



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS
POR FUNGOS DO SOLO AMAZÔNICO COM AÇÃO FRENTE
AS PRINCIPAIS BACTÉRIAS MULTIRESISTENTES

RILDO MENDES DE LIMA

MANAUS-AM

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

RILDO MENDES DE LIMA

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR
FUNGOS DO SOLO AMAZÔNICO COM AÇÃO FRENTE AS
PRINCIPAIS BACTÉRIAS MULTIRESISTENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, visando defesa para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS-AM

2016

Ficha Catalográfica

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

L732b Lima, Rildo Mendes de
Bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos do solo amazônico com ação frente as principais bactérias multirresistentes / Rildo Mendes de Lima. 2016
80 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. fungos do solo Amazônico. 2. bioprospecção de antimicrobianos. 3. bactérias multiresistentes. 4. atividade antimicrobiana. I. Souza, Prof. Dr. João Vicente Braga de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RILDO MENDES DE LIMA

**BIOPROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR
FUNGOS DO SOLO AMAZÔNICO COM AÇÃO FRENTE AS
PRINCIPAIS BACTÉRIAS MULTIRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, visando defesa para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Profa. Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

Dedico este trabalho ao meu pai,
minha mãe, meu irmão, esposa e
filho, pelo incentivo para
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre me deu forças, meus amigos, meu orientador Prof. Dr. João Vicente e nossos colaboradores, Alita Moura, Profa. Cecília e Mayte Fanchin.

Aos colegas do Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas, Dra. Tirza, Dra. Nívea, Dr. Edivar, Dra. Ana Stone, Dra. Leslieane, Ezequias, Aglae e Ivanilde.

Ao Laboratório Reunidos Ltda, Dr. Loureiro, Dr. Kleber e Dra. Mariana.

A todos os meus professores da FCF-UFAM por ajudarem na minha formação acadêmica.

A todos que estiveram comigo nesta caminhada e que torceram e acreditaram em mim, em especial à minha mãe Maria das Graças, meu pai Moysés, meu irmão Moysés, minha esposa Cristina Valéria, meu filho Rildson, Ana Cortez, Ana Karla, Silviane Pinheiro, Luciana Aires, Juliana, Kátia Cruz, Dona Lili, Prof. João Vicente, Dra. Joyce Matsuda, Profa. Aya Sadahiro, Prof. José Neto e Prof. Émerson Lima.

RESUMO

O aumento no número de bactérias resistentes a múltiplas drogas nos últimos anos, tornou-se um problema mundial, aumentando a necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos. Dentre as principais bactérias caracterizadas como multiresistentes, podemos destacar o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina (MRSA), o *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE), as enterobactérias β -lactamase de espectro estendido (ES β L) e resistente à carbapênicos (ERC), *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multi-droga resistente (MDR). Diante desse contexto, dez linhagens fúngicas pertencentes a coleção de interesse médico do Instituto de Pesquisa da Amazônia – INPA, foram utilizadas neste estudo, a fim de realizar a bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos de solo Amazônico, em virtude do grande potencial biotecnológico que esses microrganismos apresentam. Para investigar a atividade antimicrobiana, foram realizados bioprocessos para a produção do filtrado de cultura dos fungos e realizado o método de difusão em ágar. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), cromatografias em camada delgada, bioautografia e fator de retenção (Rf), foram realizados para o filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana. Para a caracterização química da fração com maior atividade antimicrobiana, foram utilizadas técnicas de fracionamento cromatográfico (cromatografia em camada delgada comparativa, extração líquido-líquido e cromatografia em coluna aberta), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). O filtrado de cultura do *Aspergillus* (H63) e do *Paecilomyces* (H59) apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, variante poço. O concentrado do filtrado do *Aspergillus* (H63) apresentou CIM de 1600 μ g/mL para o *S. aureus* (MRSA) e o *S. aureus* (selvagem). O *Paecilomyces* (H59) apresentou CIM de 800 μ g/mL para o *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* (selvagem), *Klebsiella pneumoniae* (ES β L), *K. pneumoniae* (KPC) e *Escherichia coli*

(selvagem); e de 400 µg/mL para o *A. baumannii* (OXA-23). O sistema de eluição acetato de etila/metanol (1:1 – v/v) revelou a presença de três zonas em UV 365 nm e a bioautografia determinou uma zona com atividade antimicrobiana. A fase acetato de etila apresentou atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar frente ao *S. aureus* (MRSA). O sistema diclorometano/acetato de etila (1:9) obteve as melhores eleições, que foram separadas de acordo com a similaridade, gerando as frações 3-4, 5-7 e 8. A fração 5-7, apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar frente ao *S. aureus* (MRSA) e *A. baumannii* (OXA-23). A RMN e o EM revelou uma substância com atividade antimicrobiana, sendo necessário mais estudos para elucidação de sua estrutura química e avaliação de sua atividade antimicrobiana isoladamente das demais frações. Os resultados desse trabalho indicam que a bioprospecção de substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por *Paecilomyces* (H59) é uma alternativa para a pesquisa de novos antimicrobianos frente a bactérias MDR.

