niger</i> van Tieghem DPUA 1266	25	58	<i>P. rugulosum</i> Thom CFAM 183	17
8	<i>A. niger</i> van Tieghem DPUA 1260	26	59	<i>P. waksmanii</i> Zaleski CFAM 294	24
9	<i>A. niger</i> van Tieghem DPUA 1269	12	60	<i>P. waksmanii</i> Zaleski CFAM 299	27
10	<i>A. niger</i> van Tieghem DPUA 006AD1	21	61	<i>P. waksmanii</i> Zaleski CFAM 47	(-)
11	<i>A. niger</i> van Tieghem DPUA 4A	40	62	<i>P. decumbens</i> Thom CFAM 284	(-)
12	<i>A. oryzae</i> Cohn DPUA 1412	31	63	<i>P. decumbens</i> Thom CFAM 290	26
13	<i>A. oryzae</i> Cohn DPUA 1350	(-)	64	<i>P. fellutanum</i> Biourge CFAM 155	14
14	<i>A. parasiticus</i> Speare DPUA 1495	(-)	65	<i>P. fellutanum</i> Biourge CFAM 190	28
15	<i>A. penicilloides</i> Spegazzini DPUA 1278	(-)	66	<i>P. fellutanum</i> Biourge CFAM 23	24
16	<i>A. tamarii</i> Kita DPUA 1395	28	67	<i>P. fellutanum</i> Biourge CFAM 295	26
17	<i>A. tamarii</i> Kita DPUA1396	28	68	<i>P. fellutanum</i> Biourge CFAM 511	(-)
18	<i>A. awamori</i> Nakazawa CFAM 501	(-)	69	<i>T. harzianum</i> Rifai DPUA 740	07
19	<i>A. candidus</i> Link CFAM 04	22	70	<i>T. harzianum</i> Rifai DPUA 722	(-)
20	<i>A. flavus</i> Link CFAM 902	17	71	<i>T. hamatum</i> Bain DPUA 1437	10
21	<i>A. flavus</i> Link CFAM 762	(-)	72	<i>T. koningii</i> Oudem DPUA 832	(-)
22	<i>A. flavus</i> Link CFAM 1097	25	73	<i>T. koningii</i> Oudem DPUA 827	(-)
23	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 138	(-)	74	<i>T. koningii</i> Oudem DPUA 822	(-)
24	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 1123	(-)	75	<i>T. koningii</i> Oudem DPUA 153	08
25	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 11424	20	76	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai DPUA 1130	18
26	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 02	29	77	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai DPUA 809	(-)
27	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 1000	40	78	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai DPUA 817	10
28	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 554	25	79	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai DPUA 648	(-)
29	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 568	25	80	<i>T. virens</i> von Arx DPUA 071	13
30	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 580	30	81	<i>T. virens</i> von Arx DPUA 074	22
31	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 658	25	82	<i>T. virens</i> von Arx DPUA 1445	15
32	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 737	28	83	<i>T. virens</i> von Arx DPUA 1850	12
33	<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 98	25	84	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray DPUA 178	09
34	<i>A. oryzae</i> Cohn CFAM 17	11	85	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray DPUA1249	(-)
35	<i>Penicillium alutaceum</i> Scott DPUA 1393	16	86	<i>T. hamatum</i> Bain CFAM 44	18
36	<i>P. citrinum</i> Thom DPUA 573	(-)	87	<i>T. koningii</i> Oudem CFAM 244	07
37	<i>P. fellutanum</i> Biourge DPUA 1405	15	88	<i>T. koningii</i> Oudem CFAM 497	30
38	<i>P. fellutanum</i> Biourge DPUA1420	15	89	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai CFAM 459	10
39	<i>P. janthinellum</i> Biourge DPUA 572	(-)	90	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai CFAM 560	35
40	<i>P. janthinellum</i> Biourge DPUA 1387	19	91	<i>T. virens</i> von Arx CFAM 529	30
41	<i>P. melinii</i> Thom DPUA 1403	18	92	<i>T. virens</i> von Arx CFAM 837	(-)
42	<i>P. oxalicum</i> Currie and Thom DPUA 1580	(-)	93	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai CFAM 767	35
43	<i>P. oxalicum</i> Currie and Thom DPUA1381	11	94	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai CFAM 784	60
44	<i>P. glabrum</i> Westling DPUA 1435	18	95	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai CFAM 823	14
45	<i>P. jaczewinskii</i> Zaleski DPUA 1408	22	96	<i>T. pseudokoningii</i> Rifai CFAM 561	42
46	<i>P. jaczewskii</i> Zaleski DPUA 1293	20	97	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray CFAM 346	(-)
47	<i>P. purpurogenum</i> Stoll DPUA 1275	21	98	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray CFAM 354	25
48	<i>P. raistrick</i> G. Smith DPUA1390	15	99	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray CFAM 354	11
49	<i>P. waksmanii</i> Zaleski DPUA1236	15	100	<i>T. viride</i> Pers. Ex Gray CFAM 375	(-)
50	<i>P. rugulosum</i> Thom DPUA1384	18	101	<i>T. harzianum</i> Rifai CFAM 356	25
51	<i>P. simplicissimum</i> Thom DPUA1379	13	102	<i>T. harzianum</i> Rifai CFAM 428	25

Tabela. 6 – Diâmetro médio dos halos expressados dos metabólitos produzidos por fungos anamorfos frente a *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, determinada em ágar nutritivo a 37 °C por 24 horas.

## 6.2 Determinação do Perfil Cromatográfico dos Biocomposto Produzidos por Espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*

As figuras 9, 10 e 11, apresentam as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* selecionados para a determinação do perfil cromatográfico. Do total de fungos analisados, 43 % expressaram halo superior e/ou igual a 25 mm. Entre os *Aspergillus*, apenas seis espécies representadas por 19 isolados apresentaram halo entre 25 - 40 mm. Das quatro espécies de *Penicillium*, em seis representantes, o tamanho do halo apresentou variação entre 25 mm - 30 mm. Com relação à *Trichoderma*, representado por quatro espécies, oito deles apresentou halo de 25 mm-60 mm.

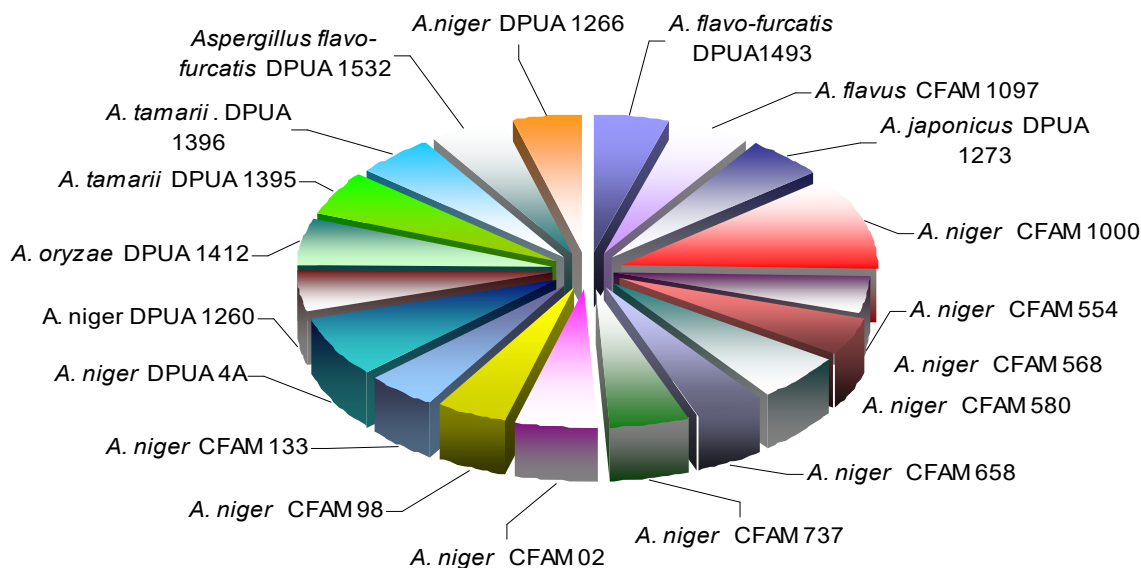


Figura 9 - Atividade antimicrobiana de 19 espécies de *Aspergillus* frente a *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, determinada em meio sólido, a 37 °C por 24 horas, selecionadas para análise cromatográfica.

