

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO DOS METABÓLITOS DE *Aspergillus fumigatus* VISANDO O**  
**ISOLAMENTO DE UMA SUBSTÂNCIA BIOATIVA CONTRA**  
***Mycobacterium tuberculosis***

**EMILY MARCELE SOARES SILVA**

**MANAUS - AM**  
**2014**

**EMILY MARCELE SOARES SILVA**

**Bióloga**

**ESTUDO DOS METABÓLITOS DE *Aspergillus fumigatus* VISANDO  
O ISOLAMENTO DE UMA SUBSTÂNCIA BIOATIVA  
CONTRA *Mycobacterium tuberculosis***

**Dissertação apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio**

**Co-orientadora:**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cristina Sayuri Maki**

**MANAUS - AM  
2014**

## Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, Emily Marcele Soares  
Estudo dos metabólitos de *Aspergillus fumigatus* visando o isolamento de uma substância bioativa contra *Mycobacterium tuberculosis* / Emily Marcele Soares Silva. 2014  
53 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rudi Emerson de Lima Procópio  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. *Mycobacterium* spp. 4. Atividade antimicrobiana. I. Procópio, Rudi Emerson de Lima II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico*

*À minha mãe Maria Eley Oliveira Soares,  
por todo amor, proteção e dedicação a mim e  
à minha irmã Evelyn Soares.*

*Ofereço*

*A Deus, por nunca nos abandonar  
e pela Sua generosidade, pois  
nada acontece sem Sua permissão.*

*Agradeço,*

*Ao Dr. **Rudi Emerson de Lima Procópio** pela orientação, generosidade e conhecimentos passados ao longo dessa jornada.*

*À Dr<sup>a</sup>. **Cristina Sayuri Maki**, professora que muito estimo, por todo o auxílio, orientação e paciência ao longo desses anos.*

*À toda equipe técnica do **Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia da Amazônia**, especialmente à **Ingrid Reis da Silva**, por toda a ajuda prestada.*

*À **Coordenação de Central Analítica e de Produtos Naturais do Centro de Biotecnologia da Amazônia**, e a todos que de alguma forma tornaram possível a execução dos experimentos.*

*Ao Dr. **Maurício Morishi Ogusku** e à toda equipe do **Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, pelo auxílio em parte da realização deste trabalho.*

*Ao **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia**, o qual me deu esta oportunidade.*

*A todos os **professores do PPGBiotec**, por enriquecerem ainda mais meus conhecimentos.*

*À **CAPES** e à **FAPEAM** pelo financiamento da bolsa de estudos e do projeto, respectivamente.*

*Aos muitos **colegas queridos** que fiz durante o Mestrado, pessoas as quais muito estimo.*

*Ao meu namorado **Andrew Pacífico** pelo companheirismo e por todo o incentivo que sempre me deu.*

*A todos que ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.*

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

A tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* é uma das enfermidades mais letais do mundo, causando milhões de mortes todos os anos. Devido aos tratamentos inadequados e ao surgimento de cepas multirresistentes aos fármacos utilizados nos tratamentos, a busca por novos compostos antimicrobianos tem sido reportada com frequência na literatura científica. Fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais têm sido um alvo frequente de pesquisa e dentre as perspectivas, resultados promissores têm sido obtidos com a descoberta de compostos antimicrobianos sintetizados por micro-organismos endofíticos. Trabalhos anteriores demonstraram que um fungo endofítico da espécie *Aspergillus fumigatus* isolado de *Copaifera multijuga* Hayne (copaíba), produz compostos antimicrobianos, os quais são secretados para o substrato de crescimento. A utilização direta desse substrato (caldo de fermentação) em testes de antibiose *in vitro* contra *M. tuberculosis* permitiram detectar sua atividade antimicrobiana contra o patógeno, quando comparada ao controle negativo. Partindo desse resultado, foi objetivo do presente trabalho proceder à análise e purificação desses compostos, através do fracionamento do caldo de fermentação de *A. fumigatus* mutantes e não mutantes, visando à seleção de frações que apresentem maior capacidade de inibição contra *M. tuberculosis*. Induziu-se a mutação do isolado selvagem por meio da exposição da cultura fúngica à luz ultravioleta. O isolado selvagem e os mutantes derivados desse isolado foram testados quanto à antibiose contra o micro-organismo indicador, *Staphylococcus aureus*, tendo sido a atividade antimicrobiana avaliada por meio de comparações entre os testes de antibiose *in vitro* e os cromatogramas dos extratos fúngicos fracionados em n-butanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Após isso, extratos em n-butanol de isolados selvagens foram submetidos ao fracionamento químico por Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC) e as frações obtidas foram avaliadas contra *M. smegmatis*. Após este ensaio, as frações que apresentaram antagonismo foram selecionadas para o ensaio contra *M. tuberculosis*, além de serem analisadas em CLAE Analítica. Foram selecionadas 18 colônias mutantes e destas, oito apresentaram antagonismo contra *S. aureus*. A partir da análise dos cromatogramas dos isolados, correlacionou-se à atividade antimicrobiana um pico com menos de um minuto de retenção. No fracionamento químico, foram obtidas 30 frações e destas, apenas duas (F4 e F13) apresentaram atividade contra *M. smegmatis*. Das duas frações, apenas F4 apresentou antagonismo frente a *M. tuberculosis* com CIM de 256µg/mL. Os cromatogramas, tanto de F4 quanto de F13, apresentam picos no início da análise. O cromatograma de F4 mostra dois picos, com tempos de retenção de 2,1 e 2,4 minutos. Esses dados iniciais auxiliarão na otimização e futura purificação dos compostos.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium* spp., atividade antimicrobiana

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* is one of the most lethal diseases in the world, causing millions of deaths every year. Due to the inadequate treatment and the emergence of multidrug-resistant strains, the search for new antimicrobial compounds have been often reported in the scientific literature. Drugs developed from natural products have been a frequent research target and promising results have been obtained with the discovery of antimicrobial compounds synthesized by endophytic microorganisms. Previous work demonstrated that an endophytic *Aspergillus fumigatus* species, isolated from *Copaifera multijuga* Hayne (copaíba), produces antimicrobial compounds, which are released into the growth substrate. The direct use of this substrate (fermentation broth) in antibiosis assays against *M. tuberculosis* in vitro allowed detecting antimicrobial activity against the pathogen when compared to the negative control. So, the objective of this work was the analysis and purification of these compounds by the fractionation of *A. fumigatus* mutant and non-mutant fermentation broth, aiming the selection of fractions with higher capacity for inhibit *M. tuberculosis*. Mutants were obtained by the induction of the fungal culture to ultraviolet light exposition. The wild and mutant derivatives isolates were tested for antibiosis against the indicator organism, *Staphylococcus aureus* and the antimicrobial activity has been evaluated by comparing in vitro antibiosis assays and fungal extracts on n-butanol by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). After, n-butanol extracts of wild isolates were subjected to fractionation by Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC), and the fractions were evaluated against *M. smegmatis*. After this test, the fractions that showed antagonistic activity were selected for testing against *M. tuberculosis*, and analyzed in analytical HPLC. Among 18 mutants selected, eight showed antagonism against *S. aureus*. A peak with less than a minute of retention was correlated with the antimicrobial activity. On the fractionation, 30 fractions were obtained and among these, only two (F4 and F13) showed activity against *M. smegmatis* and only F4 showed antagonism against *M. tuberculosis* with an MIC of 256µg/mL. The chromatograms of both F4 and F13 showed peaks at the beginning of the analysis. The F4 chromatogram showed two peaks with retention times of 2.1 and 2.4 minutes. These data will be useful in future optimization and purification of compounds.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium* spp., antimicrobial activity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Em (A), micrografia eletrônica de varredura de <i>M. tuberculosis</i> . Fonte: <a href="http://medicineworld.org">http://medicineworld.org</a> . Em (B), <i>M. tuberculosis</i> corados (em vermelho) pela técnica de Kinyoun, em amostra de escarro. Fonte: Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Luciana B. M. Fujimoto .....	17
<b>Figura 02.</b> Fluxo de procedimentos .....	25
<b>Figura 03.</b> Procedimento sequencial para o preparo do inóculo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , utilizado no teste de antibiose frente às frações de <i>Aspergillus fumigatus</i> , obtidas por Cromatografia Líquida de Média Pressão .....	29
<b>Figura 04.</b> Representação da microplaca para o ensaio de Alamar Blue, visando a detecção da ação inibitória de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por extratos de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	30
<b>Figura 05.</b> Placas de teste de antibiose dos extratos brutos de <i>Aspergillus fumigatus</i> mutantes e não mutantes contra <i>Staphylococcus aureus</i> . Legenda: (CP <sub>x</sub> = controles positivos representando os isolados não mutantes), (M <sub>xx</sub> = isolados mutantes derivados de CP) .....	33
<b>Figura 06.</b> Cromatogramas do extrato em n-butanol do isolado não mutante CP1 obtidos a partir da leitura em A <sub>256</sub> (cromatograma superior) e A <sub>219</sub> (cromatograma inferior) .....	34
<b>Figura 07.</b> Cromatogramas do extrato em n-butanol do isolado mutante M3 obtidos a partir da leitura em A <sub>256</sub> (cromatograma superior) e A <sub>219</sub> (cromatograma inferior) .....	35
<b>Figura 08.</b> Cromatogramas do extrato em n-butanol do isolado mutante M1 obtidos a partir da leitura em A <sub>256</sub> (cromatograma superior) e A <sub>219</sub> (cromatograma inferior) .....	35
<b>Figura 09.</b> Cromatoplasmas do extrato n-butanol de <i>Aspergillus fumigatus</i> (isolado CP1): A (A <sub>254</sub> ) e B (A <sub>366</sub> ); 1) metanol, 2) acetato de etila, 3) acetonitrila, 4) diclorometano, 5) hexano, 6) n- butanol, 7) tolueno, 8) hidróxido de amônio, 9) ácido acético e 10) etanol .....	36



<b>Figura 10.</b> Cromatoplasmas da fração n-butanol de <i>A. fumigatus</i> (isolado CP1): <b>C e E (A<sub>254</sub>) e D e F (A<sub>366</sub>):</b> 1) diclorometano – etanol 8:2; 2) hexano - acetato de etila 8:2; 3) tolueno – etanol 8:2; 4) tolueno - etanol 8:2 + 4 gotas de ácido acético; 5) hexano – acetato de etila-metanol 8:1:1; 6) acetato de etila – metanol 8:2 .....	37
<b>Figura 11.</b> Perfis das amostras obtidas em SPE – fase normal, solubilizadas em metanol, sendo A1 e A4 as amostras brutas, A2 e A5 frações em hexano, A3 e A6 frações em acetato de etila. Em verde, luz UV a 254nm. Em preto, luz UV a 366nm, luz branca .....	37
<b>Figura 12.</b> Teste de antibiose das frações de <i>Aspergillus fumigatus</i> contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> . As setas indicam as frações 4 (placa à esquerda) e 13 (placa à direita), com resultado positivo para inibição de <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Cromatograma obtido da fração F4 em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em leitura a A <sub>254</sub> .....	39
<b>Figura 14.</b> Cromatograma obtido de F13 em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em leitura a A <sub>254</sub> .....	40
<b>Figura 15.</b> Atividade antimicrobiana das frações F4 e F13, em triplicata, de <i>Aspergillus fumigatus</i> contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pela técnica do Alamar blue.....	41

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
2.1 Fungos Endofíticos Associados à Atividade Antimicrobiana .....	12
2.2 Importância Biotecnológica de Fungos do Gênero <i>Aspergillus</i> .....	13
2.3 Características Gerais de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
2.4 Gênero <i>Mycobacterium</i> .....	16
2.4.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e a tuberculose (TB) .....	17
2.5 Métodos de Purificação de Biomoléculas .....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	23
3.1 Objetivo Geral .....	23
3.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 Material Biológico .....	24
4.1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> : isolado selvagem e mutantes derivados .....	24
4.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> : micro-organismo indicador .....	24
4.1.3 Cepas de <i>Mycobacterium</i> spp. ....	24
4.2 Fluxo de Procedimentos .....	25
4.3 Indução de Mutação em <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	25
4.4 Obtenção e Fracionamento do Caldo de Fermentação de <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> .....	26
4.5 Bioensaios de Antibiose de <i>Aspergillus fumigatus</i> contra <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> .....	26
4.6 Análises Cromatográficas .....	27
4.6.1 Cromatografia em camada delgada .....	27
4.6.2 Cromatografia líquida de média pressão (FLASH) .....	28
4.7 Bioensaios de Antibiose de <i>Aspergillus fumigatus</i> contra <i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i> .....	28
4.8 Bioensaios de Antibiose de <i>Aspergillus fumigatus</i> contra <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> .....	29

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
5.1 Obtenção de Mutantes de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	32
5.2 Bioensaios de antibiose de <i>Aspergillus fumigatus</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
5.3 Fracionamento em Cromatografia Líquida Analítica .....	33
5.4 Análise da fração por Cromatografia em Camada Delgada – CCD .....	36
5.5 Fracionamento em Cromatografia FLASH .....	38
5.6 Atividade antimicrobiana de frações contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	38
5.7 Avaliação das Frações em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica .....	39
5.8 Bioensaio de antagonismo micobacteriano .....	40
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

*Mycobacterium tuberculosis* é o agente causal da tuberculose (TB), uma das doenças contagiosas mais incidentes e letais no mundo, principalmente em se tratando dos países em desenvolvimento (GRUTZMACHER et al., 2012). A sua letalidade se deve principalmente ao surgimento de cepas multirresistentes aliado aos tratamentos inadequados, o que torna a doença uma das principais preocupações da Organização Mundial de Saúde (OMS) (PETRINI e HOFFNER, 1999). Dado o exposto, há um grande interesse pela busca de novos fármacos, com a esperança de se encontrar drogas mais eficazes no tratamento da TB.

Micro-organismos endofíticos têm sido reportados como promissores quando considerada a produção de novos compostos antimicrobianos, visto que podem secretá-los quando cultivados em laboratório (ISAKA et al., 2001; OLIVEIRA, 2008; PRINCE, 2008). Carvalho (2005, 2010) isolou 45 fungos endofíticos associados à copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), e desses, nove apresentaram atividade contra *M. tuberculosis* e foram identificados. Ainda, dentre as frações que apresentaram atividade antimicobacteriana, uma fração do fungo *Aspergillus fumigatus* se destacou por ter apresentado reduzida Concentração Inibitória Mínima (CIM), além de baixa citotoxicidade. Conseqüentemente, esse isolado se tornou o melhor candidato para a continuidade dos estudos relacionados à atividade antimicobacteriana.

A produção de compostos antimicrobianos por micro-organismos, na maioria das vezes, é bastante sutil, dificultando a purificação dessas moléculas. Uma das alternativas utilizadas na tentativa de incrementar essa produção é a aplicação de métodos de melhoramento das cepas, visando obter variantes genéticas que agreguem qualidades de segurança biológica, alta eficiência, qualidade e produção superiores às amostras originais. Dentre os métodos de melhoramento passíveis de serem empregados, podem-se citar os agentes indutores de mutações, tais como a luz ultravioleta (AZEVEDO, 1998).