Palavras-chave: Fungos do solo Amazônico, bioprospecção de antimicrobianos, bactérias multiresistentes, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

In recent years, the increase in the number of bacteria resistant to multiple drugs has become a worldwide problem, increasing the need to discover and develop new antimicrobials. Among the major bacteria characterized as multiresistant, we can highlight *Staphylococcus aureus* that is resistant to methicillin-oxacillin (MRSA), *Enterococcus* spp. vancomycin resistant (VRE), extended spectrum β -lactamase Enterobacteriaceae (ES β L) and carbapemic resistant (ERC), *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* multi-drug resistant (MDR). In view of this context, ten fungal lineages belonging to the collection of medical interest of the Institute of Amazonian Research (INPA) were used in the present study to carry out the bioprospection of antimicrobials produced by fungi of Amazonian soil, considering the great biotechnological potential of such microorganisms. In order to investigate the antimicrobial activity, bioprocesses were carried out to produce the fungal culture filtrate and the agar diffusion method was performed. The determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC), thin layer chromatography, bioautography and retention factor (Rf) were performed for the filtrate culture of the fungi that showed antimicrobial activity. For the chemical characterization of the fraction with the highest antimicrobial activity, chromatographic fractionation techniques (comparative thin-layer chromatography, liquid-liquid extraction and open-column chromatography), nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) were used. The culture filtrate of *Aspergillus* (H63) and *Paecilomyces* (H59) showed antimicrobial activity by the agar diffusion method, well variant. The *Aspergillus* (H63) filtrate concentrate had a MIC of 1600 μ g / mL for *S. aureus* (MRSA) and *S. aureus* (wild). *Paecilomyces* (H59) had MIC of 800 μ g / mL for *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* (wild), *Klebsiella pneumoniae* (ES β L), *K. pneumoniae* (KPC) and *Escherichia coli* (wild); and 400 μ g / mL for *A. baumannii* (OXA-23). The ethyl acetate / methanol (1: 1 - v / v) elution system revealed the presence of three

zones at UV 365 nm and bioautography determined an area with antimicrobial activity. The ethyl acetate phase presented antimicrobial activity by agar diffusion method against *S. aureus* (MRSA). The dichloromethane-ethyl acetate system (1: 9) obtained the best selections, which were separated according to the similarity, generating the fractions 3-4, 5-7 and 8. The fraction 5-7, presented antimicrobial activity by the agar diffusion method against *S. aureus* (MRSA) and *A. baumannii* (OXA-23). Finally, NMR and MS revealed a substance with antimicrobial activity, requiring further studies to elucidate its chemical structure and evaluation of its antimicrobial activity isolated from the other fractions. Our results indicate that the bioprospection of substances with antimicrobial activity produced by *Paecilomyces* (H59) is an alternative for the research of new antimicrobials against MDR bacteria.

Keywords: Fungi of the Amazonian soil, bioprospecting of antimicrobials, multiresistant bacteria, antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biossíntese da Penicilina pelo fungo <i>Penicillium chrysogenum</i>	33
Figura 2 - Biossíntese da Cefalosporina pelo fungo <i>Cephalosporium acremonium</i>	34
Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos que foram propostos pelo presente projeto.....	43
Figura 4 – Distribuição na placa de microdiluição.....	48
Figura 5 – Cromatografia em camada delgada revelada em UV a 365 nm e bioautografia de contado do concentrado de filtrado do <i>Paecilomyces</i> (H59) frente ao <i>S. aureus</i> (MRSA), mostrando a zona de atividade antimicrobiana e os valores do fator de retenção (Rf). Sistema de solventes: Hexano (a); Hexano/acetato de etila (1:1) (b); Acetato de etila (c); Acetato de etila/metanol (1:1) (d); e Metanol (e). HEX: hexano; ACE: acetato de etila; MET: metanol..	57
Figura 6 – Resultado da atividade antimicrobiana da fase hidrometanólica (M-A) e AcOEt (Act) pelo método de difusão em ágar, por disco de difusão (formação do halo de inibição em mm), do concentrado do filtrado de <i>Paecilomyces</i> (H59) frente a cepa de <i>S. aureus</i> (MRSA) e controles positivos (CP) com disco comercial de vancomicina 30 µg.	58
Figura 7 - Cromatografia em camada delgada comparativa do concentrado do filtrado de <i>Paecilomyces</i> (H59) com o sistema de solventes diclorometano (DCM)/acetato de etila (AcOEt), revelada com Sulfato cérico (a) e anisaldeído sulfúrico (b) mostrando os três grupos de frações separadas. Grupo A (frações 3-4), grupo B (frações 5-7) e grupo C (fração 8).....	59
Figura 8 - Resultado da atividade antimicrobiana da fração 5-7 pelo método de disco difusão em ágar, por disco de difusão (formação do halo de inibição em mm), frente as cepas: (a) <i>A.</i> <i>baumannii</i> OXA-23 com controle positivo (CP) de gentamicina 10 µg; e (b) <i>S. aureus</i> (MRSA) com controle positivo (CP) de vancomicina 30 µg. CN - Controle negativo: discos estéreis sem antimicrobianos.	61