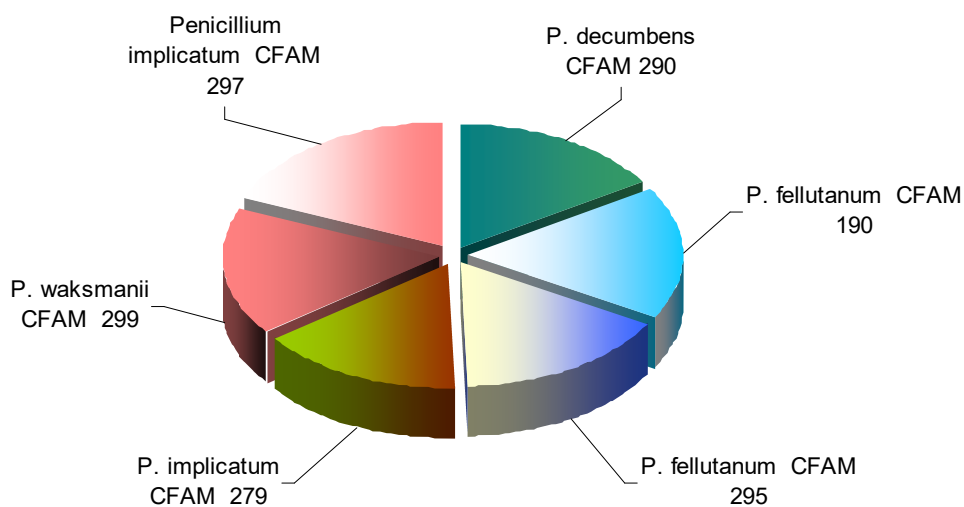


Figura 10 - Atividade antimicrobiana de seis espécies de *Penicillium* frente a *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, determinada em meio sólido, a 37 °C por 24 horas, selecionadas para análise cromatográfica.

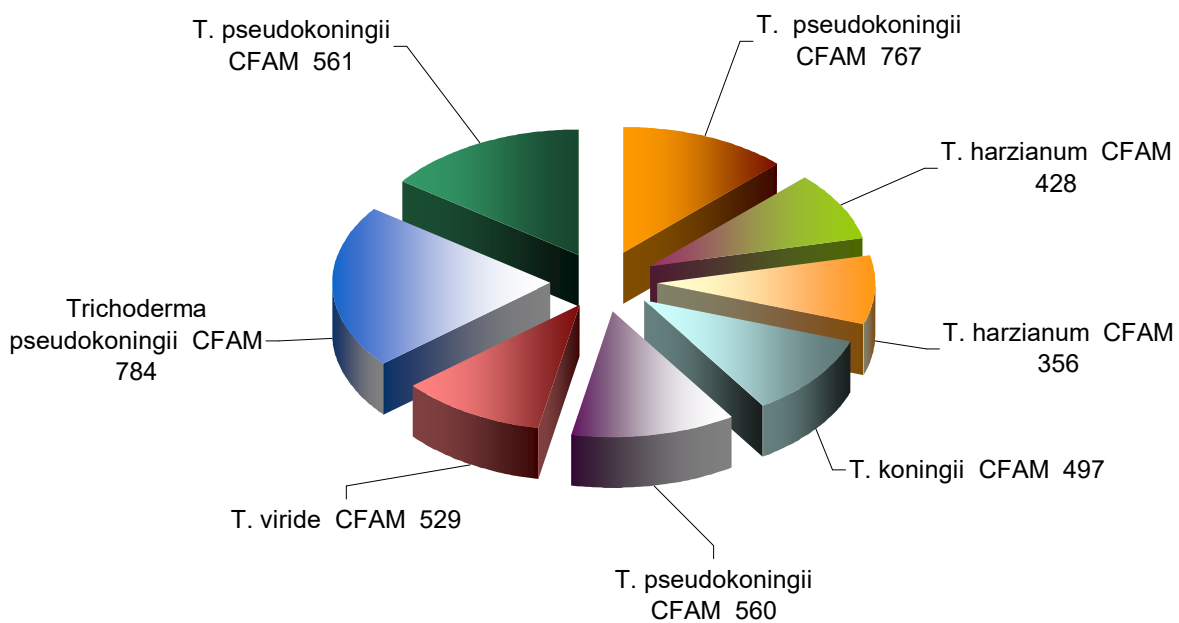


Figura 11 - Atividade antimicrobiana de oito espécies de *Trichoderma* frente a *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, determinada em meio sólido, a 37 °C por 24 horas, selecionadas para análise cromatográfica.

Considerando-se o valor da atividade antimicrobiana no meio sólido, os extratos das espécies selecionados foram submetidos à análise para evidenciação do perfil cromatográfico em Cromatografia de Camada Delgada - CCD. Os resultados dessas análises mostraram que nos extratos brutos hexânicos, acetato de etila e etanólico foram observados de 1 a 9 biocompostos de perfil diferenciado, com valores de Rf variando de 0,09 a 9. É importante destacar que a modificação da técnica do ágar plug, substituindo o *imprint* do plug contendo os metabólitos secundários pela extração deles com solvente orgânico, proporcionou a evidenciação e separação de uma maior diversidade de biomoléculas quando comparado com o método convencional do ágar plug citado por Samson et al (1995); Razack, et al. (1999), Sousa (2005).

Os resultados da tabela 7 demonstram que o maior quantitativo de biocompostos foi observado nos extratos orgânicos de *Aspergillus niger* DPUA1260 (28 compostos) e *Aspergillus tamaris* DPUA 1395 (21 compostos). Em *Penicillium fellutanum* CFAM 190 e CFAM 295 foram evidenciados 23 e 20 biocompostos, respectivamente, enquanto em *Trichoderma pseudokoningii* CFAM 767 e *Trichoderma harzianum* CFAM 428 foram revelados somente 12 biocompostos. Esses resultados estão em consonância com os citados por Griffin (1993); Chistopher (2006); Santos (2003), os quais relatam que espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* são microrganismos produtores de um arsenal de substâncias químicas possuem, portanto, potencial biológico para serem explorados pelas indústrias farmacêuticas como fontes de novas substâncias ativas, como por exemplo, no combate à tuberculose.



Espécie	Mobilidade dos biocompostos no sistema de cromatografia (Rf x100)					
	254 nm			365 nm		
	Hexano	AcOEt	EtOH	Hexano	AcOEt	EtOH
	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
<i>Aspergillus</i>						
<i>A. niger</i> . DPUA 1260	70	21-24-28-40	24-28-31	28-53-61	19-24-28-33-41-48-61-65	18-21-28-30-36-42-49-56-64
<i>A. tamarisii</i> DPUA 1395	71-79	30-38-50	16	21-34-40-53	19-33-39-51-59-70	23-38-41-55-64
<i>Penicillium</i>						
<i>P. fellutanum</i> CFAM 190	60-70-80	30-40-60-70	ND	44-49-54-64	22-30-32-46-56-57	17-25-33-46-53-65
<i>P. fellutanum</i> CFAM 295	ND	45	30-44-70	35-40-53-66	16-25-32-48-53-59-66	15-25-30-54-68
<i>Trichoderma</i>						
<i>T. pseudokoningii</i> CFAM 767	80	20-50-60	40-50	70-80	30-50	60-70
<i>T. harzianum</i> CFAM 428	61-72	27-50-61-77	50-66	68	70	83

Tabela 7 - Mobilidade dos biocompostos das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* com maior diversidade de spots obtidos pelo método cromatográfico em camada delgada – CCD, no sistema de eluição tolueno-acetato de etila - ácido fórmico 90% - TAF (5:4: 1; v/v/v) . EtOH = Etanol; AcOEt = Acetato de etila

### 6.2.1 – Identificação de Biocompostos das Espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

Os resultados obtidos pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas estão representados na tabela 8.

Considerando a complexidade dos perfis cromatográficos apresentados pelos extratos orgânicos das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* em CCD, e a

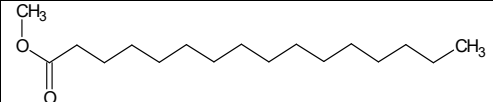
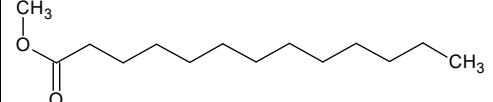
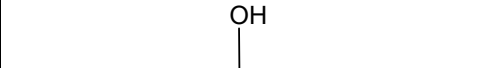
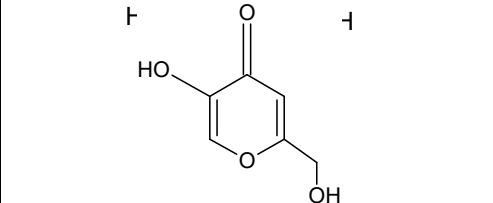
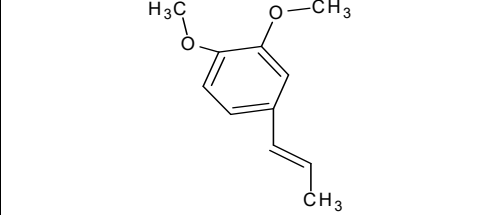
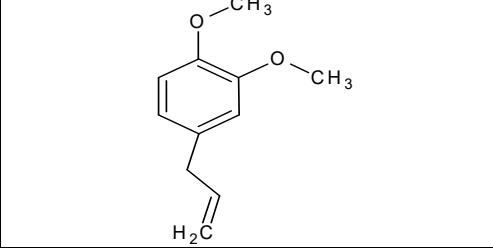
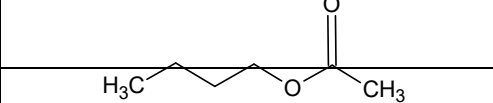
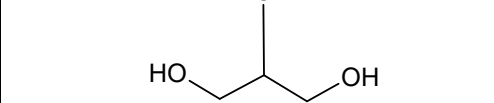
limitada quantidade obtida destes extratos orgânicos, os mesmos foram submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM). A técnica de CG/EM forneceu os espectros dos prováveis componentes químicos volatilizáveis presentes nos extratos brutos de acordo com a biblioteca eletrônica do sistema.