Pelo exposto, esse estudo teve como proposta obter mutantes a partir de um isolado de *A. fumigatus* promissor para a produção de compostos antimicobacterianos (CARVALHO 2005, 2010). Esses mutantes foram comparados com o isolado selvagem em relação à característica de interesse, tendo sido o processo acompanhado por técnicas de detecção de antibiose em placa e cromatografia. Por meio do fracionamento químico dos caldos de fermentação do isolado selvagem de *A. fumigatus*, selecionou-se frações com atividade antimicobacteriana e procedeu-se à análise de seus perfis cromatográficos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fungos Endofíticos Associados à Atividade Antimicrobiana

Micro-organismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, aparentemente sem causar nenhum dano ao hospedeiro (AZEVEDO, 1998). Dentre os endófitos, os fungos constituem-se em uma fonte valiosa de produtos bioativos (AZEVEDO, 1998; HOFFMAN et al., 2007).

Inúmeros medicamentos comercializados e utilizados atualmente na prática clínica são derivados de metabólitos secundários produzidos por fungos ou por processos fermentativos associados a eles (FERRARA, 2006) e nesse contexto, estima-se que aproximadamente 25% dos produtos naturais biologicamente ativos conhecidos foram obtidos a partir de fungos (KONGSAEREE et al., 2003). Além da elevada capacidade metabólica, os fungos apresentam vantagens sobre outras fontes naturais, uma vez que constituem-se em recursos renováveis e a produção em larga escala dos metabólitos bioativos pode ser obtida em meios de cultura utilizando tecnologia existente e já conhecida (CAFÊU, 2007).

Fungos endofíticos apresentam uma complexa interação com seus hospedeiros vegetais e podem, a princípio, produzir uma vasta gama de moléculas bioativas, inclusive, aquelas sintetizadas primariamente pelos hospedeiros aos quais estão associados (FERRARA, 2006). Essa observação pode estar relacionada a eventos de recombinação genética ocorrida entre o endófito e a planta hospedeira, ao longo de anos de evolução (TAN e ZOU, 2006).

Acredita-se que fungos endofíticos isolados de plantas popularmente conhecidas como detentoras de qualidades terapêuticas e medicinais, são, por si só, e quando cultivados de maneira apropriada, uma importante fonte de produtos antimicrobianos. No entanto, apesar de muitas espécies de endófitos serem frequentemente isoladas de uma única planta hospedeira, somente alguns isolados serão capazes de produzir índices desejáveis de moléculas com alguma atividade biológica (STROBEL, 2003).

Produtos naturais e/ou seus derivados semi-sintéticos podem constituir em novos fármacos antimicobacterianos, os quais podem apresentar qualidades desejáveis para a terapêutica da TB (PAVAN et al., 2009). Fungos endofíticos do gênero *Phomopsis*, por exemplo, constituem uma importante fonte de metabólitos secundários com atividade antimicobacteriana (ISAKA et al., 2001; CHOMCHEON et al., 2005; PRINCE et al., 2012).

Lima et al. (2011) isolaram 315 fungos endofíticos de *Piper aduncum* L. e desses, 15 inibiram consideravelmente o crescimento de *M. tuberculosis*. Extratos de fungos endofíticos

isolados de plantas medicinais na Tailândia também foram reportados como detentores de forte atividade anti-micobacteriana *in vitro* (WIYAKRUTTA et al., 2004).

Além da detecção de isolados potencialmente produtores de compostos antimicrobianos, a oportunidade de isolamento e purificação de compostos ou moléculas de interesse a partir desses isolados é altamente desejável no meio científico. Dentre esses relatos, pode-se citar Prince (2008), o qual obteve o ácido pirenochaético A, a partir do extrato bruto de um fungo endofítico isolado de *Michelia champaca* (atualmente *Magnolia champaca*), uma árvore ornamental cultivada na Ásia. Essa substância, além da baixa citotoxicidade, apresentou excelente atividade anti-micobacteriana (CIM de 3,9µg/mL), apenas inferior à isoniazida (CIM de 0,03µg/mL). Outros quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico da TB apresentam CIM para *M. tuberculosis* equivalente ou superior ao ácido pirenochaético A: etambutol (CIM de 1 a 5µg/mL), pirazinamida (CIM de 6,25 a 50µg/mL) e a estreptomina (CIM de 4 a 8µg/mL) (ARBEX et al., 2010).

Na Amazônia, Carvalho (2005) e Oliveira (2008) isolaram fungos de *C. multijuga* Hayne e *Caesalpineia ferrea*, respectivamente, obtendo cerca de 20% de isolados com atividade antimicobacteriana, dentre a totalidade de isolados. Assim, acredita-se que produtos naturais, especialmente aqueles obtidos de fungos, oferecem uma diversidade química ampla e passível de ser explorada para o tratamento de doenças de alta expressividade, incluindo a TB (SOUZA, 2005).

## **2.2 Importância Biotecnológica de Fungos do Gênero *Aspergillus***

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 260 espécies (SAMSON e VARGA, 2009) amplamente encontradas na natureza. Existem relatos de seu isolamento a partir de plantas, do solo, do ar, da água e de material em decomposição (SLIVINSKI, 2007).

De modo geral, fungos do gênero *Aspergillus* produzem uma grande variedade de produtos naturais bioativos para aplicações diversas, tais como na área da saúde, na agricultura e na indústria. Dentre esses compostos, podem-se destacar as enzimas, obtidas a partir de processos biotecnológicos (SCHUSTER et al., 2002), tal como ocorre para a espécie *A. niger*, utilizada para a produção de ácido cítrico e ácido glucônico, dentre outras aplicações na área da indústria alimentícia (NIELSEN et al., 2009), além da atividade antimicrobiana (HASEGAWA et al., 2007).

Wang et al. (2002) isolaram de *A. clavatus* o composto brefeldina A, com propriedades antivirais, antifúngicas e citotóxicas contra várias linhagens de células tumorais. Os compostos nigerasperona A e naftoquinonamina, com propriedades antifúngicas contra

*Candida albicans*, foram isolados de *A. flavus* e *A. ustus*, respectivamente (ZHANG et al., 2007). Já *A. oryzae* foi relatado como produtor de orizina C, que apresenta efeito inibitório sobre o desenvolvimento de *Escherichia coli* (QIAO et al., 2010). *Aspergillus* spp. também foram relatados como produtores de compostos antioxidantes (LI et al., 2004a). Dadas as informações relatadas na literatura, observa-se que *Aspergillus* constitui um gênero ubíquo, cujas propriedades podem e devem ser estudadas, visando a obtenção e purificação de compostos de interesse biotecnológico.

Na classificação de Samson et al. (2011), a espécie *A. fumigatus* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Eurotiomycetes, Subclasse Eurotiomycetidae, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. Pertencem a essa espécie fungos amplamente distribuídos na natureza, tendo um papel essencial na reciclagem de carbono e nitrogênio. Ainda, é um reconhecido patógeno humano e oportunista, com prevalência em indivíduos imunocomprometidos (LATGÉ, 2001), além de se apresentar como patógeno de animais (mamíferos, pássaros e insetos), nos quais o alvo mais expressivo é o sistema respiratório (STEVENS, 2001). Também são relatados *A. fumigatus* isolados como endófitos, os quais apresentam, nesses casos, ampla produção de conídios (REMENTERIA et al., 2005) e variabilidade intra-específica elevada (DEBEAUPUIS et al., 1997). Seus conídios são relativamente pequenos (2 a 3µm) e encontram-se dispersos no ar em concentrações que variam de 1 a 100 conídios/m<sup>3</sup> (LATGÉ, 2001).

Liu et al. (2004) detectaram a presença de compostos inibidores de *C. albicans* do tipo fumigaclavina C, asperfumóide, fumitremorgina C e physcion em *A. fumigatus* endofítico isolado de *Cynodon dactylon*. Fumifungin e sinerazol, novos compostos antifúngicos, foram isolados a partir do caldo de fermentação de *A. fumigatus* isolado de uma amostra de solo do Himalaia (MUKHOPADHYAY et al., 1987) e da Tailândia (ANDO et al., 1991), respectivamente. Além desses compostos, é ainda relatada a produção de dicetopiperazinas e inibidores do ciclo celular por *A. fumigatus* (CUI et al., 1995; FURTADO et al., 2005).

Carvalho (2005, 2010) realizou a seleção de fungos endofíticos de *C. multijuga* Hayne, com atividade inibitória contra *M. tuberculosis*, seguida da extração de metabólitos secundários e seu fracionamento. Dentre as análises realizadas, uma fração de *A. fumigatus* se mostrou a mais promissora por apresentar CIM menor, baixa citotoxicidade e considerável atividade contra *M. tuberculosis*.

### 2.3 Características Gerais de *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* spp. pertencem à família Staphylococcaceae e caracterizam-se por compreender bactérias gram-positivas, cujas células podem ser encontradas isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. Medem em torno de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, reduzem nitrato a nitrito e são fermentadores de glicose com produção de ácidos, tanto em condições de aerobiose quanto de anaerobiose (TRABULSI et al., 2005). São bactérias ubíquas, não esporulantes, resistentes, apresentam crescimento otimizado a 37°C e produzem pigmentos de coloração amarela (HOLT et al., 1994).

Nesse grupo, *S. aureus* destaca-se pela sua importância clínica. Trata-se de um integrante comum da flora bacteriana, podendo se apresentar como um colonizador inofensivo ou como um agente patogênico ativo, dependendo da cepa e das condições ambientais às quais estará exposta. Acredita-se que cerca de 30 a 50% dos indivíduos adultos saudáveis são colonizados por este patógeno (PEACOCK, 2001), na forma assintomática.

*S. aureus* tem como seu principal reservatório o homem, onde pode ser encontrado nas fossas nasais de 20 a 40% dos adultos. É comum que os micro-organismos encontrados no trato respiratório possam se propagar direta ou indiretamente para feridas da pele (RICARDO, 2004), causando quadros sintomáticos. Dentre os casos sintomáticos, *S. aureus* pode causar infecções na pele, em tecidos moles, nos ossos, nas articulações, nos implantes, estando presentes também em quadros como pneumonia, septicemia e síndrome do choque tóxico (MONECKE et al., 2011). O processo infeccioso pode variar de infecções cutâneas crônicas relativamente benignas até infecções sistêmicas potencialmente fatais (FOSTER, 2005).

Conhecida como a principal causa de infecções hospitalares na América Latina (GUZMÁN-BLANCO et al., 2009) e a segunda infecção mais comum em pacientes ambulatoriais, *S. aureus* é a espécie mais virulenta do gênero *Staphylococcus* (O'CALLAGHAN et al., 2007). Produz polissacarídeos, peptidoglicanos, ácido teicóico, proteases, adesinas, exoenzimas e toxinas que contribuem para a sua virulência (CUNNINGHAM et al., 1996; O'RIORDAN e LEE, 2004), além de produzir biofilme (HAMMER et al., 2005).

Indivíduos que apresentam colonização por *S. aureus* em quadro assintomático são mais propensos a desenvolver infecções posteriores, tendo como agravantes aqueles acometidos por diabetes tipo 1, usuários de drogas injetáveis, pacientes dependentes de hemodiálise, pós-cirúrgicos, HIV positivos e imunossuprimidos (LOWY, 1998).



Um aspecto importante da virulência de *S. aureus* reside na existência de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos, especialmente à meticilina (STEFANI e GOGLIO, 2010). Tais cepas são frequentemente multidroga-resistentes (MDR) e estão associadas ao aumento das taxas de morbidade, mortalidade e custos de tratamento (McKINNON et al., 2011).

A maioria das infecções hospitalares é adquirida através da exposição de pacientes susceptíveis a cepas de estafilococos, através de contato direto com indivíduos que apresentem bactérias de seu próprio reservatório (LOWY, 1998). *S. aureus* está ainda associado às doenças transmitidas através da ingestão de alimentos contaminados com suas enterotoxinas (KIKUCHI et al., 2003).

#### **2.4 Gênero *Mycobacterium***

O gênero *Mycobacterium*, único da família Mycobacteriaceae, da ordem Actinomycetales, é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e as demais, denominadas de micobactérias não-tuberculosas (FERREIRA e SOUZA, 2000).

As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (DORRONSORO e TORROBA, 2007), aeróbicos, não produzem esporos e podem apresentar ainda, resistência a compostos antimicrobianos e patogenicidade. Dentre essas características, a álcool-ácido resistência, a resistência aos antimicrobianos e a patogenicidade estão associadas à parede celular, cuja camada externa contém grande quantidade de ácido micólico, formando uma camada resistente à água, mas permeável aos nutrientes que entram lentamente na célula bacteriana, contribuindo para a taxa vagarosa de crescimento dessas células (TORTORA, 2006).

O gênero *Mycobacterium* inclui patógenos importantes para humanos e animais, tais como *M. tuberculosis*, agente etiológico da TB e *M. leprae*, agente causador da lepra ou hanseníase (TORTORA, 2006). Vale salientar que o complexo *M. tuberculosis* inclui ainda, as espécies *M. africanum*, *M. bovis*, *M. cannetti*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedi*, também consideradas patogênicas (COROS et al., 2008).

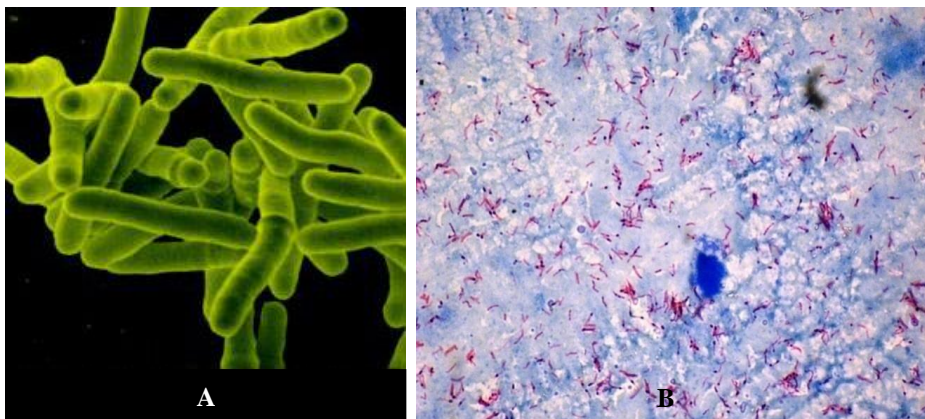
Outras espécies de micobactérias são encontradas na natureza (principalmente no solo ou na água), constituindo-se em espécies patogênicas facultativas (TORTORA, 2006). *M. smegmatis*, por exemplo, é uma micobactéria encontrada no ambiente, de característica normalmente não patogênica e de crescimento rápido (NEWTON et al., 1993), estando associada a lesões dos tecidos moles após trauma ou cirurgia e provavelmente, a casos de carcinogênese peniana (COLD e TAYLOR, 1999).