TABELAS

Tabela 1 - Resultados do <i>screening</i> do filtrado de fungos isolados do solo Amazônico pelo método de difusão em ágar, variante poço, formação do halo de inibição (em mm), controles positivos (CP) e controles negativos (CN) com discos comerciais.	54
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) do concentrado do filtrado de <i>Aspergillus</i> (H63) e <i>Paecilomyces</i> (H59) isolados do solo Amazônico com atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo e controles positivos com antimicrobianos comerciais.	55
Tabela 3 - Análise por cromatografia em camada delgada e bioautografia de contato do concentrado de filtrado do <i>Paecilomyces</i> (H59) frente ao <i>S. aureus</i> (MRSA) com os sistemas de solventes utilizados na fase móvel e valores de R _f das zonas com atividade antimicrobiana.	56
Tabela 4 - Dados de RMN de δ _C , δ _H e HMBC de C ₁₄ H ₁₂ O ₄ em DMSO-d ₆ , obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do <i>Paecilomyces</i> (H59).	60
Tabela 5 - Resultado da atividade antimicrobiana da fração 5-7 pelo método de difusão em ágar, disco de difusão (formação do halo de inibição em mm), frente a cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) e <i>Acinetobacter baumannii</i> OXA-23, controle positivo (CP) com disco comercial de vancomicina 30 µg e gentamicina 10 µg. Para controle negativo (CN), foram utilizados discos estéreis sem antimicrobianos.	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

^{13}C	Carbono treze
^1H	Hidrogênio
AcOEt	Acetato de Etila
AmpC	β -lactamase do tipo AmpC
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIP	Ciprofloxacina
CLL	Cromatografia líquido-líquido (partição)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Mueller-Hinton
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
DMC	Diclorometano
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO-d_6	Dimetilsufóxido deuterado
D-α-AAA-APA	Penicilina N
EM	Espectrometria de massas
EsβL	β -lactamase de espectro estendido
GEN	Gentamicina
HMBC	Espectroscopia de correlação heteronuclear de Múltiplos Quanta
HSQC	Espectroscopia de correlação heteronuclear de Múltiplos Quantum
Hz	Hertz
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
J	Constante de acoplamento

KPCs	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapênicos
L-cis	L-cisteína
LLD-tripeptídeo	L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina
L-val	L-valina
L-α-AAA	Ácido L- α -aminoadípico
L-α-AAA-APA	Isopenicilina N
MDR	multi-droga resistente
MeOH	Metanol
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina/oxacilina
MβLs	Metalo β -lactamases
OXAs	Oxacilinas
PBPs	Proteínas de ligação à penicilina
PDR	Pan-droga resistente
RMN	Ressonância magnética nuclear
SPM	São Paulo Metalo β -lactamase
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV	Ultra-violeta
VRE	<i>Enterococcus</i> spp. resistente à vancomicina
XDR	Extensamente droga resistente
Δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Necessidade de novos antimicrobianos	20
2.2	Antimicrobianos convencionalmente utilizados.....	22
2.2.1	Histórico	22
2.2.2	Classes e mecanismos de ação dos antimicrobianos	23
2.3	Resistências aos antimicrobianos.....	27
2.3.1	Resistência Natural ou Intrínseca	28
2.3.2	Resistência Adquirida.....	28
2.3.3	Principais mecanismos de resistência em bactérias Gram positivas	29
2.3.4	Principais mecanismos de resistência em bactérias Gram negativas	31
2.4	Antimicrobianos de origem fúngica	31
2.4.1	Penicilinas.....	32
2.4.2	Cefalosporinas	33
2.4.3	Pleuromutilinas.....	35
2.4.4	Ácido fusídico	35
2.5	Substâncias antimicrobianas e o metabolismo secundário	36
2.6	Trabalhos realizando triagem de produção de substâncias antimicrobianas produzidos por fungos.....	37
2.7	Bioensaios para triagem de substâncias com atividade antimicrobiana.....	38
2.7.1	Métodos de difusão.....	39
2.7.2	Métodos de diluição	40
2.7.3	Bioautografia e Cromatografia de camada delgada (CCD).....	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	Geral.....	42

3.2	Específicos.....	42
3.2.1	Investigar a atividade antimicrobiana dos filtrados das culturas dos diferentes fungos;	42
3.2.2	Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana;.....	42
3.2.3	Determinar o sistema cromatográfico e o fator de retenção (Rf) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana;	42
3.2.4	Caracterizar a fração com atividade antimicrobiana.	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Microrganismos.....	44
4.2	Procedimentos	44
4.2.1	Investigar a atividade antimicrobiana do filtrado de cultura dos fungos.....	44
4.2.2	Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana.	46
4.2.3	Determinar o sistema cromatográfico e fator de retenção (Rf) do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana	48
4.2.4	Caracterizar a fração com atividade antimicrobiana.	49
5	RESULTADOS	53
5.1	Atividade antimicrobiana do filtrado de cultura dos fungos investigados	53
5.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana.....	55
5.3	Determinação do sistema cromatográfico e fator de retenção (Rf) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana	56
5.4	Caracterização da fração com atividade antimicrobiana	57
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	APÊNDICES	73

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos tornou-se um problema mundial com consequências graves no tratamento de doenças infecciosas. O uso abusivo de antimicrobianos na medicina humana, agricultura e veterinária são formas de propiciar o surgimento de bactérias multirresistentes (SHAIKH et al., 2015). Ao longo de 75 anos, desde que os antimicrobianos foram introduzidos, várias bactérias desenvolveram resistência a antimicrobianos que eram comumente usados para combatê-las (LAXMINARAYAN et al., 2013). Fatores como, níveis crescentes de bactérias com resistência aos antimicrobianos, diminuição do número de empresas farmacêuticas envolvidas na pesquisa e desenvolvimento (P & D) de novos agentes antimicrobianos, tornam-se uma ameaça à saúde pública frente as infecções bacterianas (SONG, 2008). A resistência antimicrobiana, mesmo sendo um processo natural, tornou-se uma ameaça nas últimas décadas principalmente por duas razões: o uso abusivo de diferentes classes de antimicrobianos em maiores concentrações e o desenvolvimento limitado de novos agentes antimicrobianos para substituir aqueles que já apresentavam resistência (O'NEILL, 2016).