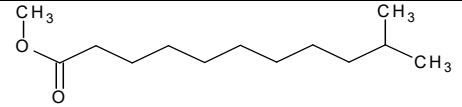
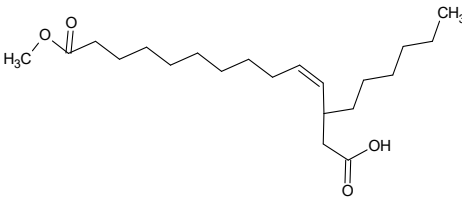

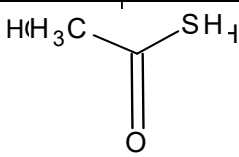
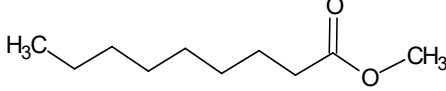
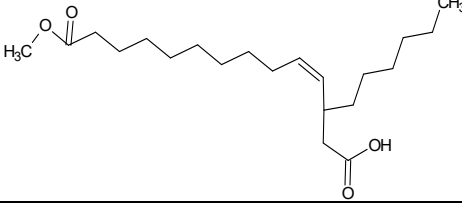
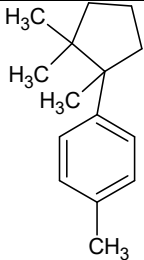
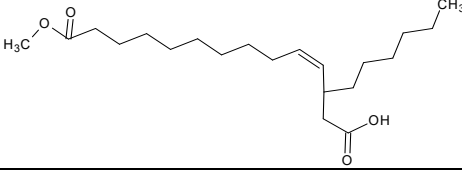
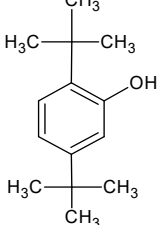
De acordo com as sugestões das referidas bibliotecas eletrônicas, as substâncias volatilizáveis dos extratos orgânicos brutos de acetato de etila e etanol estavam constituídos entre outros, por compostos aromáticos, ésteres graxos, álcoois diois, hidrocarbonetos de cadeia longa, esteróis.

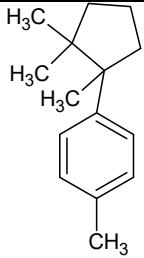
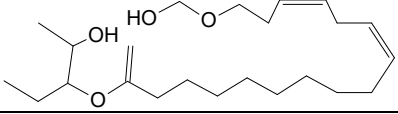
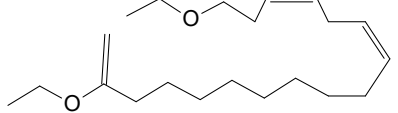
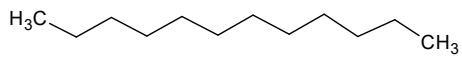
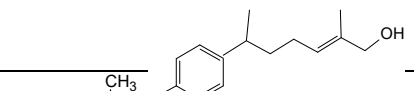
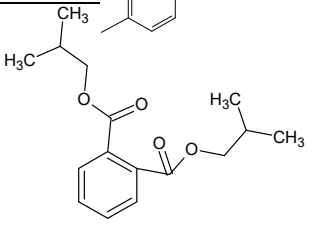
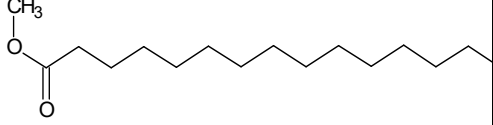
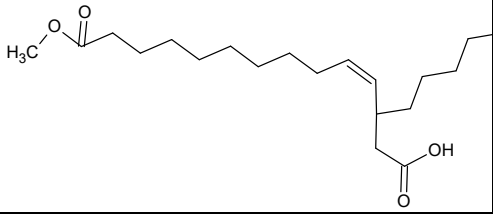
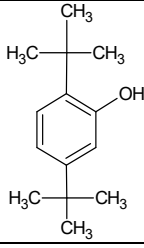
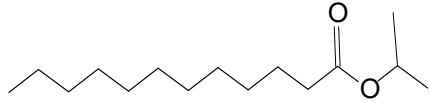
Os ácidos graxos são constituintes da membrana celular dos fungos estando comumente associados com glicerol, óleos, fosfolipídios, açúcares ou esteróis. Os ácidos graxos simples são raros, entretanto constituintes abundantes da membrana celular dos fungos. Nesses microrganismos, a principal função dos ácidos graxos é de armazenamento de energia, muitos deles são precursores de metabólitos secundários com ação definida, ou mesmo produzidos por vias que podem gerar um metabólito ativo (DEACON, 1197; GRIFFIN, 1993).

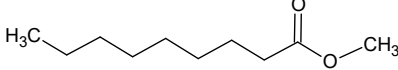
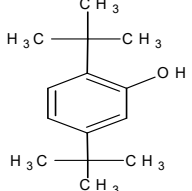
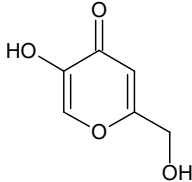
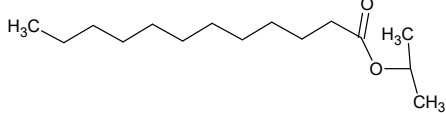
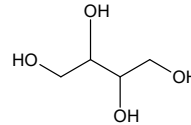
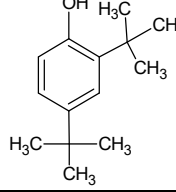
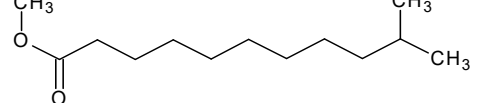
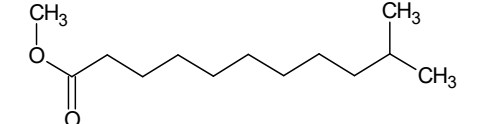
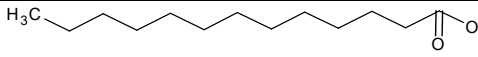
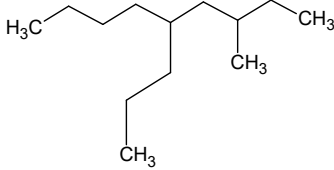
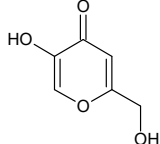
Observa-se também na tabela 8 uma considerável variação dos graus de semelhanças entre os espectros obtidos para as substâncias e os espectros correspondentes sugeridos pelas bibliotecas. Embora os valores dos graus de semelhanças mais próximos de 100% sejam bons indicativos das estruturas de possíveis metabólitos fúngicos, os demais valores apenas servem para comprovar que as bibliotecas não têm espectros correspondentes aos respectivos compostos detectados nas amostras. Por fim, deve-se considerar que mesmo para as melhores

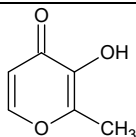
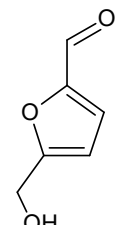
sugestões das bibliotecas são necessárias análises complementares que as comprovem.

Espécies	Extrato	Biocomposto	Formula Estrutural	Formula molecular
<b>Aspergillus</b>				
<i>A. flavus</i> Link CFAM 1097	AcOEt	Acido Hexadecanoico metil ester ( 45%)		C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
		Acido Tridecanoico metil ester (30%)		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
	EtOH	Glicerina (69%)		C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
		4H-Pirano-4-ona, 5-hidroximetil-2-(hidroximetil) (91,97%)		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
<i>A.niger</i> van Tieghem CFAM 580	AcOEt	Benzeno, 1,2-dimetoxi-4,1propenil (70%)		C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
		Benzeno 1,2-dimetoxi-4-2-propenil (65%)		C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
	EtOH	Acido acético butil ester (83,73%)		C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Glicerina (61,08%)			C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	

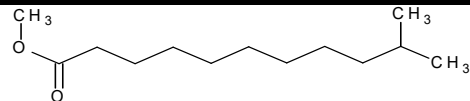

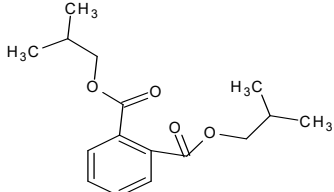
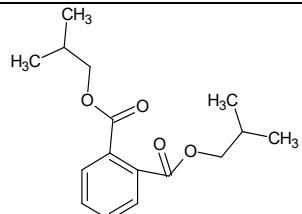
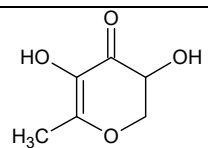
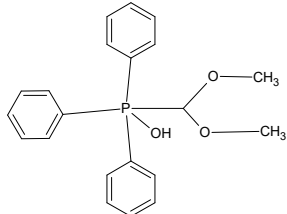
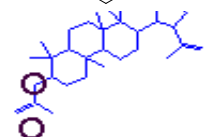
<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 568	AcOEt	Ácido undecanoico 10-metil éster (58%)		$C_{13}H_{26}O_2$
	AcOEt	Ácido 9-Octadecenoico 12-acetil-oxi-,metil éster (30%)		$C_{21}H_{38}O_4$
	EtOH	Glicerina (81,24%)		$C_3H_8O_3$
		Ácido Metanecarbóilico (54,215)		$C_2H_4OS$
<i>A. candidus</i> Link CFAM 04	AcOEt	Ácido nonanoico metil éster (40%)		$C_{10}H_{20}O_2$
		Ácido 9-Octadecenoico 12-acetil-oxi-,metil éster (57,34%)		$C_{21}H_{38}O_4$
	EtOH	Benzeno, 1-metil-4-(1,2,2-trimetilciclopentil)-, R (89,79%)		$C_{15}H_{22}$
<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 737	AcOEt	Ácido 9-Octadecenoico 12-acetil-oxi-,metil éster (40%)		$C_{21}H_{38}O_4$
		Fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil) (80%)		$C_{14}H_{22}O$