Características próprias de *M. smegmatis*, tais como o crescimento rápido, a facilidade de cultivo em meios de cultura, a não patogenicidade e a estrutura da parede celular semelhante às demais micobactérias (LI et al., 2004b), transformam essa espécie em um organismo modelo ideal para investigações de forma inócua e segura (SINGH e REYRAT, 2009).

Muitas micobactérias menos estudadas são usualmente saprófitas, embora algumas espécies possam apresentar caráter oportunista e até mesmo letal (JORDAN et al., 2007). Essas, conhecidas como micobactérias não-tuberculosas (MNT), têm emergido como microorganismos importantes associados a infecções respiratórias e a outras doenças oportunistas. Entre as diferentes MNT, o complexo *M. chelonae-abscessus* representa um grupo que consiste em três espécies proximamente relacionadas: *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. immunogenum* que, com frequência, estão associadas à contaminação hospitalar e das tubulações do sistema hídrico (WILSON et al., 2001).

#### 2.4.1 *Mycobacterium tuberculosis* e a tuberculose (TB)

*M. tuberculosis* (Figura 01) é o agente causal da TB, uma das enfermidades infecto-contagiosas mais letais e antigas da humanidade, com ampla distribuição no mundo, ocasionando a morte de cerca de 2 milhões de pessoas a cada ano (SMITH, 2003; BERESFORD et al., 2007), devido a complicações pulmonares (CTAT, 2000) e extrapulmonares (BRASIL, 2002).



**Figura 01** – *Mycobacterium tuberculosis*. Em (A), micrografia eletrônica de varredura de *M. tuberculosis*. Em (B), *M. tuberculosis* corados (em vermelho) pela técnica de Kinyoun, em amostra de escarro.

Fonte: <http://medicineworld.org> (A) e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto (B)

*M. tuberculosis* foi descrito em 1882 pelo bacteriologista alemão Robert Koch, sendo também conhecido, em sua homenagem, como bacilo de Koch (CAMPOS, 2006). É uma micobactéria aeróbia não esporulante que reside principalmente nos fagolisossomos dos macrófagos alveolares.

As micobactérias têm a forma de bacilo, medindo cerca de 1 a 5µm de comprimento por 0,45µm de largura. Apresenta uma parede celular com grande proporção de lipídios e ácido micólico, os quais conferem um caráter hidrofóbico à mesma, que constitui em uma barreira efetiva para muitos dos agentes antimicrobianos convencionais (BRENNAN, 1989; DRAPER, 1998; KONEMAN et al., 2001). *M. tuberculosis* apresenta ainda, multiplicação lenta e alta proporção de cepas resistentes (MITCHISON e NUNN, 1986; MITCHISON, 2004).

Embora o genoma completo de *M. tuberculosis* tenha sido mapeado, falhou-se no controle da epidemia (FARGA e CAMINERO, 2011). O sudeste asiático e o Pacífico ocidental apresentaram, juntas, 58% dos casos de TB em 2012, sendo que a Índia e a China apresentaram o maior número de casos. No mesmo período, a África apresentou cerca de 25% da totalidade de casos, além da taxa mais elevada de casos e óbitos em relação à população geral (média de 255 casos para cada 100 mil habitantes) (WHO, 2013).

Pelo fato de a TB ter raízes sociais intimamente associadas à distribuição de renda desigual, o grau de incidência da doença reflete o nível de desenvolvimento de um país (GRUTZMACHER et al., 2012). O Brasil ocupa o 16º lugar no ranking de países em número de casos de TB. Em 2013 foram registradas 71.123 novas infecções, com incidência de 35,4 pacientes para cada 100 mil habitantes. O Amazonas é o estado que registra a maior taxa do país: 70,6/100 mil habitantes, seguido pelos Estados do Rio de Janeiro (com 61,7/100 mil habitantes) e Mato Grosso (50,6/100 mil habitantes) (BRASIL, 2014).

Constituem-se em populações mais vulneráveis, as indígenas (3x mais), os presidiários (28x), os moradores de rua (44x), devido à dificuldade de acesso aos serviços de saúde e às condições específicas de vida (SINAN, 2013). Outro agravante é a susceptibilidade de indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), visto que a TB representa a maior causa de morte em pacientes portadores do vírus (DORMANS et al., 2004). A correlação AIDS-TB amplia a necessidade de novas opções de tratamento (MOREL, 2006), uma vez que a AIDS contribuiu para o aumento do percentual de habitantes com menor defesa imunológica e para o ressurgimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes a drogas (UJVARI, 2003).

Entre 12 a 15% dos casos notificados de TB estão associados à co-infecção pelo HIV, sendo a TB responsável por 32% do agravamento das condições de saúde desses pacientes. Esse percentual representa o triplo se comparado ao índice de qualquer outra causa patológica (SINGH, 2004). O surgimento de cepas multirresistentes de TB em pacientes soropositivos para o HIV e o declínio das condições socioeconômicas aumentam a dificuldade em controlar a doença (LECHNER et al., 2008). Em um panorama geral, em 2012, foram registradas 4,4 mil mortes devido a complicações associadas à TB, representando uma taxa de 2,3 mortes para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2014).

Uma série de fatores contribui para a disseminação da TB, dentre os quais se destacam: i) uso incorreto e/ou inadequado da terapêutica; ii) abandono do tratamento pelos pacientes acometidos, tão logo seja observada uma melhora no quadro; iii) alta capacidade infectante do bacilo; iv) elevados índices de viagens migratórias; e v) ocorrência de grandes aglomerados populacionais (PETRINI e HOFFNER, 1999), principalmente nos grandes centros urbanos.

Melhorias e avanços nas instalações de unidades de saúde ofereceram a perspectiva da erradicação da TB até o final do século XX, mas a doença ressurgiu devido à resistência global contra drogas anti-TB (NAZIR et al., 2010).

A resistência a multidrogas (MDR) contra TB preocupa as autoridades de saúde em todo o mundo. *M. tuberculosis* multirresistente apresenta resistência a pelo menos duas das drogas mais eficazes utilizadas no tratamento: a isoniazida e a rifampicina. Esses medicamentos de primeira linha são utilizados em pacientes que apresentem TB sensível a esses medicamentos (PORTELA et al., 2012). Segundo Dalcolmo et al. (2007), atesta-se um novo caso de MDR quando se apresenta um diagnóstico confirmado por cultura, identificação e teste de sensibilidade de *M. tuberculosis*, o qual deve apresentar resistência à rifampicina, isoniazida e a mais um terceiro fármaco utilizado na terapêutica da TB. Em um quadro mais grave, cita-se a TB extremamente resistente (XDR), na qual a resistência aos medicamentos de primeira e segunda linha são muito pronunciados (CDC, 2010) e os pacientes não respondem satisfatoriamente aos tratamentos de escolha.

Segundo Mitchison (2005) os tipos de resistência de *M. tuberculosis* podem ser resumidos em: i) **Natural**, com surgimento decorrente de mutação espontânea, independentemente de exposição prévia a fármacos. É diretamente proporcional ao número de bacilos; ii) **Inicial**, com o paciente se apresentando para tratamento, exibindo resistência a um ou mais fármacos. Não se conhece o histórico de tratamentos anteriores; iii) **Primária**, com pacientes não tratados previamente, infectados por uma fonte doente com forma resistente; e

iv) **Adquirida ou secundária**, com quadro de reincidência, resultante de uso prévio de medicação de forma inadequada.

A monoterapia, ou seja, a utilização de apenas um fármaco no tratamento, induz a seleção de populações micobacterianas resistentes, sendo necessária a utilização de uma terapia combinada de dois ou mais fármacos, devido à reduzida possibilidade de que as micobactérias desenvolvam resistência a dois ou mais fármacos simultaneamente (DUCATI et al., 2006).

No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia e Ministério da Saúde (SBPT, 2009), o tratamento da TB consiste em uma associação de quimioterápicos com dois esquemas padronizados: i) **Esquema básico**, indicado para casos novos de TB pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite), com pacientes infectados ou não pelo HIV. São utilizados a rifampicina, a isoniazida, a pirazinamida e o etambutol nos dois primeiros meses. O tratamento é continuado por mais quatro meses, utilizando a rifampicina e a isoniazida; e ii) **Esquema para multirresistência**, indicado para pacientes com resistência à rifampicina e isoniazida, além de outro(s) fármaco(s) de primeira linha. Indicado também para casos de falência ao esquema básico ou para a impossibilidade do uso do esquema básico por intolerância a dois ou mais fármacos. São utilizados, nos dois primeiros meses, estreptomicina por cinco dias na semana, além do etambutol, da levofloxacina, da pirazinamida e da terizidona. Em seguida, o tratamento prossegue com mais quatro meses de estreptomicina por três dias na semana, além do etambutol, da levofloxacina, da pirazinamida e da terizidona. Após a segunda etapa, mantém-se o paciente em tratamento por mais doze meses com etambutol, levofloxacina e terizidona.

Mesmo com o emprego de associações de diferentes agentes tuberculostáticos, o que se verifica é que o tratamento da TB tem se tornado menos eficaz em função do aumento do índice de bacilos multirresistentes em todo o mundo (SINGH, 2004).

Algumas classes de antimicrobianos sintéticos têm sido importante objeto de estudo, como as fluorquinolonas e oxazolidinonas (SOUZA e VASCONCELOS, 2005). Porém, devido à importância do desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais, muita atenção está sendo dada para a descoberta de novas moléculas (SOUZA, 2005).

## 2.5 Métodos de Purificação de Biomoléculas

O crescente interesse por processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos que detenham alto grau de pureza. Dentre as técnicas utilizadas para esse fim, destaca-se a cromatografia e

suas vertentes (ZUÑIGA, 2003), que constituem métodos físico-químicos baseados na migração diferencial e na separação dos componentes de uma mistura. Essa migração e separação ocorre como consequência de diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. A grande possibilidade de combinações entre essas fases torna a técnica extremamente versátil (DEGANI et al., 1998) e eficiente.

Os critérios utilizados para análise cromatográfica variam de acordo com o objetivo de cada trabalho, sendo os mais comuns: i) Mecanismo de separação; ii) Tipo de fase móvel utilizada; e iii) Técnica empregada (LANÇAS e McNAIR, 1983).

De uma maneira geral, as técnicas cromatográficas podem ser divididas em cromatografia planar e em coluna.

Na cromatografia planar, destacam-se a cromatografia em papel (CP) e a cromatografia em camada delgada (CCD), técnicas de aplicação mais simples e econômica. A CP caracteriza-se por uma técnica de partição líquido-líquido, estando um deles fixado a um suporte sólido (papel) e baseia-se na diferença de solubilidade das substâncias entre duas fases imiscíveis (COLLINS et al., 2006), sendo muito útil para a separação de compostos polares (PERES, 2002). A CCD caracteriza-se pela separação de substâncias por meio das suas diferentes velocidades de migração em razão da afinidade relativa com solventes. Nesse modelo, uma das fases é sólida (XAVIER et al., 2007).

A cromatografia em coluna pode ser classificada de acordo com a fase móvel, podendo esta ser gasosa ou líquida. A cromatografia gasosa apresenta duas variantes: a cromatografia gasosa (CG) propriamente dita e a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). Na cromatografia líquida, destacam-se a cromatografia líquida clássica (CLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

No caso de fases móveis gasosas, as separações podem ser obtidas por CG e CGAR. A diferença entre os dois tipos está na coluna. Enquanto na CGAR são utilizadas colunas capilares, onde a fase estacionária é um filme depositado nas mesmas, a CG utiliza colunas de maior diâmetro empacotadas com a fase estacionária (DEGANI et al., 1998). A grande limitação da cromatografia gasosa é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável (PERES, 2002).

Muitos pesquisadores têm publicado trabalhos que descrevem a detecção de antibióticos por técnicas cromatográficas (FELTRIN et al., 2007), porém, a baixa solubilidade de alguns antibióticos em solventes orgânicos dificulta seu fracionamento e/ou extração por CG ou CGAR, assim como são características indesejáveis, a instabilidade térmica e a reduzida volatilidade dessas moléculas. Dessa forma, visando transpor essas dificuldades,

várias técnicas de detecção de antibióticos foram desenvolvidas utilizando a cromatografia líquida, em especial a CLAE (KENNEDY et al., 1998).

Na CLC, a fase móvel é arrastada através da coluna sob influência da gravidade e na CLAE, ferramenta útil para a separação de íons e macromoléculas, são utilizadas fases estacionárias de partículas menores e uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel (COLLINS et al., 2006).

Além das técnicas descritas, pode-se citar a Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC), que consiste em um método de separação preparativo utilizado para isolamento de produtos naturais (HOSTETTMANN et al., 1997), visando fracionar o maior número possível de compostos de interesse, mantendo o mais elevado nível de pureza (SNYDER et al., 1997).

Utilizando-se da versatilidade e aplicabilidade das técnicas cromatográficas, esse trabalho teve por proposta a análise de frações do caldo de fermentação de *A. fumigatus* isolado de *C. multijuga* através de cromatografia líquida, tendo como alvo a atividade antimicrobiana de compostos presentes no mesmo, como forma de continuidade do trabalho desenvolvido por Carvalho (2005, 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Fracionar o caldo de fermentação de *Aspergillus fumigatus* visando à obtenção de frações, o mais purificadas possível, que detenham a capacidade de inibir *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana da cepa CBA 2743 de *A. fumigatus* (isolado selvagem e mutantes derivados) sobre o micro-organismo indicador *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- Correlacionar os picos de retenção dos isolados com a sua atividade antimicrobiana, por meio da CLAE analítica;
- Obter perfis cromatográficos do extrato em n-butanol de *A. fumigatus* por Cromatografia em Camada Delgada - CCD utilizando diferentes solventes.
- Fracionar os extratos em n-butanol de *A. fumigatus* através da MPLC;
- Avaliar a atividade antimicobacteriana das frações obtidas contra *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*.
- Obter os perfis cromatográficos das frações com atividade antimicobacteriana por meio da CLAE.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

#### 4.1.1 *Aspergillus fumigatus*: Isolado selvagem e mutantes derivados

O fungo *A. fumigatus* CBA 2743 utilizado no estudo foi isolado como endófito de *C. multijuga* Hayne (copaíba), cultivada na Estação Experimental de Silvicultura Tropical do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Esse isolado foi também avaliado quanto à sua capacidade de inibir *M. tuberculosis* por Carvalho (2010), estando armazenado em óleo mineral, na Coleção de Culturas do CBA (Centro de Biotecnologia da Amazônia). Para reativação do isolado, o fungo foi cultivado em placa de Petri contendo Ágar Batata-Dextrose (BDA) por sete dias a 28 °C.

Além do isolado selvagem, foram obtidos mutantes derivados da linhagem CBA 2743, cujo método de obtenção está descrito no item 4.3.