Dentre os principais tipos de resistências em bactérias Gram positivas, podemos destacar o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina/oxacilina (MRSA), que continua endêmico em vários hospitais do mundo e o *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE), destacando-se principalmente o *Enterococcus faecium*, apresentando resistência aos principais grupos de antimicrobianos (BRUSSELAERS; VOGELAERS; BLOT, 2011). Já nas Gram negativas, destacam-se algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, especialmente a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., com a produção de enzimas β -lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico, inativando os antimicrobianos, e ainda o grupo dos não fermentadores, a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Acinetobacter* spp., que adquiriram mecanismos

de defesa contra vários antimicrobianos (THEURETZBACHER, 2012; FAIR; TOR, 2014). Recentemente, uma pesquisa encomendada pelo governo britânico, aponta que, caso nada seja feito para impedir a propagação da resistência antimicrobiana, as mortes provocadas pelas superbactérias poderão passar das atuais 700.000 para 10 milhões de pessoas ao ano no mundo até 2050, sendo superior ao que o câncer mata atualmente (O'NEILL, 2016).

A descoberta de novos antimicrobianos contribui diretamente na melhoria da saúde humana, pois ao contrário da maioria das outras classes de medicamentos, atuam diretamente sobre outra forma de vida, a bactéria, e não em processos bioquímicos humanos. As bactérias evoluíram e desenvolveram mecanismos de proteção para reduzir a suscetibilidade aos antimicrobianos, sendo portanto inevitável a descoberta e introdução de novas classes de antimicrobianos (HÖGBERG; HEDDINI; CARS, 2010). Os fungos por serem metabolicamente muito ativos, são capazes de produzir vários metabólitos primários e secundários de interesse econômico, como peptídeos, enzimas, ácidos orgânicos, pigmentos e antimicrobianos. Devido à alta biodiversidade, a Amazônia destaca-se como um grande potencial a ser explorado na busca de microrganismos com características desejadas para distintas aplicações (CELESTINO et al., 2014; VALENCIA; CHAMBERGO, 2013). Dentre outras maneiras de se explorar o potencial econômico dessa biodiversidade, podemos destacar a bioprospecção, que consiste na busca sistemática por organismos, genes, produtos ativos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que eventualmente possam levar ao desenvolvimento de um produto, sendo relevante para vários setores e atividades, como biotecnologia, indústria farmacêutica e cosméticos, dentre outros (JUNIOR, 2010). Esse tipo de pesquisa foi pouco realizado na floresta amazônica e podem resultar em novas substâncias com atividade antimicrobiana.

Novos antimicrobianos com atividade frente a bactérias multirresistentes são muito necessários nesse momento. Essas substâncias serão alternativas terapêuticas para infecções

que muitas vezes tem sido considerada como sem tratamento. Pacientes, médicos e a indústria farmacêutica possuem grande interesse nessa abordagem.

Frente a essas colocações, o presente trabalho pretende investigar a bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos isolados do solo Amazônico com ação frente as principais bactérias multirresistentes, visando contribuir para a pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias com atividade antimicrobiana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Necessidade de novos antimicrobianos

Enquanto houve uma acentuada diminuição na descoberta de novos agentes antimicrobianos os últimos 30 anos, devido à falta de pesquisa e desenvolvimento por parte de grandes empresas farmacêuticas, a taxa de bactérias MDR teve um aumento alarmante no planeta, tornando-se um grave problema mundial com consequências no tratamento de doenças infecciosas (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; SHAIKH et al., 2015).

A resistência bacteriana é consequência da evolução das bactérias e se agravou com a facilidade da mobilidade das pessoas em viagens internacionais, aumento da população mundial, o mau uso na medicina humana, agricultura e veterinária, e ainda, a constante perda da eficácia e a diminuição na descoberta de novos agentes antimicrobianos (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; THEURETZBACHER, 2012).

Nos anos 1980 e 1990, muitas empresas farmacêuticas tiveram seus programas de investigação para novos agentes antimicrobianos voltados para áreas mais lucrativas, sendo direcionados para bactérias Gram positivas, devido a rápida ascensão do *S. aureus* (MRSA) e *Enterococcus* spp. (VRE). Nos últimos anos, o aumento de bactérias Gram negativas MDR, intensificou a busca de novos antimicrobianos, tornando-se um bom retorno financeiro para as empresas farmacêuticas (THEURETZBACHER, 2009). Há um consenso internacional que, para combater as bactérias Gram negativas MDR, há uma necessidade enorme de novos antimicrobianos (O'NEILL, 2016).

A diminuição de novos antimicrobianos aprovados no mercado americano, apenas cinco entre 2003 e 2007, levou a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) a propor um

compromisso global de desenvolver no mínimo 10 novos antimicrobianos até 2020 (MOELLERING, 2011). Dentre as várias razões para a diminuição do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos pelas empresas farmacêuticas, está o fato de que a maioria dos alvos já foram descobertos, além de ser menos rentável, pois o modelo de negócio era voltado para altos rendimentos e lucro, incompatível com o tratamento curto e limitado de doenças agudas, sendo a busca de novos produtos direcionada para doenças crônicas (neurológicas, musculoesqueléticas, cardíacas) e estilo de vida, onde o rendimento era muito mais lucrativo no mercado (THEURETZBACHER, 2009; MOELLERING, 2011).