	EtOH	Benzeno, 1-metil-4-(1,2,2-trimetilciclopentil)-, R (74,71%)		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>
		Ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z)-, 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil éster (54,05%)		C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>
		Ácido Linoléico (44%)		C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
<i>A. japonicus</i> Saito DPUA 1273	AcOEt	Dodecane (56%)		C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>
		6-p-(Tolil)-2-metil-2-heptenol (79,57%)		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
	EtOH	Ácido 1,2-Benzenodicarboxílico, bis(2-metilpeopil) (78,11%)		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
		Ácido Hexadecanoico metil éster (56,98%)		C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
<i>A. flavo-furcatis</i> Batista & Maia DPUA 1532	AcOEt	Ácido 9-Octadecenoico 12-acetil-oxi -,metil éster (55%)		C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>
		Fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil) (81%)		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
	EtOH	Ácido Dodecanoico -1-metiletil éster (69,70%)		C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>

<i>A. niger</i> van Tieghem DPUA 1266	AcOEt	Ácido nonanoico, metil éster (74,11%)		C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
		Fenol, 2,5-bis(1,1-dimetiletil) (83,40%)		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
	EtOH	4H-Pirano-4-ona, 5-hidroxi-2-(hidroxi-2-metil) (94,88%)		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
		Ácido dodecanoico, 1-metiletil éster (81,51%)		C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 1000	AcOEt	1, 2,3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)] (81%)		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
<i>A. oryzae</i> Cohn DPUA 1412	AcOEt	Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil) (68%)		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
		Ácido undecanoico, 10-metil-metil éster (50%)		C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
<i>A. tamarii</i> Kita DPUA 1395	AcOEt	Ácido undecanoico, 10-metil-metil éster (58%)		C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
		Ácido tridecanoico metil éster (50%)		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
<i>A. flavo-furcatis</i> Batista & Maia DPUA1493	AcOEt	Nonana, 3-metil-5-propil (51,05%)		C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>
<i>A. niger</i> van Tieghem CFAM 133	AcOEt	4H-Pirano-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-diidroxi-6-metil (83,55%)		C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>

A. niger van Tieghem CFAM 98	EtOH	Maltol (73,22%)		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
		2-Furancarboxaldehyd, 5-(Hidroimetil) (86,09%)		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>

**Penicillium**

P. fellutanum CFAM 190	AcOEt	Ácido undecanoico acid, 10-metil-metil éster (73,05%)		C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
	EtOH	1,2,3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)] (83,41%)		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
		Ácido,1,2 Benzeno-dicarboxílico bis(2-metilpeopil) (69,87%)		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
P. implicatum CFAM 297	AcOEt	Ácido,1,2 Benzeno-dicarboxílico bis(2-metilpeopil)		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
	EtOH	4H-Pirano-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil (83,52%)		C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
P. implicatum CFAM 279	EtOH	Dimetoximetil-hidroxi-trifenilfosfolide (80,52%)		C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>
		Acetato Lup-20 (29)-en-3-ol, (3.beta.) (86,39%)		C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>

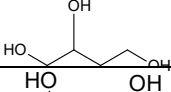
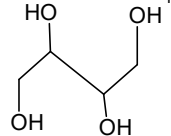
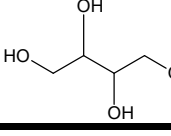
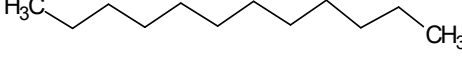
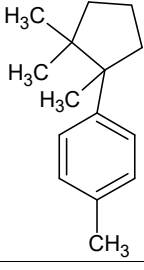
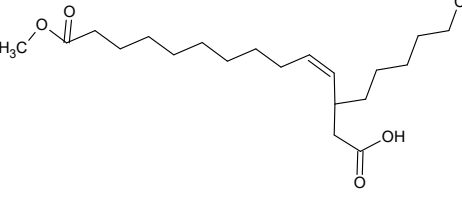
<i>P. fellutanum</i> CFAM 295	EtOH	1, 2, 3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)] (78,73%)		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
		2(R), 3(S)-1, 2, 3,4-Butanetetrol (53,43%)		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
<i>P. waksmanii</i> CFAM 299	EtOH	1, 2, 3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)] (83,84%)		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
<b>Trichoderma</b>				
<i>T. koningii</i> CFAM 497	AcOEt	Dodecana (45%)		C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>
	EtOH	Benzeno-1-metil-4-(1,2,2-trietilciclopentil, (R) (80,68%)		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>
<i>T. harzianum</i> CFAM 428	AcOEt	Ácido 9-Octadecenoico 12-acetil-oxi -,methil éster (54,73%)		C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>

Tabela 8 - Biocompostos identificados nos extratos AcOEt e EtOH de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* utilizando CG/EM. EtOH = Etanol; AcOEt = Acetato de etila

### 6.2.3 Bioautografia

Paralelamente a análise por CG/EM, os extratos orgânicos brutos também foram submetidos a análise por CCD com diferentes sistemas de eluição, em função das interações entre amostra/fase móvel/fase estacionária, o sistema foi otimizado, na tentativa de uma melhor separação dos compostos investigados no meio sólido. Nos



ensaios realizados os sistemas de eluição que apresentaram melhor resolução foi Hexano/Acetato de Etila/Etanol na proporção 3: 5: 2 v/v.

A partir do sistema de eluição selecionado, os extratos brutos produzidos pelas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* foram submetidos à Bioautografia, técnica considerada eficiente e sensível na determinação da atividade antimicrobiana, permitindo localizar substâncias antifúngicas e/ou antibacterianas em uma matriz complexa, onde combina a cromatografia em camada delgada (CCD) e o teste biológico *in situ*. (LOCKHART, 1954).

Dos 99 extratos brutos selecionados, quando submetidos à bioautografia, apenas oito extratos de espécies de *Aspergillus* apresentaram eficiência e sensibilidade na determinação da atividade antimicobacteriana, pois em apenas 10µL dos extratos utilizados foi suficiente para a formação de halo de inibição, apresentado na figura 12. Dentre estes, somente os extratos de Acetato de Etila.( AcOEt) e Etanol (EtOH), das espécies de *A. niger* DPUA 1266, *A. tamaritii* DPUA 1395, *A. oryzae* DPUA 1412 e *A. flavo-furcatis* DPUA 1532, apresentaram ação antimicobacteriana frente à *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607.



Figura 12 - Bioautograma do biocomposto, presente no extrato de AcOEt produzido por *Aspergillus niger* DPUA 1266, demonstrando positividade para *M.smegmatis* ATCC 607, após 24 horas de incubação a 37 °C.

Os dados apresentados não estabelecem a natureza dos compostos responsáveis pela ação antimicrobiana, porém, nesses extratos, quando analisados em CG/EM, foi observado a presença de compostos fenólicos e ésteres, substâncias que podem ser responsáveis pela ação verificada. O objetivo foi identificar a fração que era responsável pela ação antimicrobiana.

Os resultados revelam que os extratos, de acetato de etila e etanol, apresentaram substâncias ativas exibindo diferentes zonas de inibição em diferentes  $R_f$ , inferindo assim, a presença de atividade antimicrobiana em substâncias de diferentes polaridades, tabela 9. Observa-se ainda que se faz necessário o uso de diferentes metodologias no intuito de confirmar e conduzir a uma melhor elucidação das substâncias bioativas de origem microbiana.

Espécies	Agente extrator	<i>Rf</i>
		Atividade Antimicobacteriana
<i>A. niger</i> DPUA 1266	*AcOEt	0,60
	EtOH	0,75
<i>A. oryzae</i> DPUA 1412	AcOEt	0,45
	EtOH	0,65
<i>A. tamarii</i> DPUA 1395	AcOEt	0,50
	EtOH	0,45
<i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1532	AcOEt	0,70
	EtOH	0,40

### 6.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos Extratos Orgânicos Selecionados nos testes bioautográficos.

As propriedades microbiostáticas e microbidas a partir de produtos naturais vêm sendo comprovadas através de intensivas pesquisas em todo o mundo. Geralmente são estudadas, avaliadas e confirmadas por ensaios biológicos *in vitro* em testes de susceptibilidade ou sensibilidade (SOUZA et al., 2003), como o realizado no presente trabalho.

Por não haver método convencional padronizado para as novas drogas e a necessidade de novas drogas ativas é urgente desencadear um renovado e crescente interesse em avaliar extratos e frações na busca de novas substâncias (TELLES e MOSCA, 2000).