#### 4.1.2 *Staphylococcus aureus*: micro-organismo indicador

A linhagem de *S. aureus* ATCC 25923 é mantida armazenada a 4°C em meio LB (Luria-Bertani: 1g/L triptona; 0,5g/L extrato de levedura; 1g/L NaCl; 15g/L ágar; água destilada q.s.p.) na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do CBA. Para reativação, a bactéria foi cultivada em caldo LB, a 37 °C por 24 horas. Após esse período, a cultura bacteriana foi diluída em solução salina 0,85%, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,05mL de BaCl<sub>2</sub> a 1% + 9,95mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%), equivalendo a 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFCs/mL).

#### 4.1.3 Cepas de *Mycobacterium* spp.

A cepa de *M. smegmatis* foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira, estando armazenada a 4°C na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas. Para a reativação, a micobactéria foi cultivada em caldo Triptona de Soja (TSB: 15g/L de triptona; 5g/L de digestão papaínica de soja; 5g/L de NaCl; água destilada q.s.p.) a 35 °C por 48 horas. Após esse período, a suspensão micobacteriana foi padronizada com a turbidez da escala n° 1 de McFarland.

A cepa de *M. tuberculosis* utilizada foi a cepa padrão H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294) armazenada no Laboratório de Micobacteriologia do INPA. Para a reativação, a micobactéria foi cultivada em caldo Lowenstein-Jensen (L-J: 2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,24g MgSO<sub>4</sub>; 0,6g

C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>MgO<sub>7</sub>; 3,6g asparagina; 12mL glicerol; 600mL água destilada; 1000mL homogeneizado de ovos; 20mL Verde de Malaquita a 2%) a 35 °C por 21 dias. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de aproximadamente 100 µL para padronização com a turbidez da escala n° 1 de McFarland.

A Figura 02 ilustra, resumida e sequencialmente, as etapas cumpridas no desenvolvimento do trabalho. As etapas foram desenvolvidas nos laboratórios de Microbiologia, Produtos Naturais e Química Analítica do CBA e no Laboratório de Micobacteriologia do INPA.

#### 4.2 Fluxo de procedimentos

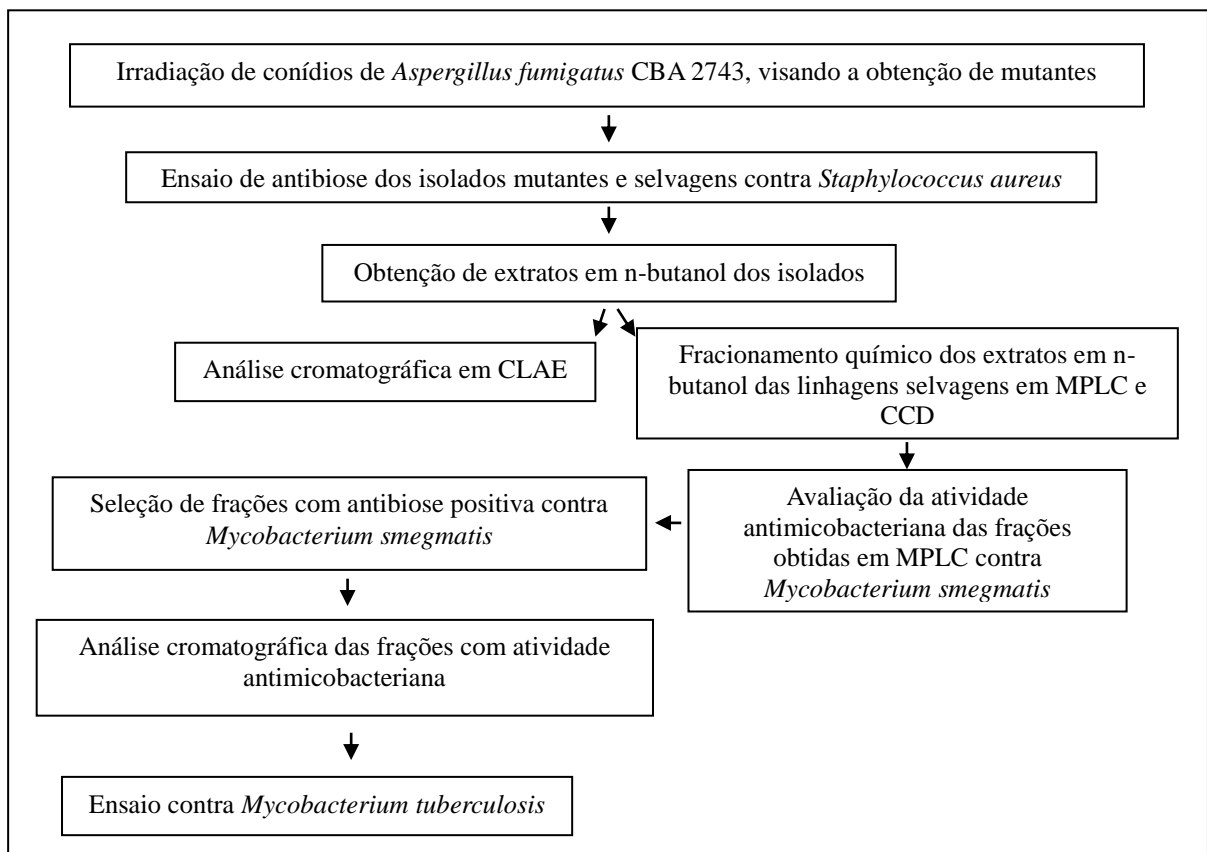


Figura 02 – Fluxo de procedimentos

#### 4.3 Indução de Mutação em *Aspergillus fumigatus*

*A. fumigatus* foi cultivado em placa de Petri contendo BDA (20g/L glicose; 15g/L ágar; infusão de batata 200g/L), por sete dias a 28°C. A seguir, foi realizada uma raspagem da superfície da colônia (visando os conídios), com o auxílio de uma alça de platina. O material

fúngico foi transferido para um microtubo contendo 1mL de solução salina (8,5g/L NaCl), o qual foi agitado em vortex, para desagregação dos conídios. Após esse procedimento, 50µL da suspensão de conídios foi semeada em 10 placas de Petri com o auxílio da alça de Drigalski, seguindo-se à irradiação com luz UV de 15W, a 21cm de distância das placas de Petri, por 10 e 20 minutos. Logo após a irradiação, as placas foram embaladas em papel alumínio e submetidas à incubação em estufa a 28°C. Após 72 horas, procedeu-se à comparação do número de colônias sobreviventes nas placas irradiadas, com duas placas de controle negativo (placas sem exposição à radiação UV). As colônias sobreviventes, referidas como mutantes, foram resgatadas e transferidas para placas de Petri contendo meio BDA.

#### **4.4 Obtenção e Fracionamento do Caldo de Fermentação de *A. fumigatus***

As colônias mutantes e não-mutantes de *A. fumigatus* foram cultivadas em placa de Petri com BDA, por sete dias a 28 °C. Após este período, um disco de micélio de 10mm de diâmetro foi inoculado em frasco erlenmeyer contendo 50mL de caldo BD e incubado por 28 dias a 28°C. Em seguida, por um processo simples de filtração, foi separada a massa micelial do caldo de fermentação, tendo sido esse último utilizado para o bioensaio de antagonismo pelo método de difusão em ágar.

Na etapa de cromatografia analítica, a mesma metodologia de cultivo submerso descrita foi utilizada, tendo sido o extrato bruto submetido à partição líquido-líquido para a obtenção do extrato em n-butanol.

Para a etapa preparativa, onde se utilizou somente a linhagem selvagem, um disco de micélio de 10mm de diâmetro foi inoculado em 10 frascos erlenmeyer contendo 500mL de caldo glicerol (2g/L KNO<sub>3</sub>; 0,3g/L caseína; 2g/L NaCl; 2g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1g/L MgSO<sub>4</sub>; 0,1g/L CaCO<sub>3</sub>; 0,01g/L FeSO<sub>4</sub>; 0,01g/L ZnSO<sub>4</sub>; 10mL de glicerol), visto que esse substrato otimizou a produção de metabólitos por *A. fumigatus* (dados não publicados). A incubação foi realizada durante 28 dias a 28°C.

Após o processo de filtração, o caldo de fermentação obtido foi submetido à partição líquido-líquido com o solvente n-butanol (1:1) até a exaustão, e em seguida, concentrado por evaporação para as etapas cromatográficas.

#### **4.5 Bioensaios de Antibiose de *Aspergillus fumigatus* contra *Staphylococcus aureus***

A cepa ATCC 25923 da bactéria indicadora *S. aureus* foi utilizada nos testes de antibiose com o caldo de fermentação de *A. fumigatus*. A bactéria foi cultivada previamente

em caldo LB por 24 horas. A cultura bacteriana foi diluída em solução salina 0,85%, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland.

O método utilizado para o teste de antibiose foi o de difusão em ágar, utilizando o meio LB. Primeiramente, foi vertido meio nas placas de Petri. Após a solidificação do meio de cultura, a suspensão de *S. aureus* em solução salina foi inoculada com swab estéril por toda a sua superfície. Em seguida, o meio foi perfurado em quatro poços de 6mm de diâmetro, os quais receberam aproximadamente 100µL do caldo de fermentação dos isolados mutantes e não-mutantes de *A. fumigatus*, sendo que os ensaios foram feitos em triplicata. O controle negativo compreendeu poços contendo caldo BD. As placas foram mantidas em geladeira a 4°C *overnight*, para promover a difusão dos compostos antimicrobianos contidos no extrato bruto para o meio de cultura. Após o período de difusão, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e em seguida, foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição.

#### **4.6 Análises Cromatográficas**

Os extratos dos isolados mutantes e não-mutantes obtidos em n-butanol foram avaliados primeiramente em CLAE, em escala analítica, associada a um detector de arranjo de diodos (SPD). As amostras foram dissolvidas em acetonitrila grau HPLC, filtradas em membrana de 0,22µm, diluídas em mistura de acetonitrila/água e, em seguida, 20µL de cada uma das soluções foram injetados em cromatógrafo líquido nas seguintes condições cromatográficas: coluna e pré-coluna Shim-pack CLC-ODS (diâmetro interno e comprimento - 4,6mm x 15cm; diâmetro de partícula - 5µm; diâmetro do poro - 100Å), mantidas a 40°C; gradiente de acetonitrila (ACN) e água, iniciando com ACN 5% e finalizando com ACN 100% em uma hora de análise e monitorado na faixa de comprimento de onda de 190 a 400nm. O extrato em n-butanol da linhagem selvagem foi submetido, posteriormente, em escala preparativa, à Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC).

##### **4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada**

Do extrato obtido em n-butanol e concentrado em rotaevaporador, foi retirada uma amostra de 70mg, a qual foi solubilizada em 5mL de metanol, resultando em uma solução alcoólica de 14mg/mL. Esta solução foi transferida para microtubos de 1,5mL e submetida à cromatografia em camada delgada de Alta Resolução - HPTLC, para definição do sistema de eluição, através de teste de seletividade em fase normal - Alugram Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>, utilizando diferentes solventes com diferentes polaridades: metanol, acetato de etila, acetonitrila, diclorometano, hexano, n-butanol, tolueno, hidróxido de amônio, ácido acético e

etanol. Adicionalmente, foram avaliadas derivações desses sistemas eluentes, em diferentes combinações e concentrações, com o objetivo de otimizar a separação dos componentes da amostra.

#### **4.6.2 Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC-FLASH)**

Para essa etapa, foi utilizado o sistema Isolera One (Biotage) que consiste em um novo sistema de purificação em *flash* (Cromatografia Líquida de Média Pressão-MPLC), mais compacto e com características que permitem que as substâncias sejam melhor separadas. O gradiente cria automaticamente níveis de eluição com diferentes cartuchos e tamanho de amostra.

Na coleta das frações, o extrato foi avaliado usando dois comprimentos de onda (200 e 366nm), taxas ajustáveis de fluxo de 20mL/min, e dois solventes (acetato de etila e metanol) em um gradiente para obtenção de frações com máxima pureza e rendimento. Para purificação da amostra, foi utilizado um cartucho de sílica de fase normal (SNAP 25g).

#### **4.7 Bioensaios de Antibiose de *Aspergillus fumigatus* contra *Mycobacterium smegmatis***

*M. smegmatis* foi reativado em TSB a 35°C por 48 horas para obtenção da suspensão de células, conforme descrito no item 4.1.3. O método utilizado para a avaliação da antibiose de frações do caldo de fermentação de *A. fumigatus* contra *M. smegmatis*, foi o método de difusão em disco, visto que permite a obtenção de bons resultados qualitativos, utilizando-se pequena quantidade de amostra. Este método é semelhante ao método de difusão em ágar, porém, no lugar de cavidades, discos de papel estéreis com 6mm de diâmetro foram embebidos com as frações evaporadas que foram ressuspensas em 200µL de etanol.

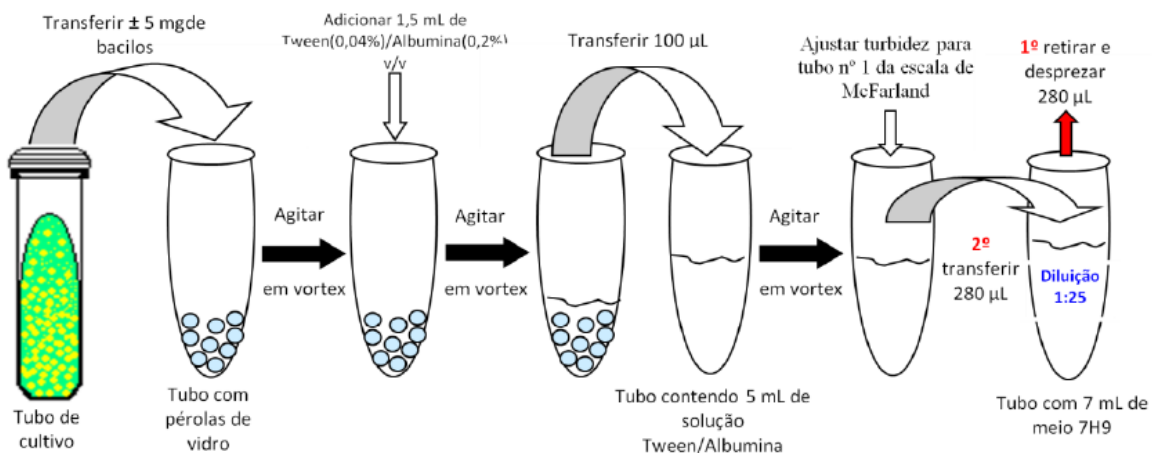
Os discos foram submetidos à secagem em cabine de fluxo laminar por 15 minutos. Durante a secagem, inoculou-se a suspensão de *M. smegmatis* por toda a superfície da placa com Ágar Triptona Soja (TSA) (15g/L de triptona, 5g/L de digestão papaínica de soja, 5g/L de NaCl, 15g/L de ágar, água destilada q.s.p.), com auxílio de swab estéril. Após a inoculação da bactéria, os discos impregnados com as frações de *A. fumigatus* foram cuidadosamente depositados sobre a superfície do meio de cultura. As placas foram transferidas para a geladeira (4°C), onde foram incubadas durante quatro horas, para permitir a difusão dos metabólitos no meio. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, para posterior observação e medida dos halos de inibição. Dois discos foram utilizados como controle negativo, embebidos em 200µL de etanol. Nesse experimento, as amostras de *A. fumigatus* foram aquelas obtidas do fracionamento em MPLC.