As bactérias foram visualizadas pela primeira por volta de 1670 após a invenção do microscópio por van Leeuwenhoek. No século XIX, a relação entre bactérias e doenças foi gradualmente sendo criada e os pesquisadores começaram então a tentar buscar agentes antimicrobianos (YANLING; XIN; ZHIYUAN, 2013). Ao longo da história, começando na “era ouro” da descoberta dos antimicrobianos, várias classes surgiram e inúmeros análogos foram melhorados e disponibilizados no mercado, surgindo vários agentes durante esse período, com base em produtos naturais, que representavam recursos subutilizados (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; THEURETZBACHER, 2011).

Historicamente, o grande arsenal farmacêutico humano, se deve a produtos naturais de bactérias, fungos e plantas, compreendendo cerca de 61% de compostos anticancerígenos e 49% de anti-infecciosos, aprovados nas últimas três décadas (LUO; COBB; ZHAO, 2014). O pico do número de aprovações de novos antimicrobianos, ocorreu em meados dos anos 1980, onde a cada ano, eram introduzidos no mercado cerca de quatro novos antimicrobianos (BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014).

Algumas empresas farmacêuticas, em conjunto com vários grupos acadêmicos, estão renascendo a triagem de produtos naturais, voltados para a produção de moléculas por diferentes grupos de organismos, não apenas por *Streptomyces* do solo, mas também por

plantas, bactérias do fundo do mar e por *Actinomycetes* que colonizam formigueiros (LIVERMORE, 2011).

2.2 Antimicrobianos convencionalmente utilizados

2.2.1 Histórico

A “era ouro” da descoberta de antimicrobianos teve seu início em 1854, após a produção da anilina, um corante sintético, pelo químico francês Antoine Bérchamp, por síntese química, e posteriormente, um derivado da anilina, o atoxil (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014). No final do século XIX, Paul Ehrlich, após uma observação de que a anilina e outros corantes sintéticos, poderiam corar microrganismos específicos, mas outros não, estabeleceu o conceito “*magic bullet*”, onde os compostos químicos poderiam atuar seletivamente nos microrganismos causadores de doença e não o hospedeiro (AMINOV, 2010; YANLING; XIN; ZHIYUAN, 2013). Provavelmente, o primeiro relato na medicina humana, de tratamento com uma droga sintética, ocorreu em 1891, quando Ehrlich e Paul Guttman relataram que dois pacientes com malária tinham sido tratados com sucesso, utilizando o corante azul de metileno. Em 1905, H. W. Thomas, demonstrou que o atoxil de Bérchamp, tinha atividade contra os tripanosomas que causavam a doença do sono africana. Em 1907, Alfred Bertheim e Ehrlich, determinaram a estrutura química correta do atoxil, permitindo uma variedade de modificações estruturais. Bertheim, Ehrlich e colaboradores, começaram então a sintetizar uma variedade de compostos, que tinham como base o atoxil, contra os tripanossomas (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

Erich Hoffmann e Shaudinn, em 1909, testaram compostos contra o agente causador da sífilis, o *Treponema pallidum*, em coelhos infectados com sífilis, culminando na descoberta do Salvarsan, também conhecido como “Composto 606”, o primeiro tratamento efetivo contra a

sífilis e a primeira droga antibacteriana. Apesar de seus efeitos adversos, o Salvarsan e o seu derivado, o Neosalvarsan, foram os medicamentos mais prescritos até a chegada da penicilina na década de 1940 (AMINOV, 2010; YANLING; XIN; ZHIYUAN, 2013). Em 1932, Domagh, descobriu a atividade do corante vermelho prontosil contra estreptococos em ratos previamente infectados por estreptococos, e em uma criança com septicemia estafilocócica. Em 1935, foi lançado comercialmente o Prontosil e pesquisadores do Instituto Pasteur revelam o primeiro princípio ativo da “droga sulfa”, a sulfonilamida, que durante décadas teve mais de 5.000 variantes estruturais, e algumas foram lançadas como drogas, por exemplo a sulfapiridina, utilizada por Winston Churchill durante um surto de pneumonia em 1943 (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

Em 1928, Alexander Fleming, observou em uma placa de Petri, que um mofo contaminante estava lisando as colônias bacterianas que estavam crescendo ao redor. A conclusão de Fleming foi que o mofo estava produzindo uma substância bacteriolítica capaz de matar a bactéria. Mais tarde, a substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (antigo *Penicillium notatum*) ficou conhecida como penicilina, uma das principais descobertas científicas do século XX (KONEMAN et al., 2008). Quase uma década depois, em 1941, Howard Florey e Ernst Chain, isolaram a penicilina na forma de um pó amarelo e investigaram suas propriedades biológicas, sendo muito utilizada na II Guerra Mundial como um potente agente antimicrobiano (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

2.2.2 Classes e mecanismos de ação dos antimicrobianos

Os β -lactâmicos possuem estruturas químicas diferentes, mas apresentam em comum o anel β -lactâmico, sendo constituídos pelas penicilinas (penicilina, amoxicilina, ampicilina, meticilina, oxacilina), cefalosporinas (cefalotina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepime), monobactâmicos (aztreonam) e carbapenêmicos (ertapenem, meropenem, imipenem),

incluindo combinações de β -lactâmico com inibidor de β -lactamase (Ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulânico), e tem como alvo as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), inibindo a síntese de peptidoglicano e formação da parede celular, em bactérias susceptíveis (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; FAIR; TOR, 2014). Os principais mecanismos de resistência aos β -lactâmicos são: a diminuição de acesso e ligação as PBPs e a produção de enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico (RICE, 2012).