Muitas vezes pequenas alterações em técnicas simples já preconizadas podem apontar resultados inéditos e promissores para novas substâncias antimicrobianas. Neste contexto a adição do Cloreto de Trifeniltetrazoliun (TCC) (MERCK) a 1,0 % como

corante de viabilidade celular, facilitou a interpretação dos resultados da concentração mínima inibitória, na presença de crescimento celular foi observado a coloração púrpura a rosa como demonstrado na figura 12.

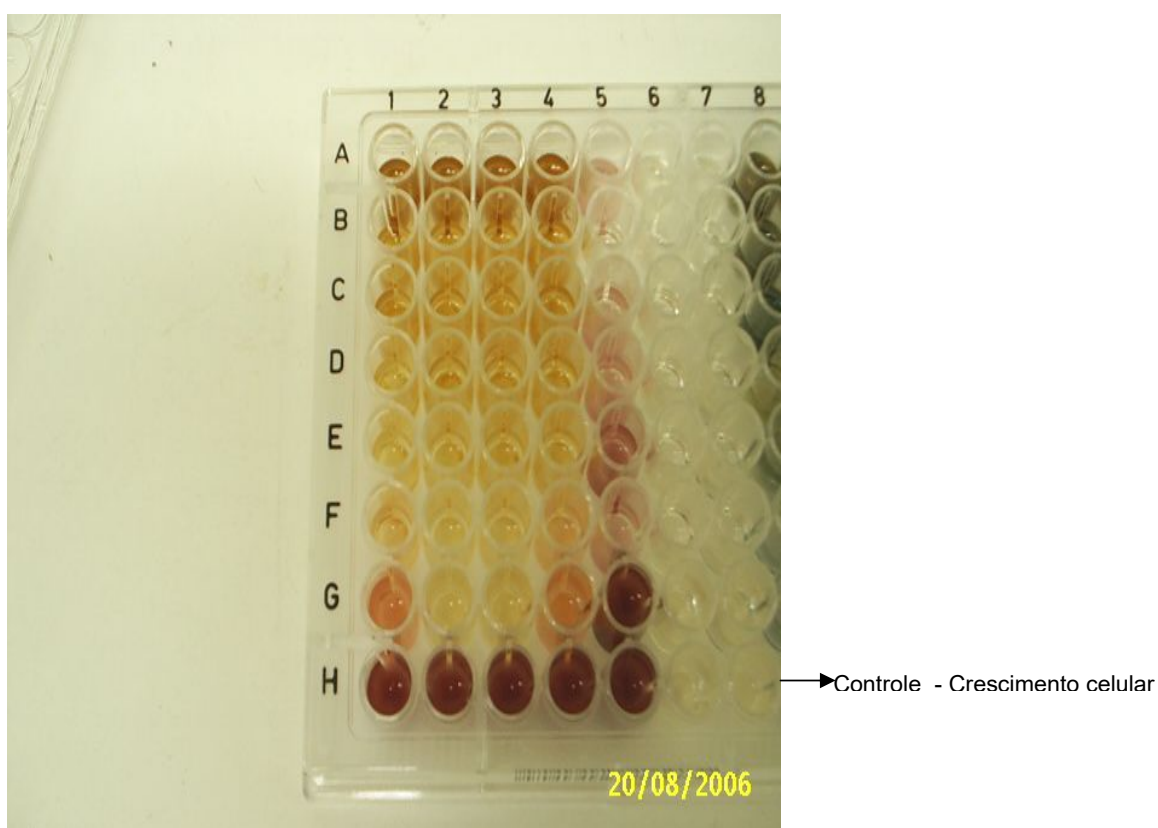


Figura 13 - CIM contra *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 dos extratos etanólico de *Aspergillus oryzae* DPUA 1412

O critério utilizado para a classificação da atividade dos componentes extraídos das espécies de *Aspergillus* foi: extratos com CIM menor que 100  $\mu\text{g/mL}$  são considerados ativos, extratos com CIM, entre 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$  apresentam atividade moderada, entre 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , baixa atividade e maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$  é inativo (HOLETZ et al., 2002; PRETTO et al., 2004; SARTORI 2005). Considerando a faixa de corte, dos oito extratos analisados, três apresentaram CIM <100  $\mu\text{g/mL}$ , portanto,

considerados ativos e os outros cinco com atividade moderada nas condições testadas. Os extratos de acetato de etila e etanólico de *Aspergillus tamarii* DPUA 1395 apresentaram os mesmos valores de CIM.

Os resultados sofrem uma alteração quando analisamos a concentração bactericida mínima - CBM, ou seja, apesar de visualmente não haver alteração de cor indicando crescimento celular, quando submetemos, à diluição anterior e posterior a concentração mínima inibitória, a crescimento em meio sólido desprovido de qualquer droga antimicrobiana, só não foi observado crescimento bacteriano na diluição anterior a da CIM, portanto levando em consideração a CBM temos, somente dois extratos ativos, isto é, CBM <100 µg/mL.

A tabela 10 apresenta os valores de CIM e da CBM, os menores valores foram obtidos nos extratos etanólico das quatro espécies de *Aspergillus* analisadas.

Os resultados indicam a necessidade de continuar a pesquisa com o intuito de se identificar os princípios ativos puros responsáveis pela atividade antimicobacteriana dos extratos de acetato de etila e etanólico das espécies de *Aspergillus*, bem como determinação estrutural.

Espécies	Agente Extrator	CIM $\mu\text{g/mL}$	CBM $\mu\text{g/mL}$
<i>A. niger</i> DPUA 1266	AcOEt EtOH	125 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$
<i>A. oryzae</i> DPUA 1412	AcOEt EtOH	125 $\mu\text{g/mL}$ 31 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$ 62,5 $\mu\text{g/mL}$
<i>A. tamarii</i> DPUA 1395	AcOEt EtOH	62 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$
<i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1532	AcOEt EtOH	125 $\mu\text{g/mL}$ 31 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$ 62,5 $\mu\text{g/mL}$

Tabela 10 - Determinação da CIM pela técnica de diluição em microplacas e da CBM dos extratos de AcOEt e EtOH das espécies de *Aspergillus* com ação antimicobacteriana pelo método bioautográfico, \*AcOEt = Acetato de Etila.; \*EtOH = Etanol

#### 6.4 Testes de Toxicidade Para *Artemia Franciscana*

Os oito extratos avaliados apresentaram percentual de letalidade (%L) >50 %, portanto, todos foram selecionados para avaliação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>). A partir do percentual de *Artemia* morta obteve-se o valor de probites. Esse foi plotado contra o log da concentração do extrato, obtendo-se, dessa relação, uma reta através de regressão linear.

Através dos resultados obtidos do grau preliminar de letalidade de *A. franciscana* podemos confirmar que entre as espécies fúngicas analisadas há substâncias bioativas, utilizando-se a CL<sub>50</sub> como parâmetro de avaliação de atividade biológica, pois compostos bioativos são geralmente tóxicos.

Dada a atividade antimicrobiana detectada na bioautografia, a sugestão da presença de substâncias quimicamente ativas na análise do GC/MS e a atividade contra larvas de *A. franciscana*, essas espécies ativas podem vir a ser fontes de potenciais substâncias antimicrobianas.

DOLABELA (1997) estabeleceu critérios de classificação para avaliação da CL<sub>50</sub>: de acordo com seus estudos de atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* nos quais sejam: extratos com CL<sub>50</sub> <80 µg/mL, altamente tóxicos; CL<sub>50</sub> entre 80 µg/mL e 250 µg/mL, moderadamente tóxico; e CL<sub>50</sub> >250 µg/mL, com baixa toxicidade ou não tóxicos. Dos extratos analisados 62,5 % apresentaram valores de CL<sub>50</sub> inferiores a 80 µg/mL, portanto altamente tóxicos e os 37,5 % moderadamente tóxicos.

Os extratos que apresentaram maiores graus de toxicidade (CL<sub>50</sub>) foram os extratos de acetato de etila (AcOEt) de todas as espécies de *Aspergillus* submetidas ao bioensaio, apenas a espécie *A. oryzae* DPUA 1412 demonstrou ser altamente tóxico tanto no extrato de AcOEt como no extrato etanólico ( EtOH), tabela 11.