#### 4.8 Bioensaios de Antibiose de *Aspergillus fumigatus* contra *Mycobacterium tuberculosis*

No bioensaio, foi utilizada a cepa padrão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ATCC 27294), por se tratar de cepa sensível a todos os fármacos utilizados no tratamento da TB. O preparo do inóculo micobacteriano foi realizado após o pré-cultivo da cepa de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv em meio L-J a 35 °C por 21 dias, conforme descrito no item 4.1.3.

Transferiu-se aproximadamente 5mg de bacilos para um tubo contendo pérolas de vidro, agitando-se em vortex. Após a agitação, adicionou-se 1,5mL de solução tween 0,04%/albumina 0,2% (v/v) ao tubo e agitou-se novamente em vortex. Transferiu-se 100µL dessa suspensão para novo tubo contendo 5mL de solução tween/albumina, agitando-se em seguida, em vortex. Ajustou-se a turbidez da suspensão bacteriana para correspondência com o tubo n° 1 da escala de McFarland.

Em um tubo contendo 7mL de caldo Middlebrook 7H9 (0,5g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5g C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>; 0,1g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>; 0,001g piridoxina; 0,0005g biotina; 2,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,04g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>; 0,05g MgSO<sub>4</sub>; 0,0005g CaCl<sub>2</sub>; 0,001g ZnSO<sub>4</sub>; 0,001g CuSO<sub>4</sub>; 900µL água destilada), desprezou-se 280µL do volume do meio. Em seguida, foram transferidos 280µL da suspensão bacteriana a esse tubo contendo meio 7H9, resultando em uma suspensão bacteriana diluída em 25x (Figura 03).



**Figura 03** – Procedimento sequencial para o preparo do inóculo de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizado no teste de antibiose frente às frações de *Aspergillus fumigatus*, obtidas por Cromatografia Líquida de Média Pressão.

Para a verificação da atividade de antagonismo micobacteriano extracelular, foi utilizado Alamar Blue como revelador de óxido-redução, conforme técnica descrita por Fransblau et al. (1998). Para os extratos obtidos foi verificada a CIM num espectro decrescente de 512 a 4µg/mL, sendo as frações avaliadas em triplicata.

As frações com atividade antimicobacteriana confirmada contra *M. smegmatis* foram selecionadas para o ensaio contra *M. tuberculosis*. Para a realização dos bioensaios foram utilizadas placas de 96 poços e adicionados os reagentes na seguinte ordem:

1. Água destilada autoclavada: 200µL nos poços das colunas 1 e 12, nas fileiras A e H;
2. Caldo Middlebrook 7H9: 100µL nos poços das colunas 2 a 11, nas fileiras de B a G;
3. Extrato teste: 100µL nos poços da coluna 2, nas fileiras de B a G;
4. Diluições sucessivas dos extratos teste: após homogeneização do conteúdo dos poços da coluna 2, fileiras de B a G, foram transferidos 100µL do extrato teste para os poços laterais da direita e sucessivamente repetidas até os poços da coluna 10, fileiras de B a G. Os 100µL retirados dos poços da coluna 10, fileiras de B a G foram desprezados;
5. Inóculo micobacteriano: 100µL nos poços das colunas 2 a 11, nas fileiras de B a G.

As microplacas (Figura 04) foram incubadas a 37 °C por um período de cinco dias.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<b>A</b>	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
<b>Fração X</b>	<b>B</b>	H <sub>2</sub> O	Extr	512	256	128	64	32	16	8	4(ug/mL)	Contr+	H <sub>2</sub> O
	<b>C</b>	H <sub>2</sub> O	Extr	512	256	128	64	32	16	8	4(ug/mL)	Contr+	H <sub>2</sub> O
	<b>D</b>	H <sub>2</sub> O	Extr	512	256	128	64	32	16	8	4(ug/mL)	Contr+	H <sub>2</sub> O
<b>Fração Y</b>	<b>E</b>	H <sub>2</sub> O	Extr	512	256	128	64	32	16	8	4(ug/mL)	Contr+	H <sub>2</sub> O
	<b>F</b>	H <sub>2</sub> O	Extr	512	256	128	64	32	16	8	4(ug/mL)	Contr+	H <sub>2</sub> O
	<b>G</b>	H <sub>2</sub> O	Extr	512	256	128	64	32	16	8	4(ug/mL)	Contr+	H <sub>2</sub> O
	<b>H</b>	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Figura 04** – Representação da microplaca do bioensaio de Alamar Blue, visando à detecção da ação inibitória de *Mycobacterium tuberculosis* por extratos de *Aspergillus fumigatus*

Após esse período, foram adicionados 50µL da solução reveladora Alamar Blue/Tween 80 (1:1) aos poços e a microplaca re-incubada por mais 24 horas. Posteriormente analisou-se a atividade inibitória, caracterizada pela cor azul.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção dos Mutantes de *Aspergillus fumigatus*

Foram obtidas 18 colônias sobreviventes à radiação ultravioleta, as quais foram designadas mutantes derivadas do isolado selvagem de *A. fumigatus*, CBA 2743. Dentre estas, 11 colônias (M1 a M11) foram obtidas com tempo de exposição de 10 minutos e sete colônias (M12 a M18) com tempo de exposição de 20 minutos.

### 5.2 Bioensaios de antibiose de *Aspergillus fumigatus* contra *Staphylococcus aureus*

Das 18 colônias mutantes obtidas, oito apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, sendo quatro mutantes obtidos do tempo de exposição à luz UV de 10 minutos (M3, M7, M8 e M10) e quatro do tempo de exposição de 20 minutos (M12, M16, M17 e M18). Os isolados selvagens CP1 e CP2 de *A. fumigatus*, originalmente inibidores de *M. tuberculosis* (CARVALHO, 2005; 2010) também apresentaram atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, embora demonstrando eficiência de inibição diferenciada.

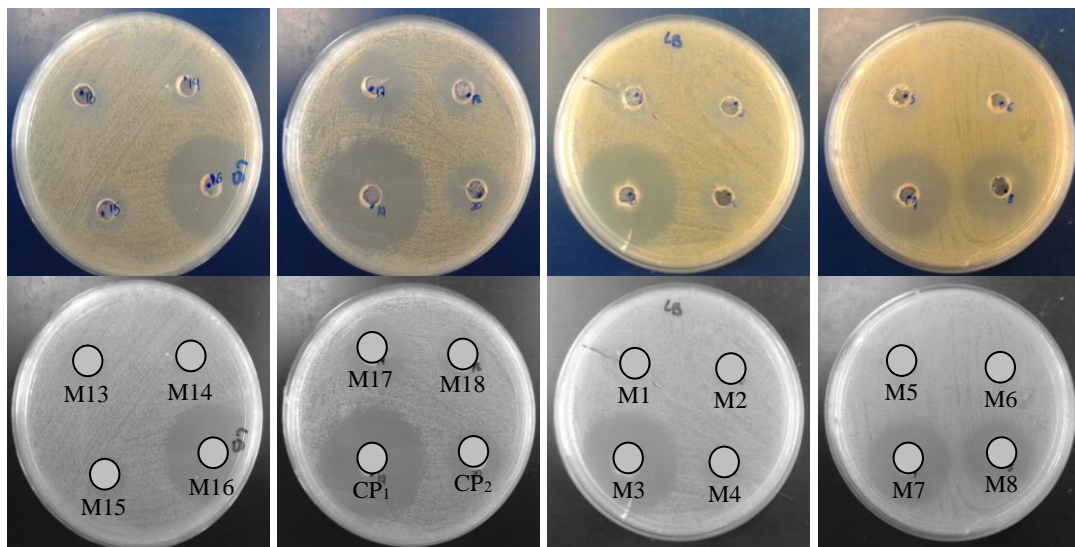
Do resultado obtido pode-se observar que a luz UV, da mesma forma que pode acentuar uma característica expressa (nesse caso, a atividade antimicrobiana), também pode inibi-la completamente, como foi observado para 10 dos mutantes obtidos, que demonstraram supressão completa da atividade inibitória sobre *S. aureus*, nas condições testadas. A radiação UV interage com a molécula de DNA, podendo provocar alterações significativas, a depender da intensidade e do tempo de exposição (SCHABERLE e SILVA, 2000), do organismo e das condições vigentes (PASSAGLIA, 2014). Estudos *in vitro* indicaram que a luz UV no comprimento de onda de 254nm é absorvida ativamente por pirimidinas (timinas e citosinas no DNA), as quais se tornam muito reativas, resultando em produtos de absorção conhecidos como hidratos e dímeros de pirimidinas. Esses dímeros causam mutações alterando a hélice de DNA ou facilitando a geração de erros em processos de reparação (PASSAGLIA, 2014).

A atividade inibitória de fungos endofíticos do gênero *Aspergillus* contra *S. aureus* já foi relatada por Souza et al. (2004), que isolaram 571 fungos endofíticos de *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*, constatando que quatro isolados de *A. niger* mostraram-se promissores frente à bactéria em questão. Também no trabalho de Sette et al. (2006), os autores descreveram a atividade inibitória de *A. versicolor* endófito, isolado de *Coffea* spp., contra várias bactérias patogênicas, incluindo *S. aureus*.

A produção de metabólitos secundários por uma espécie pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo as características particulares de cada isolado. Verificou-se que os

controles positivos (*A. fumigatus* selvagens: CP1 e CP2) não responderam da mesma forma quando confrontados com *S. aureus*.

O isolado controle CP1 apresentou atividade mais acentuada, com halo de inibição de 36mm de diâmetro, quando comparado ao isolado selvagem CP2, com halo de inibição de 19mm, apesar das condições padronizadas dos ensaios (Figura 05).



**Figura 05** – Placas de teste de antibiose dos extratos brutos de *Aspergillus fumigatus* mutantes e não mutantes contra *Staphylococcus aureus*. Legenda: (CP<sub>x</sub> = controles positivos representando os isolados não mutantes), (M<sub>xx</sub>= isolados mutantes derivados de CP)

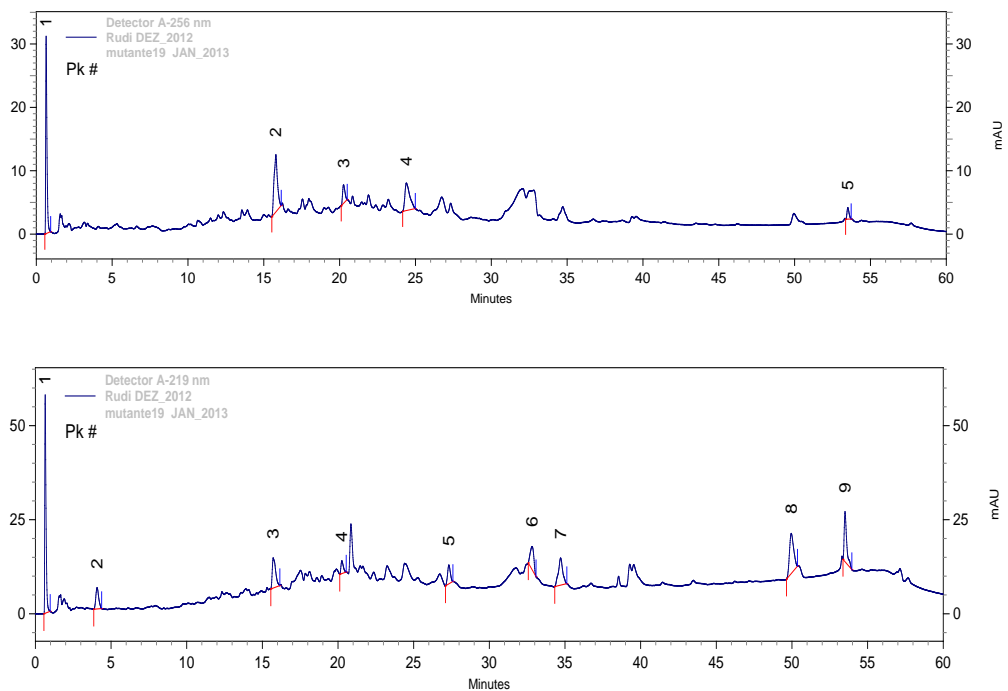
Dentre os oito mutantes que apresentaram níveis variados de inibição de *S. aureus*, em três (M3, M7 e M16) os halos de inibição foram semelhantes àqueles apresentados pelo isolado selvagem CP1, tendo sido M3 e M7 obtidos com exposição à luz UV de 10 minutos e M16, com exposição à luz UV de 20 minutos.

Os dois tempos de exposição à luz UV foram eficientes para a obtenção de mutantes derivados, os quais mantiveram a atividade antimicrobiana expressa pelo isolado selvagem. Mas para um processo de melhoramento genético visando o aumento da quantidade de metabólitos ativos, seria necessário aumentar o quantitativo de mutantes para ampliar as chances de obter ao menos um isolado que apresente maior índice de atividade quando comparado com o isolado selvagem.

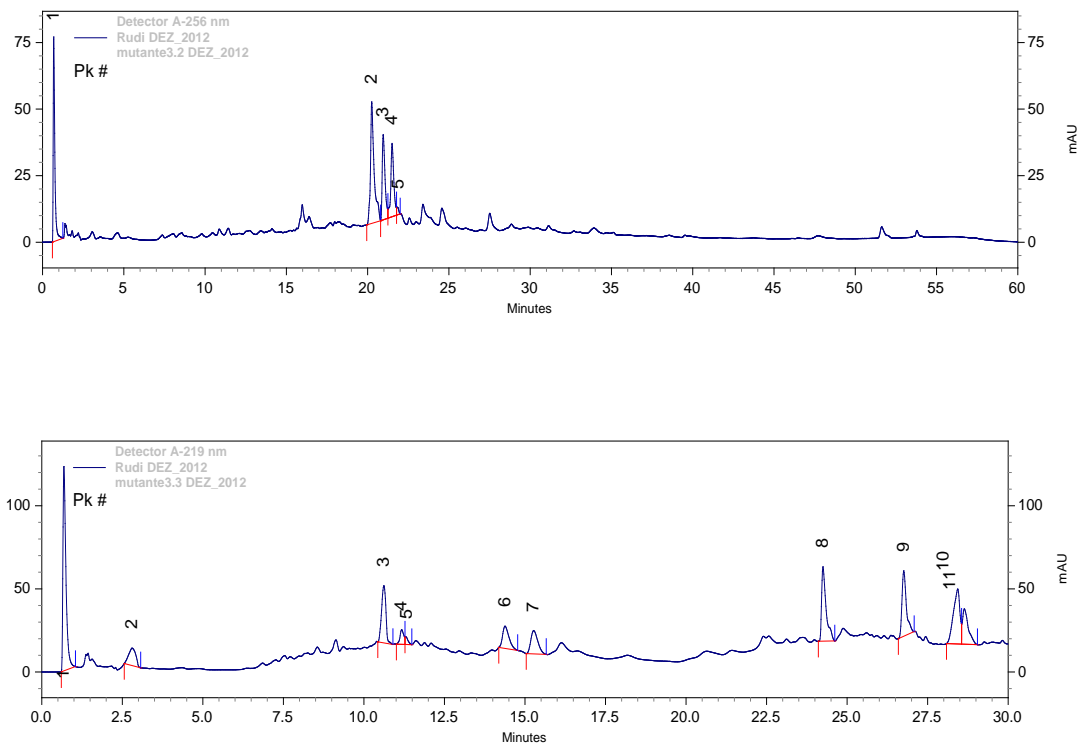
### 5.3 Fracionamento em Cromatografia Líquida Analítica

Foram avaliados 20 extratos resultantes da partição líquido-líquido em n-butanol (18 mutantes + 2 isolados selvagens) nos comprimentos de onda de 256 e 219nm, sendo que todas as 20 amostras apresentaram picos inespecíficos nos 40 cromatogramas avaliados, sugerindo que o fracionamento inicial em n-butanol foi bem sucedido.