Os glicopeptídeos, são formados por um grande complexo de moléculas heterocíclicas. O primeiro glicopeptídeo descoberto foi a vancomicina em 1953, sendo introduzida na clínica em 1958 (FAIR; TOR, 2014). Atuam inibindo a síntese da parede celular, assim como os β -lactâmicos, mas tendo um alvo diferente, a ligação ao resíduo terminal D-alanina da cadeia de peptidoglicano (OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015; RICE, 2012). A vancomicina é ativa contra a maioria dos cocos Gram positivos, incluindo estreptococos, estafilococos e enterococos, sendo utilizada no caso de infecções graves, quando o microrganismo é resistente aos antimicrobianos de primeira escolha (MCDERMOTT; WALKER; WHITE, 2003; BECKER, 2013). A resistência resulta da substituição do terminal D-alanina por D-serina ou D-lactato, diminuindo a afinidade de ligação ao antimicrobiano (RICE, 2012). São exemplos de outros glicopeptídeos: a dalbavancina, oritavancina, teicoplanina, telavancina e ramoplanina (CLSI M100-S23, 2013).

Os macrolídeos, atuam na subunidade 50 S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas. O primeiro macrolídeo descoberto foi a eritromicina em 1949, isolada com base em caldos de cultura do actinomiceto *Saccharopolyspora erythraea* e foi introduzida na clínica em 1951 (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; PYÖRÄLÄ et al., 2014). Possuem atividade antimicrobiana contra muitas bactérias Gram positivas aeróbicas e anaeróbicas e algumas Gram negativas. O mecanismo de resistência mais comum é modificação do sítio alvo de ação dos antimicrobianos, mediada por RNAr metilases (genes *erm*), além de bombas de efluxo e

inativação dos antimicrobianos por fosforilases (genes *mph*) (PYÖRÄLÄ et al., 2014; FAIR; TOR, 2014). São exemplos de outros macrolídeos: a azitromicina, claritromicina, diritromicina, telitromicina e solitromicina (CLSI M100-S23, 2013).

A classe das lincosamidas, assim como os macrolídeos, atuam na subunidade 50 S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas. O principal representante é a clindamicina, introduzida na clínica em 1968, sendo utilizada para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivas aeróbicas e anaeróbicas, inclusive cepas de *S. aureus* MRSA, podendo ser capaz de inibir a produção de toxinas e fatores de virulência dos estafilococos. Seu principal mecanismo de resistência é a alteração no sítio alvo, mediada por RNAr metilases (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; LEWIS; JORGENSEN, 2005; PYÖRÄLÄ et al., 2014).

Os Fenicóis, também atuam na subunidade 50 S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas. O cloranfenicol foi produzido com base na cultura de *Streptomyces venezuelae*. Foi descoberto em 1946 e introduzida na clínica em 1948. Possui atividade bacteriostática de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo anaeróbios, entretanto, possui ação bactericida contra *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*. A resistência pode ocorrer pela modificação do local alvo, mediada por metilases (genes *cfc*), além de acetiltransferases e bombas de efluxo (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; LEWIS, 2013; FAIR; TOR, 2014).

As oxazolidonas, atuam na subunidade 50 S ribossomal, bloqueando as ligações peptídicas, inibindo a síntese de proteínas. O linezolid foi identificado em 1995 e aprovado pela FDA em 2000. Possui atividade contra bactérias Gram positivas, incluindo MRSA e VRE, e *Mycobacterium tuberculosis*. O mecanismo de resistência ainda é raro (FAIR; TOR, 2014). Um outro exemplo da classe das oxazolidonas é o tedizolide (CLSI M100-S23, 2013).

A classe das tetraciclinas, agem na subunidade 30 S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas. A clortetraciclina foi a primeira tetraciclina descoberta em 1945 e introduzida na

clínica em 1952. São de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. A resistência a tetraciclinas é geralmente devido a bombas de efluxo, e há relatos de inativação enzimática (FAIR; TOR, 2014; BEBELL; MUIRU, 2014). São exemplos de tetraciclinas: a doxiciclina, minociclina, tetraciclina, tigeciclina e omadaciclina (CLSI M100-S23, 2013).

Os aminoglicosídeos, assim como as tetraciclinas, agem na subunidade 30 S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas. A estreptomicina foi o primeiro aminoglicosídeo isolado em 1943, com base em uma bactéria do solo, o *Streptomyces griseus* (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014). Alguns aminoglicosídeos possuem atividade de amplo espectro para bactérias Gram negativas e Gram positivas, inclusive para o *Mycobacterium tuberculosis*. Devido apresentarem problemas de nefrotoxicidade e ototoxicidade, são geralmente utilizados quando o microrganismo é resistente aos antimicrobianos de primeiro escolha (FAIR; TOR, 2014). São exemplos de outros aminoglicosídeos: a amicacina, gentamicina, kanamicina, netilmicina, plazomicina e a tobramicina (CLSI M100-S23, 2013).