ESPÉCIE	Agente extrator	% L <i>A. salina</i>	CL <sub>50</sub>	TOXICIDADE
<i>A. niger</i> DPUA 1266	*AcOEt EtOH	80 56,67	19,23µg/ml ± 2,18 106,6µg/ml ± 5	altamente tóxicos moderadamente tóxico
<i>A. oryzae</i> DPUA 1412	*AcOEt EtOH	60,0 53,33	63,40µg/ml ±3,38 69,56µg/ml ±3,41	altamente tóxicos
<i>A. tamarii</i> DPUA 1395	*AcOEt EtOH	47 60	32,47µg/ml ±3,21 146,38µg/ml ±8,77	altamente tóxicos moderadamente tóxico
<i>A. flavo-furcatis</i> DPUA 1532	AcOEt EtOH	80 46,5	21,53µg/ml ±1,27 162,44 µg/ml ±30,36	altamente tóxicos moderadamente tóxico

Tabela 11 - Resultado do teste de toxicidade de extratos orgânicos das espécies de *Aspergillus* usando como modelo a *Artemia franciscana*, durante 24 horas. \* AcOEt – acetato de etila ; \*EtOH = Etanol

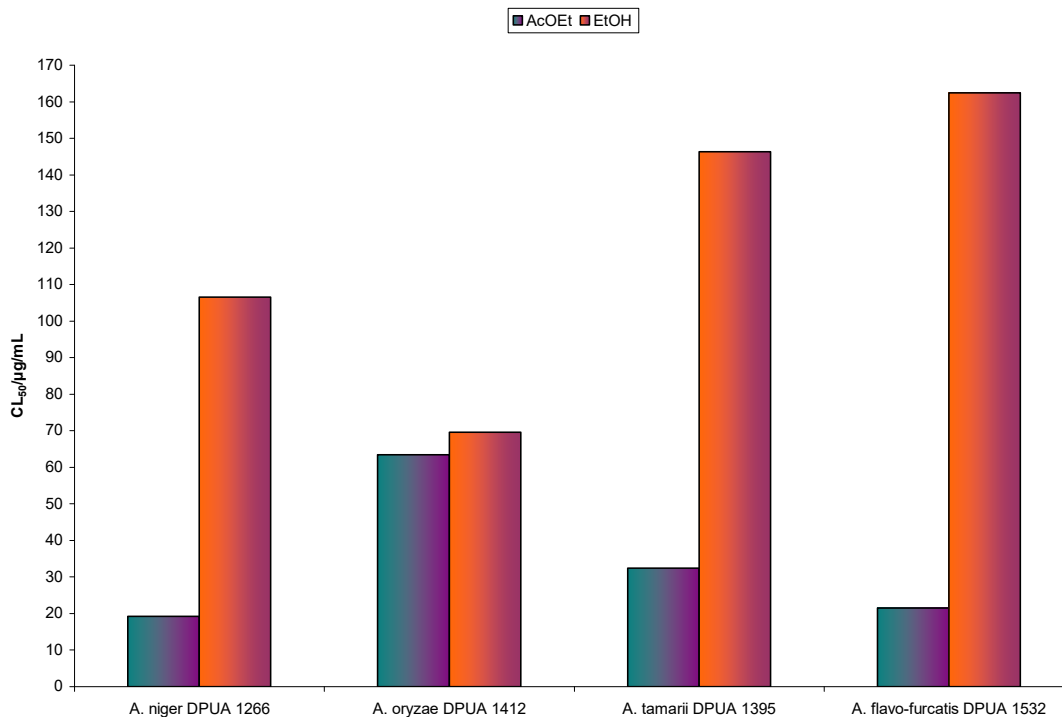


Figura 14 – Figura comparativa dos valores de  $CI_{50}$  para as espécies de *Aspergillus* frente a *Artemia salina*

Os resultados demonstrados na figura 13 não apresentaram consonância quando comparados com os demonstrados na CIM, uma vez que, os extratos EtOH foram os extratos mais ativos, com  $CIM < 100\mu\text{g/mL}$  e não os extratos AcOEt. Entretanto esses resultados não inviabilizam os testes preliminares de citotoxicidade em *A. franciscana*, como fundamentais e convenientes em *screening* novos metabólitos secundários bioativos.

Corroborando, portanto com inferências relatadas na literatura sugerindo uma correlação entre a toxicidade geral frente à *Artemia franciscana* e atividade biológica (MEYER et al., 1982; CAVALCANTE et al., 1999; ZUQUE et al., 2004).



Novas alternativas de avaliação da toxicidade das substâncias bioativas recomendando o uso criterioso de animais de laboratório, faz com que seja crescente o uso desses microcrustáceos como indicadores de toxicidade preliminar, triagem de toxinas fúngicas, avaliação de efeitos a exposição a metais pesados, toxicidade de substâncias químicas, pesticidas (BARAHONA e SANCHEZ-FORTÚN, 1996; HARWIG e SCOTT, 1971; LHULLIER et al., 2006; MARTINEZ et al., 1999,).

Meyer et al., 1982, propôs o teste de *Artemia* como um bioensaio simples para produtos naturais, na detecção e isolamento dos seus constituintes e atualmente vem sendo utilizado como substituto, barato e rápido para os ensaios citotóxicos. Além de não necessitar de equipamentos especiais e utilizar uma pequena quantidade da amostra para o teste (50 mg do extrato bruto), em apenas 24 horas. Para o cálculo da  $CL_{50}$  é utilizado o método Probit.

Associado as vantagens já citadas pode-se acrescentar que é um ensaio preliminar e não exige técnicas assépticas, por isso grupos, de diferentes áreas, implantaram o teste (AJAIYEGBA, RAHMAN e CHOUDHARY, 1998, QUIGNARD *et al.*, 2003; SIQUEIRA, BOMM e PEREIRA, 1998; SIQUEIRA E ZIMINIANI, 2001).

O conhecimento entre pesquisadores é que se faz necessário a pesquisa de novos medicamentos para o tratamento da Tuberculose e outras doenças causadas por mico bactérias. A pesquisa por substâncias ativas contra mico bactérias e por sua vez menos tóxicas, tem motivado e empenhado pesquisadores na busca de soluções para o tratamento da tuberculose, que desde a antiguidade vem dizimando populações. Os medicamentos chamados naturais expressam o estudo por substâncias oriundas de fontes renováveis e de fácil manuseio.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Dentre os fungos analisados foram selecionados 24 *Aspergillus* spp, 27 *Penicillium* spp e 24 *Trichoderma* spp. que expressaram atividade antimicrobiana frente a *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607.

2. Dos 33 que expressaram halo superior e/ou igual a 25 mm, o perfil cromatográfico e bioautográficos revelou:

2.1. Entre os 99 extratos orgânicos analisados em CCD, o maior número de biocompostos foi observado nos extratos oriundos de *A. niger* DPUA1260 (28 compostos) e *A. tamarii* DPUA 1395 (21 compostos);

2.2 Os dados obtidos em CG/EM mostraram que nos extratos AcOEt e EtOH de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, os prováveis constituintes químicos, entre outros, são compostos aromáticos, ésteres graxos, álcoois, hidrocarbonetos de cadeia longa e esteróis;

2.3 Na bioautografia, apenas os extratos de *A. niger* DPUA 1266, *A. tamaritii* DPUA 1395, *A. oryzae* DPUA 1412 e *A. flavo-furcatis* DPUA 1532 de AcOEt e EtOH demonstraram atividade frente a *M.smegmatis* ATCC 607.

3. A CIM de 31 µg/mL dos extratos etanólico de *A. oryzae* DPUA 1412 e *A. flavo-furcatis* DPUA 1532 foi a de maior eficiência contra *M.smegmatis* ATCC 607.

4. Os ensaios frente à *Artemia franciscana* mostraram que todos os extratos testados apresentaram toxidez significativos sendo os extratos de acetato de etila de *A. niger* DPUA 1266 com CL<sub>50</sub> de 19,23µg/ml e *A. flavo-furcatis* DPUA 1532 CL<sub>50</sub> de 21,53µg/ml as mais tóxicas;

5. Os dados apresentados neste trabalho são inéditos e contribuem para o conhecimento de novos compostos bioativos que podem vir a ser usados como matrizes para a descoberta de novos fármacos.

## 8. REFERÊNCIAS

AJAIYEGBA, E.O., RAHMAN, A.U. e CHOUDHARY, I.M. Preliminary antifungal and cytotoxicity studies of extracts of *Ritchies capparoides* var. longipedicellata. **Journal of Ethnopharmacology**, 62: 243-246, 1998.

AL-HAJJAJ *et al.*,2001; AL-HAJJAJ, M.S.; AL-KASSIMI, F.A. AL- MOBEIREEK, A.F.ALZEER, A.H.Progressive rise of *Mycobacterium tuberculosis* resistance and streptomycin in Riyadh, Saudi Arabia. **Respirology**, V.6, n.4, p.317-322, Dec. 2001.

BARAHONA, M.V. e SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 56: 271-278, 1996

BARRETO, A.M.W.; CAMPOS,C.E.D.; MARTINS,F.M.Manual de bacteriologia da tuberculose:Centro de referência Prof. Hélio Fraga.2ed. **Rio de Janeiro:Guanabara**, 115p 1994.

BENNETT, J. W. Mycotechnology the role of fungi in biotechnology. **J. Biotechnol.**, v.66, p. 101-107,1998.

BEPPU, T. Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Gene* v. 115, p. 159-165, 1992.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.2357-2372, 1991a.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybastium*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.2372-2417, 1991b.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum . **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.2418-2420, 1991c.

BONONI, V. L. R. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. São Paulo/SP. 1999.

BRIZUELA, M. A.; GARCIA, L. ; PEREZ, L. ; MANSUR, M. Basidiomicetos : nueva fuente de metabolitos secundários. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 15 p. 69-74, 1998.

BROCK, T. D.; MADIGAM, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. New jersey. Prentice Hall International Inc. 2000. 909p.

BRUNDTLAND, H. **Vencendo a resistência microbiana**. World Health Report on Infectious Diseases. OMS. 2000.