Comparando-se os cromatogramas dos isolados mutantes com o controle positivo CP1, o qual apresentou o maior halo de inibição, observou-se um pico do controle positivo 1 (CP1), que foi comum a todos os mutantes que apresentaram atividade significativa de inibição sobre *S. aureus*. Na Figura 06 e 07, são apresentados os cromatogramas do isolado selvagem (CP1) e de M3, respectivamente, nos dois comprimentos de onda considerados, para fins de comparação. Nesses, observou-se o pico no tempo de retenção de 1 minuto, o qual está, a princípio, correlacionado à característica de interesse, visto que foi comum aos isolados inibidores de *S. aureus* em testes preliminares.

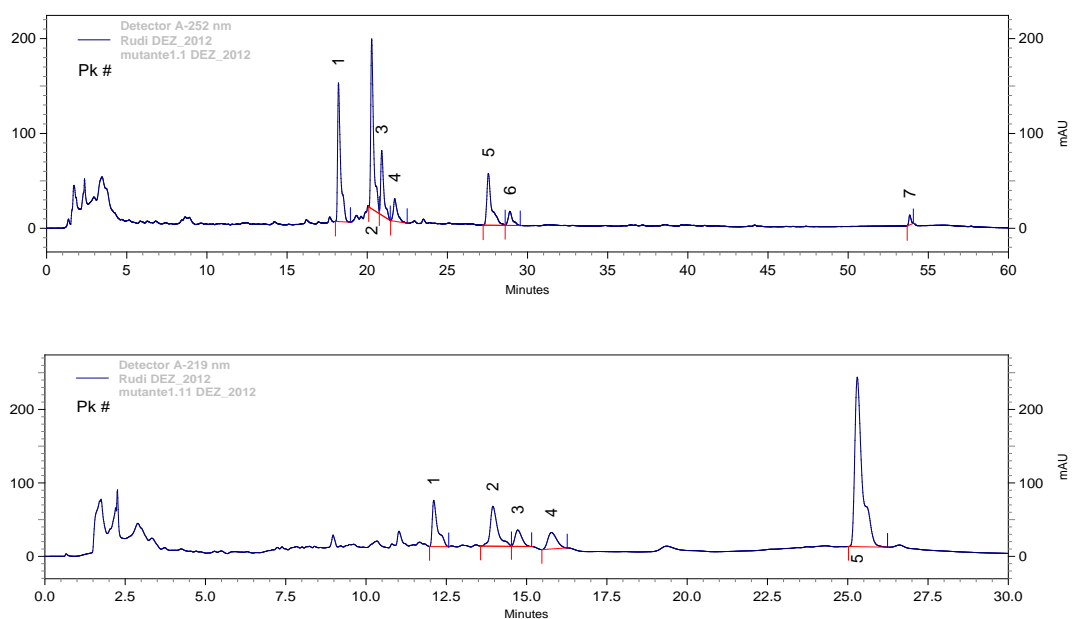


**Figura 06** – Cromatogramas do extrato em n-butanol do isolado não-mutante CP1 obtidos a partir da leitura em  $A_{256}$  (cromatograma superior) e  $A_{219}$  (cromatograma inferior)



**Figura 07** – Cromatogramas do extrato em n-butanol do isolado mutante M3 obtidos a partir da leitura em A<sub>256</sub> (cromatograma superior) e A<sub>219</sub> (cromatograma inferior)

Outra evidência que indica essa correlação é a ausência desse mesmo pico nos cromatogramas dos demais isolados, que não apresentaram atividade, como por exemplo, o mutante 1 (M1), que não apresentou halo de inibição (Figura 08).



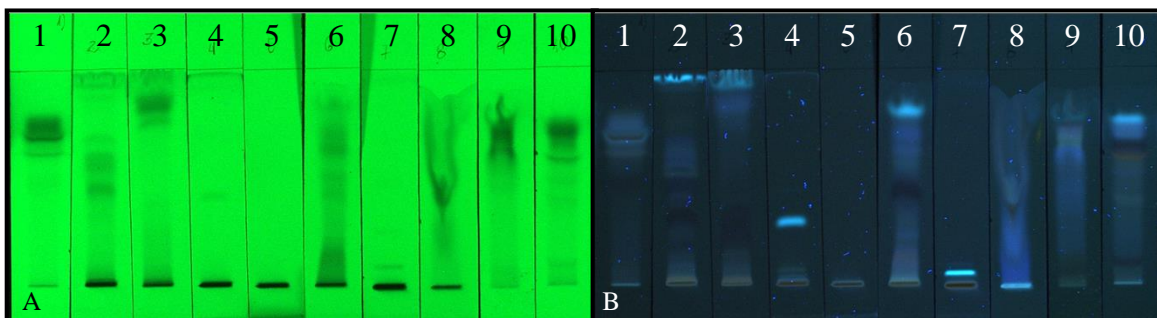
**Figura 08** – Cromatogramas do extrato em n-butanol do isolado mutante M1 obtidos a partir da leitura em A<sub>256</sub> (cromatograma superior) e A<sub>219</sub> (cromatograma inferior)

Separações analíticas de CLAE podem e devem ser realizadas como corridas preliminares para permitir a otimização da separação em escala preparativa (WENNBORG et al., 2001). Foi possível observar nos cromatogramas que as mutações alteraram o metabolismo dos mutantes, visto que os mesmos apresentaram picos diferenciados entre si.

#### 5.4 Análise da fração por Cromatografia em Camada Delgada - CCD

Inicialmente, foram obtidos vários perfis cromatográficos por CCD em sílica gel, empregando diferentes solventes (Figura 09) e baseando-se na diferença de polaridade dos mesmos.

Dessa primeira triagem, foram obtidos perfis cromatográficos contrastantes entre si, que permitiram a seleção de sistemas eluentes eficientes para a separação das bandas cromatográficas.



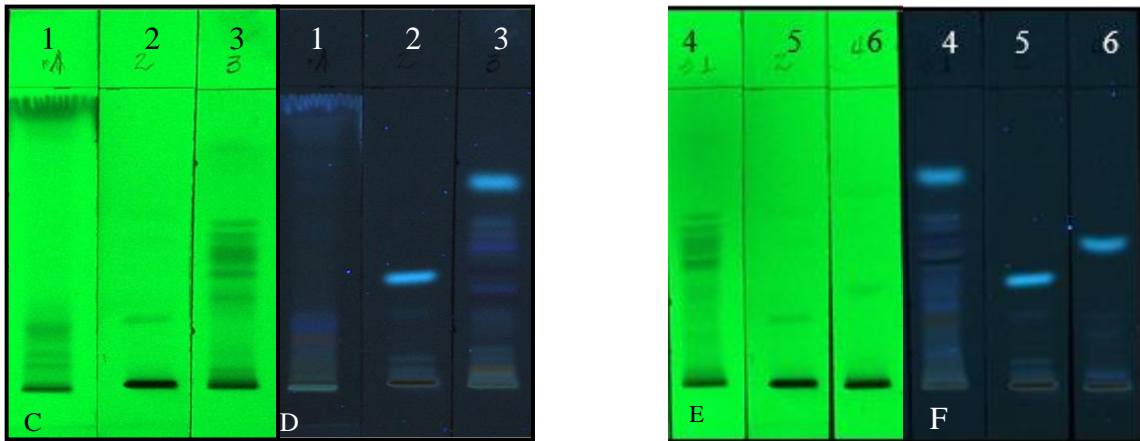
**Figura 09** - Cromatoplasas do extrato n-butanol de *Aspergillus fumigatus* (isolado CP1): **A** (A<sub>254</sub>) e **B** (A<sub>366</sub>); 1) metanol, 2) acetato de etila, 3) acetonitrila, 4) diclorometano, 5) hexano, 6) n-butanol, 7) tolueno, 8) hidróxido de amônio, 9) ácido acético e 10) etanol.

Os melhores solventes para uma separação mais eficiente dos compostos foram metanol, acetato de etila e etanol, utilizado inicialmente para a obtenção do produto do primeiro fracionamento do extrato bruto de *A. fumigatus*.

Adicionalmente, esses resultados da triagem inicial também foram úteis para a determinação de derivações desses sistemas eluentes, os quais foram utilizados em conjunto, em diferentes combinações e concentrações, visando resultados mais satisfatórios para a separação das bandas.

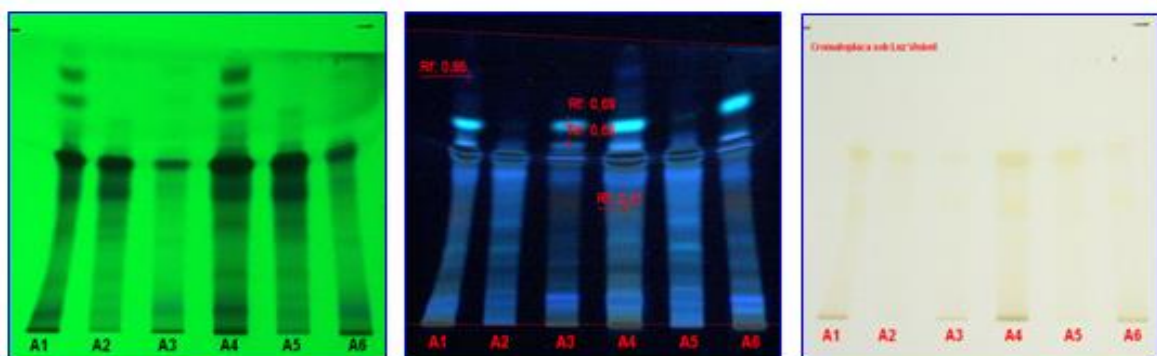
Na Figura 10, estão ilustrados os resultados obtidos da cromatografia utilizando as derivações, em diferentes combinações, dentre os quais se destacaram os sistemas eluentes compostos por: tolueno-etanol (8:2) e hexano-acetato de etila-metanol (8:1:1). É possível observar que a utilização de ambos os sistemas eluentes permite a separação do extrato n-butanol de *A. fumigatus* do isolado CP1 em um maior número de bandas cromatográficas, o

que reflete em uma melhor separação das substâncias constituintes do composto analisado, em ambos os comprimentos de onda (254 e 366nm).



**Figura 10** - Cromatogramas da fração n-butanol de *Aspergillus fumigatus* (isolado CP1): C e E ( $A_{254}$ ) e D e F ( $A_{366}$ ): 1) diclorometano – etanol 8:2; 2) hexano - acetato de etila 8:2; 3) tolueno – etanol 8:2; 4) tolueno - etanol 8:2 + 4 gotas de ácido acético; 5) hexano – acetato de etila-metanol 8:1:1; 6) acetato de etila – metanol 8:2.

Após a seleção dos sistemas eluentes, parte das amostras foram submetidas a uma extração em fase sólida (SPE), cartucho de fase normal, da qual foram obtidas quatro frações, identificadas como A – hexano; B – acetato de etila; C – metanol; D – metanol-água (9:1). Dessas, apenas as frações A (hexano) e B (acetato de etila) mantiveram a atividade contra *S. aureus* e por isso, foram submetidas ao perfil cromatográfico em fase normal, com o sistema de solventes otimizado, mostrando que a separação com tolueno-etanol-ácido acético 7:3+4 gotas apresentou uma ótima separação das substâncias (Figura 11).



**Figura 11** – Perfis das amostras obtidas em extração em fase sólida – fase normal, solubilizadas em metanol, sendo A1 e A4 as amostras brutas, A2 e A5 frações em hexano, A3 e A6 frações em acetato de etila. Em verde, luz UV a 254 nm. Em preto, luz UV a 366 nm. Luz branca.

### 5.5 Fracionamento em Cromatografia FLASH

O extrato em n-butanol também foi submetido à evaporação para a utilização em MPLC. Para tanto, 10mg da amostra foi submetida à cromatografia FLASH em MPLC e fracionada utilizando duas combinações de solventes: hexano-acetato de etila e acetato de etila-metanol.

O melhor resultado foi obtido da combinação de acetato de etila-metanol, tendo sido resgatadas 30 frações em sistema de gradiente, as quais foram testadas quanto à sua atividade biológica contra *M. smegmatis*.

O sistema FLASH de purificação mostrou-se eficiente em separar substâncias, aliando resultados satisfatórios com o volume de amostra que foi possível utilizar neste sistema. A quantidade de amostra constitui uma das principais dificuldades quando se propõe a obtenção de material para fracionamento por técnicas cromatográficas, como por exemplo, o HPLC, visto que a maioria das técnicas requer quantidades consideráveis de um material de difícil obtenção.

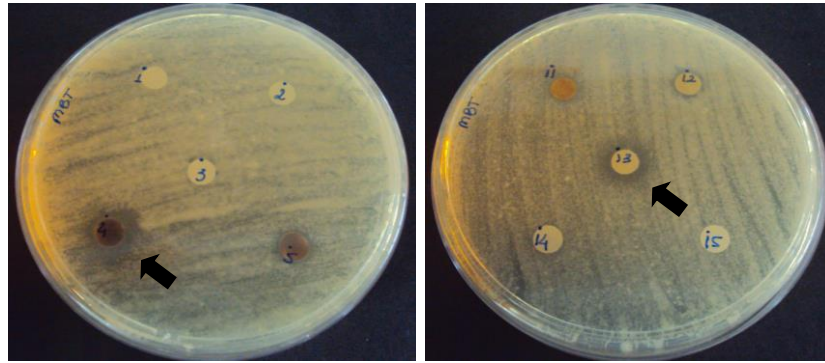
Assim, o MPLC é um sistema indicado para montagem de bancos de substâncias para a busca de novos medicamentos, como mostrado por vários trabalhos que têm demonstrado a eficiência desta técnica (EDWARDS e HUNTER, 2003; POTTORF e PLAYER, 2004; LIU et al., 2012).