As quinolonas, agem nas topoisomerases (DNA girase e topoisomerase IV), causando relaxamento e quebra da fita de helicoidal do DNA, inibindo sua replicação. (SILVER, 2011; OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015). O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona descoberta em 1962 e seu análogo sintético, a ciprofloxacina, foi introduzida na clínica em 1968 (FAIR; TOR, 2014). A resistência as quinolonas é atribuída ao acúmulo de mutações pontuais nos genes que codificam as topoisomerases (*gyrA* ou *parK*, por exemplo), juntamente com mecanismos complementares que aumentam a resistência (RICE, 2012). São exemplos de outras quinolonas: clinafloxacina, enoxacina, finafloxacina, fleroxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, oflofloxacina, sparfloxacina, trovafloxacina e ulifloxacina (plurifloxacina) (CLSI M100-S23, 2013).

As polimixinas, se ligam a membrana celular externa de bactérias Gram negativas, alterando a permeabilidade da membrana e levando a morte celular (CASSIR; ROLAIN;

BROUQUI, 2014). As polimixinas A-E foram descobertas originalmente em 1947 e a colistina (polimixina E) foi introduzida no mercado desde 1950. Devido apresentarem neurotoxicidade e nefrotoxicidade foram pouco utilizadas no passado, entretanto, a polimixina B e a colistina estão sendo utilizadas como antimicrobianos de último recurso contra bactérias MDR, além de possuir atividade antimicrobiana de amplo espectro contra a maioria das bactérias Gram negativas (FAIR; TOR, 2014).

A fosfomicina, da classe das fosfomicinas, foi identificada pela primeira vez na Espanha em 1969 por fermentação de cepas de *Streptomyces spp.* em vários caldos. Agem impedindo a formação do ácido N-acetilmurânico, um precursor essencial para a síntese da parede celular bacteriana. Possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro, com efeitos bactericidas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (CASSIR; ROLAIN; BROUQUI, 2014).

A nitrofurantoína, da classe dos nitrofuranos, é um antimicrobiano sintético derivado, com base no furano (composto orgânico), pela adição de um grupo nitro e uma cadeia lateral contendo hidantoína, sendo introduzida na prática clínica em 1952. Possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro contra vários patógenos urinários Gram negativos e Gram positivos, e também foi demonstrado atividade contra enterobactérias produtoras de ESβL e enterococos (VRE) (CASSIR; ROLAIN; BROUQUI, 2014).

O trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP/SMX), possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro e foram introduzidos na clínica em 1970. O trimetoprim atua inibindo a tetraidrofolato redutase, e o sulfametoxazol faz um segundo bloqueio na biossíntese do folato. Em altas dosagens, são uma alternativa aceitável contra infecções por MRSA (CASSIR; ROLAIN; BROUQUI, 2014).

2.3 Resistências aos antimicrobianos

O desenvolvimento da resistência bacteriana é processo evolutivo normal para esses microrganismos, mas é acelerado devido a pressão seletiva exercida pela utilização exagerada de antimicrobianos (WHO, 2014). Em 1946, Alexander Fleming em seu discurso no Prêmio Nobel, já previa que as bactérias, em circunstâncias adequadas, poderiam adquirir resistência aos antimicrobianos. Sabe-se que a resistência antimicrobiana surgiu apenas alguns anos depois da introdução dos agentes antimicrobianos e que está positivamente correlacionada ao seu uso na prática clínica (YANLING; XIN; ZHIYUAN, 2013).

2.3.1 Resistência Natural ou Intrínseca

É a resistência antimicrobiana inerente ou inata, encontrada no genoma de todos ou quase todos os membros de uma espécie, que não depende da pressão seletiva do antimicrobiano e nem ocorre por transferência horizontal de genes, sendo desnecessário os testes de sensibilidade. Podemos citar alguns exemplos, como: *K. pneumoniae* resistente a ampicilina e ticarcilina; *Staphylococcus saprophyticus* resistente a novobiocina, fosfomicina e ácido fusídico; e *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus* resistente à vancomicina (CLSI M100-S23, 2013). É um fenômeno natural que se baseia em um fundamento molecular, a presença de uma membrana externa em bactérias Gram negativas, que impedem a entrada de várias moléculas na célula bacteriana e a expressão de numerosas bombas de efluxo, que diminuem a concentração do antimicrobianos no interior da célula bacteriana (COX; WRIGHT, 2013).

2.3.2 Resistência Adquirida

A resistência adquirida pode ser obtida mediante mutações espontâneas ou por meio da aquisição de material genético com base em outras bactérias. Os principais mecanismos são: a) alteração no sítio alvo de ligação do antimicrobiano; b) bombas de efluxo, que diminuem a concentração intracelular do antimicrobiano; c) produção de enzimas, que inativam os antimicrobianos; d) alteração na permeabilidade celular, com a perda ou alteração nos canais de porina, limitando a entrada dos antimicrobianos (OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015).