BUENO-GOMES, R. **Análise genética e molecular da parassexualidade em *Penicillium chrysogenum***. Rio Claro. Tese ( Doutorado) – Instituto de Biociências , Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2000.140p.

CALIXTO,J.B.; YUNES,R.A. **Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Editora Argos, Chapecó, 2001

CALIXTO,J.B 2003

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.70, p.181- 84,1967

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R. e ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, 23: 20-22, 2000.

COHEN, P.A., TOWERS, G.H.N. Chlorination of antraquinones by lichen and fungal enzymes. **Phytochemistry**, V.44, 271-274, 1997

COLLINS, et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. UNICAMP, 7ª ed., São Paulo, p.65,68,185, 1997.

COWAN ,M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiological Reviews**. v.12, p.564-582, 1999.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: A textbook of industrial microbiology**. 2.nd ed. Sunderland: Sinauer Associates,1990.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; MONTRUCCHIO, D. P.; FERREIRA, J. L.; OLIVEIRA, J. S.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 803.

DEACON, J. P. **Modern mycology**. Oxon-NY: Blackwell Science, 1997.

DEMAIN,A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 455-483, 1999.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 1- Production of non volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society London**, V.57, pt.4, p.25-39, 1971a.

\_\_\_\_\_ Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 2- Production of non volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society London Society**, V.57, pt.1, p.41-48, 1971b.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*.3 – Hiphal Interaction. **Transactions of the British Mycological Society London**, V.57, pt.3, p.363-369, 1971c.

DINIZ *et al.* 1995 - DINIZ, L.S.; GERHARDT,G.; MIRANDA,J.A.; MANCEAU,J.N.Efetividade do tratamento da tuberculose em oito municípios de capitais brasileiras.**Bol. Pneum. Sanit.** V.3, p. 8-18, 1995

DOLABELA, M.F. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas.** Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. 128p

ELLOF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Medica.** v.64, p. 711- 713, 1998.

ESPOSITO, E.; Systematics and enviromental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology** , v.24, n.2, p.89-98, 1998.

FARMAINDUSTRIA **A potencialidade dos antibióticos e a saúde,** Fundação Farmaindustria, 1999.

FONSECA, A.L. **Antibióticos na clínica diária.**2.ed. Rio de Janeiro: EPUME,1984.

FREIRE,1989; - FREIRE, D. N. Tuberculose In AMATO NETO, V. ; BALDY , J. L. S. **Doenças Transmissíveis**, 3a ed., rev. e ampl., São Paulo, SARVIER,p. 845-868.; 929pp.1989.

FURTADO, N. A. J. C.; FONSECA, M. J. V.; BASTOS, J. K. The Potencial of na *Aspergilluss fumigatus* Brazilian Sstrain to Produce Antimicrobial Secondary Metabolites. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 357-362, 2005

GÖHRT, A. ; ZEECK, A. Secondary metabolites by chemical screening. 9 Decarestricts, a new family of inhibitors of cholesterol biosynthesis from *Penicillium*. **J. Antibiot**, v.45, p. 56-65, 1992

GOODMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2 ed. New York, John Wiley and Sons, p. 458, 1993.

GUTIÉRREZ, S.; CASQUEIRO, J.; MARTIN, J.F. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundários. **Revista Iberoamericana de micología**. Bilbao-Espanha, v.17, p. 54-60, 2000.

GRESSEL, J. B. ; HARTNANN, K.M. Morphogenesis in *Trichoderma*. Action spectrum of photoinduced sporulation. **Planta**, v.79, p.271-274, 1968.

HART *et al.*, 1996- HART, C.A.; BEECHING, N.J.; DUERDEN, B.I. Tuberculosis into the next century. **J. Med. Microbiol.** V.44 p.1-34, 1996.

HARVEY, A. Strategies for discerning drugs from previously unexplored natural products. **Drug. Discov. Today**,. V. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A.; A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural products**. v.50, n.1, p.19-22, 1987.

HARWIG, J. e SCOTT, P.M. Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**, 21: 1011-1016, 1971



HEFTMANN, E. **Chromatograph**. 2. ed. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1967.

HIJJAR, A. M.; OLIVEIRA, M. J. P. R.; TEIXEIRA, G. M. Tuberculose no Brasil e no Mundo. **Boletim de Pneumologia sanitária** volume 9 nº2 2001.

HOFMANN, G.; McINTYRE, M. & NIELSEN, J. Fungal genomics beyond *Saccharomyces cerevisiae*? **Current Opinion in Biotechnology**. Vol. 14, Issue 2, pág. 226-231. Abril 2003.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. e DIAS-FILHO, B.P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97: 1027-1031 2002.

ISEMAN, 1993 - ISEMAN, M.D. Treatment of multidrug resistant tuberculosis. **N. Engl. J. Med.** V.329, p. 784-791, 1993

ISENBERG, H.D.. **Clinical microbiology Procedures Handbook**. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1992. v.1.

JAUREGUI, P. Demasiados antibióticos . **Salud y Medicina**, v.261, p. 128-132, 1997.

JARDIM, P.C.R.; ZAMARIOLI, L.A.; COELHO, A.G.V. FIGUEIREDO, T.R. ROZMAN, M.A. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas no município de São Vicente. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. V.60, n.2, p.119-123, 2001.

JARVIS, W.R. **Resistência global – impacto e tendências: um problema de patógenos emergentes principalmente em instituições de saúde**. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/resistglobal-2.html> . Acesso em: 14 jul 2003.

JORGENSE, J.H., TURNIOGE, J.D., WASHINGTON, J.A. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disc Diffusion Methods. in: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENDUER, F.C., YOLKEN, R.H. Manual of Clinical Microbiology. cap. 118. Section VIII. p. 1526–1543. 7th edition. ASM Press., 1999.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 3º ed. Guanabara Koogan 2003

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.N.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr, W.C.. **Antimicrobial susceptibility testing**. In: **Color Atlas and text book of diagnostic microbiology**. 5.ed. Philadelphia- New York: Lippincott, 1997, 398-408p.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico laboratorial de Microbiologia: texto e Atlas colorido. 5.ed. São Paulo: **Editora Medsi**, p. 941 –947, 2001.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Guanabara Koogan. 1999.  
KRITSKI *et al.*, 1993; KRITSKI, AL.; DALCOMO, M.P.; BRAVO DE SOUZA, R.; HOLLANDA, T.; GONTIJO FILHO, P.P.; FIUZA DE MELO, F.A. Tuberculose entre profissionais de saúde. Risco ocupacional. **J. Pneumol.**, V.19, p 113- 121, 1993

LARPENT, J. P.; SANGLIER, J.J. **Biotechnologie des antibiotiques**. Paris: Masson, 1989.

LEITE *et al.*, 1995; LEITE, C. Q. F.; SOUZA, C. W. O. and LEITE, S. R. A. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: Four years of experience. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, nov./dec. vol. 93(6):801-805. 1998

LOKAVAN, J., BRADDOCK, J.F. Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia gradiflora* ( Clusiaceae). **Oecology**. V119, p.534-540, 1999.

LOGOEIRO, C. **Tuberculose: Numerologia Macabra** Radio Nederland wereldomroep. 2000 Disponível em <http://www.mw.nl/parceria/html/tuberculose.html>. Acesso em 9 de fev 2004.

MACIAS, F. A.; VARELA, A. R. M. ; SIMONET, A. M. ; CETLER, H. G. ; CUTLER, S. J. ; ROSS, S. S. ; DUNBAR, D. C. ; DUGAN, F. M. ; HILL, R. A. (+) – Brevione A. The first member of a novel family of bioactive spiroditerpenoids isolates from *Penicillium brevicompctum* dierckx. **Tetrahedron lett.**, v. 41, p. 2583-2686, 2000.

MANFIO, G.P. **Biodiversidade : Perspectivas e oportunidades tecnológicas. Microrganismos e aplicações industriais.** Base de Dados Tropical. Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br> . Acesso em: 31 jan 2003.

MARREIROS, L. S.; GARCIA, F. T .P. & TOLEDO, L. M., Tuberculose no Estado do Amazonas. In: *Espaço e Doenças, um olhar sobre o Amazonas*. (L. I. Rojas & L. M. Toledo, org.), pp. II.6.1-II.6.10 , Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 1997.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFP, 1997

MATEOS, P. F. (2004) Produccion de antibióticos. <http://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema15MI.html>), acessado em 02/02/2004 de antibióticos.

MELO, F. M. P., Atividade antifúngica de metabolitos secundários produzidos pelo endofítico de mandioca *Bacillus pumilus* MA III M4<sub>a</sub>. Piracicaba. Dissertação de mestrado em Agronomia da Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP. 84p. 2005.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, 45: 31-34, 1982..

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE *Controle da Tuberculose, Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço*. Brasília: **Ministério da Saúde**. 1994.

\_\_\_\_\_ Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Plano Nacional de Controle da tuberculose**. Brasília, DF, p.1-15,1999

\_\_\_\_\_ I Consenso brasileiro de tuberculose-1997 *Jornal de Pneumologia*, 23: 281-346. 1998.

\_\_\_\_\_ Controle da Tuberculose, Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço. Rio de Janeiro: Centro de Referência Professor Hélio Fraga, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. 2002c.