### 5.6 Atividade antimicrobiana de frações contra *Mycobacterium smegmatis*

As 30 frações (numeradas sequencialmente: F1 a F30) do extrato em n-butanol do caldo de fermentação da linhagem selvagem de *A. fumigatus* (CP1), obtidas através da MPLC (item 5.5), foram avaliadas quanto à sua atividade biológica contra *M. smegmatis*. Destas, duas frações (F4 e F13) apresentaram atividade contra a micobactéria, em teste de antibiose pelo método da difusão em disco (Figura 12), contrastando com as demais 28 frações, que não apontaram para a formação de halos de inibição nos ensaios.

É possível inferir, mais uma vez, sobre a capacidade de fracionamento das técnicas cromatográficas, visto que, a cada etapa, as amostras apresentam graus mais elevados de purificação. O monitoramento das técnicas de fracionamento por meio dos ensaios de antibiose permite, no caso específico do objetivo do presente trabalho, selecionar e purificar em graus gradativamente mais elevados, os compostos que se pretende identificar/estudar/investir.

Ambas as frações foram selecionadas e utilizadas para a próxima etapa, que consistiu nas análises cromatográficas em CLAE analítica.

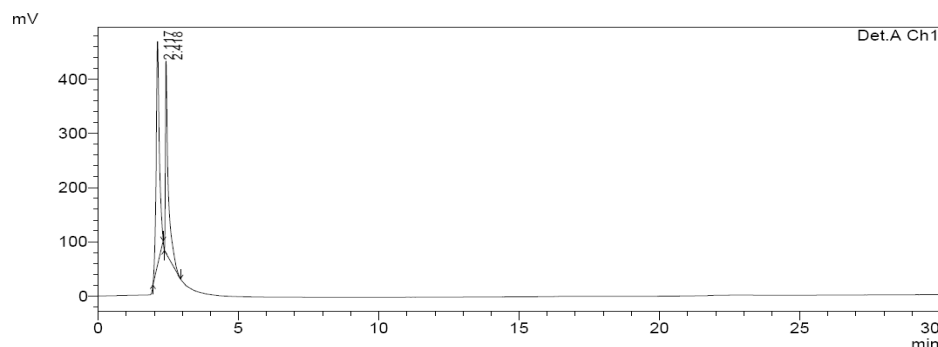


**Figura 12-** Teste de antibiose das frações de *Aspergillus fumigatus* contra *Mycobacterium smegmatis*. As setas indicam as frações F4 (placa à esquerda) e F13 (placa à direita), com resultado positivo para inibição de *Mycobacterium smegmatis*

### 5.7 Avaliação das Frações em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica

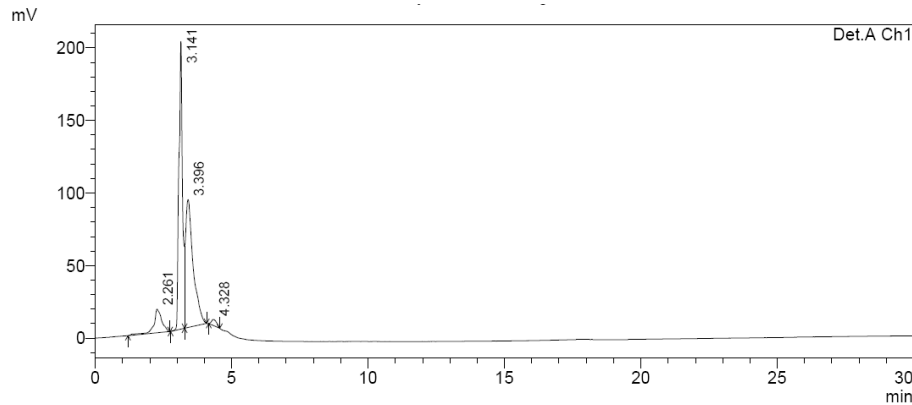
As frações F4 e F13, que apresentaram antagonismo positivo para *M. smegmatis* foram submetidas à análise cromatográfica por CLAE analítica. Os cromatogramas (Figuras 13 e 14), apontaram para picos de retenção em tempos entre dois a quatro minutos, sendo que o intervalo entre dois e três minutos foram os mais expressivos para uma possível correlação dos resultados obtidos para ambas as frações, em se tratando da atividade antimicobacteriana. As leituras foram realizadas em vários comprimentos de onda, sendo que a melhor foi aquela de 254nm.

Vários trabalhos têm sido realizados sobre a atividade biológica dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, mas há poucos trabalhos na literatura direcionando a atividade biológica deste fungo contra *M. tuberculosis* (CARVALHO, 2010). Sendo um fungo extremamente ubíquo, torna-se interessante o isolamento e purificação de *Aspergillus* spp. de diferentes fontes, visando à obtenção de isolados detentores de expressiva atividade antimicrobiana, não somente para *M. tuberculosis*, mas para outros patógenos.



**Figura 13.** Cromatograma obtido da fração F4 em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em leitura a  $A_{254}$





**Figura 14.** Cromatograma obtido da fração F13 em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em leitura a  $A_{254}$

No presente trabalho, foi verificada a atividade de *A. fumigatus* endofítico, isolado de copaíba, o qual demonstrou atividade inibitória sobre *S. aureus* multi-resistente, *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*. Assim, considerou-se que esse gênero pode vir a se tornar uma importante fonte de compostos antimicrobianos novos, que poderão ajudar a suprir o mercado de medicamentos na indústria farmacêutica. Estudos como esse são de suma importância para o início da busca de novos compostos.

O potencial de *A. fumigatus* como produtor de metabólitos secundários para diversas aplicações já foi demonstrado em outros trabalhos, sendo que as principais benesses advindas dessa espécie são: produção de antibióticos (WAKSMAN e GEIGER, 1944; FURTADO et al., 2002; FURTADO et al., 2005), produção de antifúngicos (MUKHOPADHYAY et al., 1987; FURTADO et al., 2002; SCHULZ et al., 2002; LIU et al., 2004), atividade anti acetil-CoA (TOMODA et al., 1994), atividade antitumoral (CUI et al., 1995) e atividade anti-tripanosoma (WATTS et al., 2010).

### 5.8 Bioensaio de Antagonismo Micobacteriano

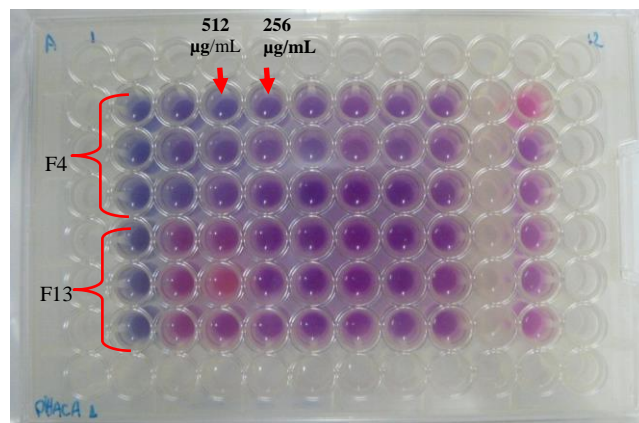
O resultado de atividade inibitória pela técnica do Alamar Blue é constatado quando, após a reação de oxidação, o desenvolvimento micobacteriano é detectado pela coloração rósea e, ao contrário, a ausência de desenvolvimento bacteriano é detectada pela coloração azul. Assim, foi detectada atividade antimicobacteriana positiva nos poços azuis (F4 com CIM de 512 e 256  $\mu\text{g/mL}$ , Figuras 04 e 16).

Apesar da detecção da atividade antimicobacteriana no teste do Alamar Blue, considerou-se que a CIM obtida de 256  $\mu\text{g/mL}$  é ainda elevada, se comparada a padrões

promissores para a terapêutica da TB. Gu et al. (2004), considera como promissores aqueles resultados que apresentam valores de CIM  $\leq 125\mu\text{g/mL}$ . Os fármacos utilizados na terapêutica da TB apresentam CIM variáveis de  $0,03\mu\text{g/mL}$  (isoniazida) a  $50\mu\text{g/mL}$  (pirazinamida).

Por outro lado, dentre as frações analisadas, é possível que outras pudessem ser utilizadas para os ensaios, visando a busca de compostos que apresentem CIM menor e que constituam fortes candidatos a estudos exploratórios mais aprofundados. Valores de CIM próximos aos observados no presente trabalho foram obtidos por Prince (2008), que ao avaliar a atividade antimicobacteriana de extratos de fungos endofíticos obteve valores entre  $31,25$  a  $250\mu\text{g/mL}$ .

Esse estudo abre perspectivas para a continuidade das análises, visando à descoberta de novos compostos antimicobacterianos. Observou-se também a necessidade de mais purificações, visando à separação dos picos obtidos (Figura 13) e à redução da CIM obtida.



**Figura 15.** Atividade antimicrobiana das frações F4 e F13, em triplicata, de *Aspergillus fumigatus* contra *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica do Alamar-blue

## 6 CONCLUSÕES

- O isolado selvagem de *A. fumigatus* endofítico isolado de copaíba apresentou atividade antimicrobiana considerável, visto ter apresentado atividade inibitória sobre *S. aureus*, *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* e constituindo um excelente material de estudo investigatório;
- Métodos cromatográficos aliados a ensaios de antibiose são excelentes complementos para o estudo de novos compostos antimicrobianos. Apesar de mais trabalhoso, o sistema bio-guiado é o mais indicado para este tipo de prospecção;
- Apesar de não aumentar a produção de substâncias com atividade antibiótica, a mutação se mostrou importante para alterar o metabolismo do fungo.

## REFERÊNCIAS

- ANDO, O.; SATAKE, H.; NAKAJIMA, M.; SATO, A.; NAKAMURA, T.; KINOSHITA, T.; FURUYA, K.; HANEISHI, T. Synerazol, a new antifungal antibiotic. **The Journal of Antibiotics**, vol. 44, n.4, p. 382–389, 1991.
- ARBEX, M. A.; VARELLA, M. C. L.; SIQUEIRA, H. R. ; MELLO, F. A. F. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol. 36, n. 5, p. 626-640, 2010.
- ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hiperdiverse? **Ecology Letters**, vol. 3, n.4, p. 267-274, 2000.
- AZEVEDO, J. L. Micro-organismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 117-138.
- BERESFORD, N.; PATEL, S.; ARMSTRONG, J.; BALÁZS, S. Z.; FORDHAM-SKELTON, A. P.; TABERNERO, L. MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. **Biochemical Journal**, vol. 406, n.1, p. 13-18, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5ed. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT. 2002. 238 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. 2014. **O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios**. 45(2): 1-13. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/29/BE-2014-45--2--tb.pdf>>. Acesso em: 27 mai 2014.
- BRENNAN P. J. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. **Clinical Infectious Diseases**, vol.11, n.2, p. 420-430, 1989.
- CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacoutiaceae)**. 2007. 139 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.
- CAMINERO LUNA, J. A. **Guía de la tuberculosis para médicos especialistas**. Paris: Union Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. 2003, 390p.
- CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Revista Pulmão RJ**, vol. 15, n.1, p. 29-35. 2006.

CARVALHO, C. M. **Recursos naturais amazônicos com perspectivas de uso biotecnológico sobre o *Mycobacterium tuberculosis***. 2005. 95p. Dissertação (Mestrado Interunidades em Biotecnologia). Universidade de São Paulo/ Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2005.

CARVALHO, C. M. **Estudo dos Metabólitos de Fungos Endofíticos de *Copaifera multijuga* Hayne para uso na terapêutica da Tuberculose**. 2010. 123p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades). **Tuberculosis extremadamente resistente**. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/esp/topic/drtb/xdrtb.htm>>. Acesso em 07 fev. 2014.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, vol. 68, n.7, p. 1103-1105, 2005.

COLD, C. J.; TAYLOR, J. R. The prepuce. **British Journal of Urology**, vol.83, n.1, p. 34-44, 1999.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

COROS, A.; DECONNO, E.; DERBYSHIRE, K. M. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among Mycobacterial species. **Journal of Bacteriology**, vol. 190, n.9, p. 3408-3410, 2008.

CTAT (Comitê Técnico-Científico de Assessoramento à Tuberculose). **Plano Nacional de Controle da tuberculose: manual de normas**. Brasília, 2000. 184p.

CUI, C. B.; KAKEYA, H.; OKADA, G.; ONOSE, R.; UBUKATA, M.; TAKAHASHI, I.; ISONO, K.; OSADA, H. Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Antibiotics**, vol. 48, n. 11, p. 1382-1384, 1995.

CUNNINGHAM, R.; COCKAYNE, A.; HUMPHREYS, H. Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bone and joint infections. **The Journal of Medical Microbiology**, vol. 44, n.3, p. 157-164, 1996.

DALCOLMO, M. P.; ANDRADE, M. K. N.; PICON, P. D. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Revista de Saúde Pública**, vol. 41, n.1, p. 34-42, 2007.

DEBEAUPUIS, J. P.; SARFATI, J.; CHALAZET, V.; LATGE, J. P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, vol. 65, n.8, p. 3080–3085, 1997.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, vol.1, n.7, p. 21-25, 1998.

DETTRAKUL, S.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; NOPICHAJ, S.; SUYARNSESTAKORN, C.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimycobacterial pimarane diterpenes from the fungus *Diaporthe* sp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, vol. 13, n.7, p. 1253-1255, 2003.

DORMANS, J.; BURGER, M.; AGUILAR, D.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; KREMER, K.; ROHOLL, P.; AREND, S. M.; VAN SOOLINGEN, D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. **Clinical & Experimental Immunology**, vol. 137, n. 3, p. 460-468, 2004.

DORRONSORO, I.; TORROBA L. Microbiology of tuberculosis. **Anales Del Sistema Sanitario de Navarra**, vol. 27, n.2, p. 67-84, 2007.

DRAPER, P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. **Frontiers in Bioscience**, vol. 3, n. 1, p. 1253-1261, 1998.

DUCATI, R. G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 101, n.7, p. 697-714, 2006.

EDWARDS, C.; HUNTER, D. J. High-throughput purification of combinatorial arrays. **Journal of Combinatorial Chemistry**, vol. 5, n.1, p. 61–66, 2003.

FARGA, V.; CAMINERO, J. A. Tuberculosis, tercera edición. **Revista Médica de Chile**, vol. 139, n. 5, p. 681-682, 2011.

FELTRIN, C. W.; MELLO, A. M. S.; SANTOS, J. G. R.; MARQUES, M. V.; SEIBEL, N. M.; FNTOURA, L. A. M. Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, vol. 30, n. 1, p. 80-82, 2007.

FERRARA, M. A. Fungos endofíticos: potencial para a produção de substâncias bioativas. **Revista Fitos**, vol. 2, n. 1, p. 73-79, 2006.

FERREIRA, W.; SOUSA J. **Microbiologia**. vol. 2. Lidel-edições técnicas: Portugal, 350p. 2000.

FOSTER, T. 2005 *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch012.htm>. Acesso em 23/05/2014.

FRANSBLAU, S. C.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; ERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUSON, R. M.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 36, n.2, p. 362-366, 1998.

FURTADO, N. A. J. C.; SAID, S.; ITO, I. Y.; BASTOS, J. K. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. **Microbiology Research**, v. 157, n.1, p. 207-211, 2002.

FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* brazilian strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 16, n. 6B, p. 1448-1453, 2005.

GRUTZMACHER, L. K. ; DALMARCO E. M.; BLATT, S. L.; CORDOVA, C. M. M. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 45, n. 1, p. 95-99, 2012.

GU, J. Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; MONTENEGRO, G.; YANG, D.; TIMMERMANN, B. N. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. **Planta Medica**, vol. 70, n. 1, p. 509-514, 2004.

GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ISTURIZ, R.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E.; LABARCA, J.; LUNA, C. M.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SALLES, M. J.; ZURITA, J.; SEAS, C. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 34, n. 4, p.304-308, 2009.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. **Effects of tea tree oil on *Staphylococcus aureus* virulence factors**. Rural Industries Research and Development Corporation, 32p. 2005.

HASEGAWA, Y.; FUKUDA, T.; HAGIMORI, K.; TOMODA, H.; OMURA, S. Tensyuc Acids, New Antibiotics produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 55, n. 1, p.1338-1341, 2007.

HOFFMAN, A. M.; MAYER, S. G.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; SOVOCOL, G. W.; GRANGE, A. H.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; KELLEY-SWIFT, E. G. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. **Phytochemistry**, vol. 69, n. 4, p. 1049-1056, 2007.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. The Mycobacteria. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ª edição. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, p. 597-603. 1994.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. **Preparative Chromatography Techniques: applications in natural product isolation**. 2<sup>nd</sup> ed., Berlin: Springer, 1997, 244p.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal of Natural Products**, vol. 64, n.8, p. 1015-1018, 2001.

JORDAN, P. W.; STANLEY, T.; DONNELLY, F. M.; ELBORN, J. S.; MCCLURG, R. B.; MILLAR, B. C.; GOLDSMITH, C. E.; MOORE, J. E. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 44, n. 5, p. 459-466, 2007.

KENNEDY, D. G.; McCracken, R. J.; CANNAPAN, A.; HEWITT, S. A. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and a milk. **Journal of Chromatography**, vol. 812, n. 1-2, p. 77-98, 1998.

KIKUCHI, K.; TAKAHASHI, N.; PIAO, C.; TOTSUAKA, H. N.; UCHIYAMA, T. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing neonatal toxic shock syndrome-like exantematous disease in neonatal and perinatal wards. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.7, n. 1, p. 3001-3006, 2003.

KNAPP, S.; GONZALEZ, S.; MYERS, D. S.; ECKMAN, L. L.; BEWLEY, C. A. Shortcut to methylthiol analogues. **Organic Letters**, vol. 4, n. 24, p. 4337-4339, 2002.

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: Medsi, 2001. 1465p.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, vol. 66, n. 5, p. 709-711, 2003.

LANÇAS, F. M.; McNAIR, H. M. Cromatografia em fase gasosa: teoria elementar. **Química Nova**, vol. 6, n. 1, p. 6-13, 1983.

LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, vol. 9, n. 8, p. 382-389, 2001.

LECHNER, D.; GIBBONS, S.; BUCAR, F. Modulation of isoniazid susceptibility by flavonoids in *Mycobacterium*. **Phytochemistry Letters**, vol. 1, n. 2, p. 71-75, 2008.

LI, Y.; LI, X.; KIM, S. K.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; RHO, J. R.; SON, B. W. Golmaenone, a new diketopiperazin alkaloid from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 52, n. 1, p.375-376, 2004a.



LI, X. Z.; ZHANG, L.; NIKAIDO, H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents Chemother**, vol. 48, n. 7, p. 2415-2423, 2004b.

LIMA, A. M.; SALEM, J. I.; SOUZA, J. V. B.; CORTEZ, A. C. A.; CARVALHO, C. M.; CHAVES, F. C. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 14, n. 4, p. 8-8, 2011.

LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z. J.; ZOU, W. X.; TAN, R. X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, vol. 114, n. 3, p. 279-287, 2004.

LIU, M.; CHEN, K.; CHRISTIAN, D.; FATIMA, T.; PISSARNITSKI, N.; STRECKFUSS, E.; ZHANG C.; XIA. L.; BORGES, S.; SHI, Z.; VACHAL, P.; TATA, J.; ATHANASOPOULOS, J. High-throughput purification platform in support of drug discovery. **ACS Combinatorial Science**, vol.14, n.1, p. 51–59, 2012.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, vol. 39, n. 1, p. 520-532, 1998.

McKINNON, P. S.; BOENING, A. J.; AMIN, A. N. Optimizing delivery of care for patients with MRSA infection: focus on transitions of care. **Hospital Practice**, vol. 39, n. 2, p. 18-31, 2011.

MITCHISON, D. A. Antimicrobial therapy of tuberculosis: justification for currently recommended treatment regimens. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, vol. 25, n. 3, p. 307-315, 2004.

MITCHISON, D. A. Drug Resistance in tuberculosis. **European Respiratory Journal**, vol. 25, n. 2, p. 376-379, 2005.

MITCHISON, D. A.; NUNN, A. J. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. **The American Review of Respiratory Disease**, vol. 133, n. 2, p. 423-430, 1986.

MONECKE, S.; COOMBS, G.; SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C.; AKPAKA, P.; BORG, M.; CHOW, H.; IP, M.; JATZWALK, L.; JONAS, D.; KADLEC, K.; KEARNS, A.; LAURENT, F.; O'BRIEN, F. G.; PEARSON, J.; RUPPELT, A.; SCHWARZ, S.; SCICLUNA, E.; SLICKERS, P.; TAN, H.; WEBER, S.; EHRITCH, R. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, vol. 6, n. 4, e17936, 2011.

MOREL, C. M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 22, n. 8, p. 1522-1523, 2006.

MSF (Médecins sans Frontières). **Tuberculosis**. Disponível em: <<http://www.msfacecess.org/our-work/tuberculosis>>. Acesso em: 09 mai. 2014.

MUKHOPADHYAY, T.; ROY, K.; COUTINHO, L.; RUPP, R. H.; GANGULI, B. N. Fumifungin, a new antifungal antibiotic from *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863. **The Journal of Antibiotics**, vol. 40, n. 1, p. 1050–1052, 1987.

NAZIR, T.; RASOOL, M. H.; HAMEED, A.; AHMAD, B.; QURESHI, J.A. Ethambutol resistance of indigenous *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 41, n. 4, p. 1065-1069, 2010.

NEWTON, J.A. Jr.; WEISS, P. J.; BOWLER, W. A.; OLDFIELD E. C. Soft-tissue infection due to *Mycobacterium smegmatis*: report of two cases. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 16, n. 4, p. 531-533, 1993.

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 395, n. 1, p. 1225-1242, 2009.

O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 17, n. 1, p. 218-234, 2004.

O'CALLAGHAN, R. J.; MCCORMICK, C. C.; CABALLERO, A. R.; MARQUART, M. E.; GATLIN, H. P.; FRATKIN, J. D. Age-related differences in rabbits during experimental *Staphylococcus aureus* keratitis. **Investigative Ophthalmology Vision Science**, vol. 48, n. 11, p. 5125-5131, 2007.

OLIVEIRA, J. S. R. L. **Estudo da *Caesalpinia ferrea* Martius na obtenção de bioativos antagônicos aos agentes da Tuberculose e Candidíase**. 2008. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

PASSAGLIA, L. M. P. Mutação e reparação do DNA. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.) **Biologia Molecular Básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 133-162.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). **Química Nova**, vol. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PEACOCK, S. J.; SILVA, I.; LOWY, F. D. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? **Trends in Microbiology**, vol. 9, n. 1, p. 605-610, 2001.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, vol. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PETRINI, B.; HOFFNER, S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 13, n.1, p. 93-97, 1999.

PORTELA, J. S.; TIRADO, B. V.; CÁMARA, L. S. Tuberculosis pulmonar: reto actual para la salud pública cubana. **Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río**, vol. 16, n. 3, p. 82-94, 2012.

POTTORF, R. S.; PLAYER, M. R. Process technologies for purity enhancement of large discovery libraries. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, vol.7, n.6, p.777-83, 2004.

PRINCE, K. A. **Determinação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

PRINCE, K. A.; SORDI, R.; PAVAN, F. R.; SANTOS, A. C. B; ARAUJO, A. R.; LEITE, S. R. A.; LEITE, C. Q. F. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of fungus *Phomopsis stipata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 43, n. 1, p. 224-229, 2012.

QIAO, N. Y.; JI, N. Y.; LIU, X. H.; LI, K.; ZHU, Q. M.; XUE, Q. Z. Indoloditerpenes from an algal isolate of *Aspergillus oryzae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 20, n. 19, p. 5677-5680, 2010.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Biotechnology**, vol.1, n. 1, p. 17-20, 1985.

RAIMUNDO, S. M.; YANG, H. M.; ENGEL, A. B.; BASSANEZI, R. C. An approach to estimating the transmission coefficients for AIDS and for Tuberculosis. **Systems Analysis Modelling Simulation**, vol. 43, n. 4, p. 423-442, 2003.

REMENTERIA, A.; LOPEZ-MOLINA, N.; LUDWIG, A.; VIVANCO, A. B.; BIKANDI, J.; PONTON, J.; GARAIZAR, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista Iberoamericana de Micología**, vol 22, n. 1, p. 1-23, 2005.

RICARDO, S. B. Emergência de *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente na comunidade. **Prática Hospitalar**, vol. 34, n. 1, p. 131-133, 2004.

ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, vol. 36, n. 4, p. 525-532, 2002.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, vol. 47, n. 1, p.13-20, 2009.

SAMSON, R. A.; VARGA, J.; MEIJER, M.; FRISVAD, J. C. New taxa in *Aspergillus* section Usti. **Studies in Mycology**, vol. 69, n. 1, p. 81-97, 2011.

SBPT (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia). III Diretrizes para Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol. 35, n. 10, p.1018-1048, 2009.

SCHABERLE, F. A.; SILVA N. C. **Introdução à física da radioterapia**. 2000. Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <<http://www.fsc.ufsc.br/~canzian/introtrt/efeitos.html>>. Acesso em: 07 fev. 2014.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 59, n. 1, p. 426-435, 2002.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, vol. 22, n. 1, p. 1185-1195, 2006.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Multidrug-resistant tuberculosis. **Indian Journal of Medicine Reserch**, vol. 120, n. 1, p. 354-376, 2004.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). **Populações Vulneráveis – Tuberculose**. 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/743-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/12-tuberculose/11941-viajantes-tuberculose>. Acesso em: 07 mai. 2014

SINGH, S. Tuberculosis. **Current Anaesthesia & Critical Care**, vol. 15, n. 1, p. 165-171, 2004.

SINGH, A. K.; REYRAT, J. M. Laboratory Maintenance of *Mycobacterium smegmatis*. **Current Protocols in Microbiology**, vol.14, n. 1, p.10C.1.1–10C.1.12, 2009.

SLIVINSKY, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. 119 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, 2007.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 16, n. 3, p. 463-96, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. New York: John Wiley & Sons, 1997. 260 p.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos

isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**, vol. 34, n. 2, p. 185 – 195, 2004.

SOUZA, J. V. B.; LIMA, A. M.; MARTINS, E. S. J.; SALEM, J. I. Anti-micobacteriana activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10. **Journal of Yeast and Fungal Research**, vol. 2, n. 3, p. 39 – 43, 2011.

SOUZA, M. V. N. Plants and fungal products with activity against tuberculosis. **The Scientific World Journal**, vol. 5, n. 1, p. 609–628, 2005.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, vol. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

STEFANI, S.; GOGLIO, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, vol. 14, n. 4, p. 19-22, 2010.

STEVENS, D. A. Aspergilose. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C.; DRAZEN, J. M.; GILL, G. N.; KOKKO, J. P.; MANDELL, G. L.; PORRUEL, D. W.; SCHAFER, A. I. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 2092-2094.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, vol. 5, n. 1, p. 535-544, 2003.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, vol. 18, n. 1, p. 448-459, 2006.

TOMODA, H.; KIM, Y. K.; NISHIDA, H.; MASUMA, R.; OMURA, S. Pyripyropenes, novel inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 2, p. 148-153, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia**. 8ª edição. Artmed: Porto Alegre, 2006. 894 p.

TRABULSI, R. L.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, R. L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 4ª edição. São Paulo: Ateneu, p. 175-182. 2005.

UJVARI, S. C. **A história e suas epidemias: a convivência do homem com os micro-organismos**. Rio de Janeiro: Senac. 2003. 311 p.

WAKSMAN, S. A.; GEIGER, W. B. The nature of the antibiotic substances produced by *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Bacteriology**, vol. 47, n.4, p. 391-397, 1944.

WANG, J. F.; HUANG, Y. J.; FANG, M. J.; ZHANG, Y. J.; ZHENG, Z. H.; ZHAO, Y. F.; SU, W. J. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, vol. 34, n. 1, p. 51-57, 2002.

WATTS, K. R.; RATNAM, J.; ANG, K.; TENNEY, K.; COMPTON, J. E.; MCKERROW, J.; CREWS, P. Assessing the trypanocidal potential of natural and semi-synthetic diketopiperazines from two deep water marine-derived fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n.1, p. 2566-2574, 2010.

WENNBERG, T.; RAUHA, J. R.; H. VUORELA, H. Computer assisted scale up from analytical HPLC to preparative MPLC for the separation of phenolic compound. **Chromatographia Supplement**, vol. 53, n. 1, p. 240-245, 2001.

WHO - World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/bitstream>>. Acesso: 25 mai 2014.

WILSON, R. W.; STEINGRUBE, V. A.; BOTTGER, E. C.; SPRINGER, B.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; VINCENT, V.; JOST-JUNIOR, K. C.; ZHANG, Y.; GARCIA, M. J.; CHIU, S. H.; ONYI, G. O.; ROSSMOORE, H.; NASH, D. R.; WALLACE-JUNIOR, R. J. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol.51, n. 1, p. 1751-1764, 2001.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with antimicrobial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 20, n. 3, p. 265-272, 2004.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; FLÓRIO, J. C.; SPINOSA, H. S. Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (chumbinho) em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 59, n. 5, p. 1231-1235, 2007.

ZHANG, Y.; MING LI, X.; WANG, C. Y.; WANG, B. G. A New naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN13. **Chinese Chemical Letters**, vol. 18, n. 8, p. 951-953, 2007.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, vol. 7, n. 1, p. 6-21, 2003.

ZUÑIGA, A. D. G. **Estratégia de purificação das proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina do soro de queijo**. 155p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.