\_\_\_\_\_ Manual de Normas para o Controle da Tuberculose. Brasília: **Ministério da Saúde**. 2000.

\_\_\_\_\_ Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**. Brasília, 2002, 64 p. (Cadernos de Atenção Básica no 6. série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 148).

\_\_\_\_\_ *Programas e Projetos*, 2002a (acesso 22 maio 2002<<http://www.saúde.gov.br/programas/Tuberculose/intro.html>>).

\_\_\_\_\_ Política Nacional de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**. 2002b.

----- Vigilância em Saúde. Dados e Indicadores selecionados. Secretaria de Vigilância em Saúde :12 pp. 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M.; The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, V. 17, p. 215-234, 2000.

\_\_\_\_\_ Microbial biotechnology **Trends in Biotechnol.**, v. 18, p. 25-31,2000.

NAVICKIENE, H. M. D.; LOPES, L. M. X. Alkamides and phenethyl derivatives from *Aristolochia gehrtii*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 4, p. 467-472, Aug. 2001.

OKANADE, A. L.; ELVIN-LEWIS, P. F. ; LEWIS W. H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry** v. 65, p. 17-32, 2004.

OLIVEIRA, C.C.; SIQUIERA,J.M.; SOUZA,K.C.B.; RESENDE,U.M. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de plantas do cerrado. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, Fortaleza, Ceará. **Anais,1994**

OLIVEIRA, D.G. **Caracterização Sócio-demográfica e Epidemiológicas da Tuberculose: avaliação etnobotânica e da atividade antimicobacteriana das plantas utilizadas por uma comunidade indígena.** Araraquara: UNESP, 2006. Tese de Doutorado em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista, 2006

ONIONS, A. H. S.; ALLSOPP, D.; H. O. W. **Smith's introduction to industrial mycology.** 7. ed. Bedford Square : Edward Arnold.1981.

OASHI, M.C.G. Tese de Doutorado, **1999.** ([www.eps.ufsc.br](http://www.eps.ufsc.br) , visitado em 14/01/06)

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 1-80, 1997.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia.** 2 ed.São Paulo: McGraw- Hill do Brasil, 1997.

PETSKO, G. A. For medicinal purposes. **Nature**, v. 384, p.7-9, suppl., 1996.

PITT, J. I. **A laboratory guide to Common *Penicillium* species,** Austria: **CSIRO**, 1985.182 p.

PORTO, A. L. M.; MACHADO, S. M. F.; de OLIVEIRA, C. M. A.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. E.; MARSAIOLI, A. J. Polyisoprenylated benzophenones from clusia floral resins. **Phytochemistry**, V.55, p. 755-758, 2000.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NULDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAISAS, E. B.; BELLA CRUZ, A. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *calophyllum brasiliense*. **Z. Naturforsch**, V59, p.657-662, 2004.

QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M. Screening of plants found in Amazonas State for lethality towards brine shrimp *Artemia franciscana*. **Acta Amazônica**, 33 93-104, 2003

RANCIÉ, A.; SOKOVIÉ, M.; KARIOTI, A.; VULKOJEVIĆ, J.; SKAL TSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. Servia, v.(22), p. 80-84, 2006.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genes *Aspergillus***. New York: Robert E. Krieger, 1987

RAPPER, B. K. S.; THOM, C. A.. **Manual of the *Penicillium***. Williams and Wilkins, Baltimore, 1968. 875 p. 1968

RAZACK, A. A.; BACHMANN, G. Activities of microflora in soils of upper and lower Egypt. **The African Journal Mycology and Biotechnology**. Australia, v. 7, p. 1-19, 1999.

ROBBERS, J.E.; SPEEDE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**, Baltimore: williams & Wilkins, p. 2-3, 1996.

ROLLINS, D.M.; Broth Tube MIC. Disponível em:

<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/BrothTubeMIC.htm>

Acessado em: 10/11/2006

RUFFINO-NETO, A. & SOUZA, A. M. A. F., 1999. Reforma do setor saúde e controle de tuberculose no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, 8:35-51.

SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. **Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other estrolites. Studies Mycology**, n.49, p.1-173, 2004.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma: a review of biology and sytematics of the genes. Mycological Research*, v.100,n.8, p.923-935,1996

SARTORI , M. R. K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmelia brasiliensis* SPRENG ( *Wedelia paludosa*) ( ASTERACEA). ITAJAI. Dissertação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí. 81p. 2005.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D.V. Doenças Infeciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. **Guanabara Koogan**. 2ed. Rio de Janeiro, p301-315,2001.

SILVA, P. **Princípios Farmacológicos da Antibioticoterapia**. In: SILVA, P.. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. p.931-948. 1998

SILVA SANTOS, C.S. **Monitoramento de Fungos Toxigênicos em Plantas Medicinais Comercializadas na Cidade Manaus – Amazonas - Brasil** Dissertação de Mestrado 52p 2005

SILVA NEVES, K. C.; PORTO, A.L.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de Leveduras da Região Amazônica para Produção de protease Extracelular. **Acta Amazônica. Amazonas**, 36 (3) 299-306, 2006

SIQUEIRA, J.M. e ZIMINIANI, M.G. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriúscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, 24: 185-187, 2001.

SIQUEIRA, J.M., BOMM, M.D. e PEREIRA, N.F.G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, 21: 557 –559, 1998

SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. A comparision of some preservation techniques for fungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 81 (3): 535-540, 1983.

SOTERO-MARTINS, A. ; BON, E.. P. S.; CARVAJAL, E. Asparaginase II-Gep fusion as a Tool For Studying the Secretion of the Enzyme under Nitrogen Starvation. *J. Microbiology*, v. 34, p. 373-377, 2004.

SOUZA, M.V.N. e VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, 28: 678-682, 2005.

SOUZA, M.M.; CRUZ, A.B.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; CRUZ, R.C.B.. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.

SOUZA, H. C. A.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA J. M. Investigação Fitoquímica e Isolamento da Substância Antibacteriana Presente na Espécie Ananás erectifolius (curauá) **Revista Científica da UFPA** <http://www.ufpa.br/revistaic> Vol 4, 2004.



STROL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug. Discov. Today**, v. 5, n.2, p. 39-41, 2000.

SUGIE, Y.; HIRAI, H.; INAGAKI, T.; ISHIGURO, M.; KIM, Y-J.; KOMIJA, Y.; SARAKIBARA, T.; BRENNAN, L. A New antibiotic CJ-17,665 from *Aspergillus ochraceus*. **The journal of antibiotics**, v.54 (11) p.911- 916, 2001.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TAKAHASHI,T.; KOKUBO,R.; SAKAINO,M.. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**. V.39, p.60-64, 2004.

TELLES, M.A.S.; CURCIO, M.; UEKI, S.Y.M.; PALACI, M. Quimioterapia da Tuberculose: Fundamentos, regimes e resistência bacteriana. **Rev.Ciênc.Farm**.São Paulo, v.18, n.1,p.29,1997 .

TELLES, M.A.S. e MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev.inst. Adolfo Lutz**, 59: 16-19, 2000

TIERNEY JR *et al.*, 2001 - TIERNEY JR, L.M.; MCPHEE, S.J.;PAPADAKIS,M.A. Diagnóstico & Tratamento. **Atheneu Editora**. São Paulo, p.1228-1233, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiology: an introduction. 17.ed. New York: Addison Wesley Longman, 2005. p.549-575.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

VAN DER WATT, H.V.H.; BARNARD, R.O.; CRONJE, I.J.; DEKKER, J.; CROFT, G.J.B. & Van der WALT, MARIA M. Amelioration of subsoil acidity by application of a coal-derived calcium fulvate to the soil surface. **Nature**, 350:146-148, 1991.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia –São Paulo. **Ed. Atheneu.**, p 915-921, 1996

WATANABE, A. & RUFFINO-NETTO, A. O perfil epidemiológico dos casos de tuberculose notificados em hospital terciário. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, 9:20-33. 2001.

WHO – World Health Organization Statistical Information System Website – <http://www.who.ch> Acesso Maio / 2003.

YUTAKA, S.; HIDRO, H.; TAISCURE, I. ; et al Anew Antibiotic CJ-17, 665 from *Aspergillus ochraceous* . **J. Antibiotc.**, v. 54, n. 11, p. 911-916, 2002.

ZAROR, ESPÍNEL-ENGROFF In LARPENT, J. P. ; SANGLIER, J. J. **Biotechnologie des antibiotiques**. Paris: Masson, 1989.

ZELENKOVA, N. F.; VINOKUROVA, N. G.; ARINBASAROV, M. O. **Analysis of secondary metabolites microscopic fungi of the genus *Penicillium* by chromatographic techniques**. Applied Biochemistry and Microbiology, v.39, nº 1, p. 44-54, and 2003.

ZUQUE, A.L.F.; WATANABLE, E.S.; FERREIRA, A.M.T.; ARRUDA, A.L.A.; RESENDE, U.M.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14: 129-136, 2004.

## 9. TRABALHOS FUTUROS

- Realizar análise de RMN dos extratos selecionados;
- Elucidação estrutural das moléculas ativas;
- Testar os extratos selecionados contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* padrões nacionais e nas cepas da região amazônica em parceria com o LACEM regional.