Definições foram criadas para facilitar a classificação de vários perfis de resistência antimicrobiana em bactérias frequentemente encontrados nos serviços de saúde (por exemplo: *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, Enterobactérias, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*). Usando essa classificação, uma bactéria MDR (Multi-droga resistente), é definida como resistente a um ou mais agentes em três ou mais classes de antimicrobianos; XDR (Extensamente droga resistente), é definida como resistente a um ou mais agentes em quase todas as classes (exceto uma ou duas classes); e PDR (Pan-droga resistente), é definida como resistente a todos os agentes em todas as classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2011). Embora o problema de resistência a antimicrobianos esteja associado a uma variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, as descrições se voltam a um número limitado como sendo as mais importantes, devido a alta prevalência e resistência a múltiplas drogas. Entre as principais bactérias Gram positivas resistentes a antimicrobianos, podemos destacar o *S. aureus* (MRSA) e *Enterococcus spp.* (VRE). Nas bactérias Gram negativas, a resistência é principalmente devido a β -lactamases e ERC em enterobactérias, e em *P. aeruginosa* e *A. baumannii* MDR (BRUSSELAERS; VOGELAERS; BLOT, 2011; HÖGBERG; HEDDINI; CARS, 2010).

2.3.3 Principais mecanismos de resistência em bactérias Gram positivas

A resistência do *S. aureus* (MRSA) é mediada pela proteína de ligação a penicilina 2A (PBP 2A), que diminui a afinidade de ligação ao sítio alvo para a maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos e continua endêmica em vários hospitais do mundo e de difícil erradicação, apesar do crescente aumento de bactérias Gram negativas MDR. Os principais fatores de risco para colonização e infecção ocorrem principalmente devido à contaminação cruzada, permanência prolongada de internação, utilização de dispositivos intravasculares, feridas cirúrgicas e tratamento prévio ou prolongado com antimicrobianos, dentre outros. A vancomicina é o antimicrobiano de escolha utilizado para tratamento, devido à alta resistência a outros β -lactâmicos, mas devido à transmissão plasmidial da resistência do *Enterococcus* spp. (VRE) para alguns isolados de *S. aureus*, houve uma diminuição de suscetibilidade a esse antimicrobiano (BRUSSELAERS; VOGELAERS; BLOT, 2011; OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015).

Os enterococos possuem uma resistência relativa aos antimicrobianos β -lactâmicos, por meio da proteína de ligação a penicilina 5 (PBP 5), que diminui a afinidade de ligação ao sítio alvo, além disso possuem também resistência intrínseca a aminoglicosídeos, lincosamidas e sulfametoxazol-trimetoprim. Em virtude da transmissão de genes de resistência através de plasmídeos para outras espécies, o *Enterococcus* spp. estão entre as principais causas de infecções hospitalares. A taxa de resistência à vancomicina, difere entre as espécies de enterococos, sendo mais elevada no *Enterococcus faecium*. Dentre os fatores de risco à colonização ou infecção por VRE, podemos destacar, dentre outros, o tratamento anterior com outros antimicrobianos (vancomicina, cefalosporinas de 3ª geração, clindamicina) contaminação cruzada e permanência prolongada de internação (BRUSSELAERS; VOGELAERS; BLOT, 2011; OLIPHANT; EROSCHENKO, 2015).

2.3.4 Principais mecanismos de resistência em bactérias Gram negativas

Dentre a família das enterobactérias, destacam-se a *E. coli*, *Klebsiella* spp. e o *Enterobacter* spp., sendo que o principal mecanismo de resistência bacteriana ocorre pela produção de enzimas β -lactamases, que possuem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico inativando os antimicrobianos. Segundo o sistema de classificação de Ambler, essas enzimas são divididas em quatro classes: a classe A (KPCs e a maioria da ES β LS) possui muitas enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, a classe B (M β LS) utilizam cátions divalentes, como o zinco, para inativar carbapenêmicos, mas não possuem atividade contra aztreonam e monobactâmicos, a classe C (AmpC β -lactamases) inativa preferencialmente cefalosporinas, mas não possuem atividade contra carbapenêmicos, e a classe D (OXAs) que hidrolisa que hidrolisa cefalosporinas e aztreonam, sendo comumente encontrada no gênero *Acinetobacter* spp.. Uma outra bactéria do grupo dos não fermentadores, a *P. aeruginosa*, comumente apresenta resistência a múltiplas drogas, limitando as opções de tratamento terapêutico, mostrando um notável mecanismo de defesa contra vários antimicrobianos (FAIR; TOR, 2014; THEURETZBACHER, 2012).

2.4 Antimicrobianos de origem fúngica

Os antimicrobianos utilizados na clínica médica podem ser obtidos com base em três categorias distintas: antimicrobianos semi-sintéticos (síntese química, utilizando como material prima o produto natural), antimicrobianos sintéticos (síntese química totalmente sintética) e os antimicrobianos naturais (fermentação de bactérias ou fungos). Os principais antimicrobianos produzidos por fungos são: as penicilinas, cefalosporinas, pleuromutilinas e o ácido fusídico (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

2.4.1 Penicilinas

Após a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, técnicas de fermentação para aumentar sua produção em massa foram implementadas, com o intuito de salvar vidas, enquanto que a tentativa de sua síntese química por inúmeros químicos e grandes laboratórios, não obteve sucesso. A primeira elucidação de um composto β -lactâmico, ocorreu em 1945, quando Hodgkin e Low analisaram sua estrutura por cristalografia de raio-X (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; BRAKHAGE, 1998).

O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), composto descoberto por John Sheehan e colaboradores, em 1958, constituído por um anel de tiazolidina condensado a um anel β -lactâmico, forma a estrutura base das penicilinas, que podem ser: Naturais, Biossintéticas e Semi-sintéticas (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014) (NIGAM; SINGH, 2014). São antimicrobianos β -lactâmicos, produzidas com base no *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* e *Cephalosporium acremonium*, possui atividade contra bactérias Gram positivas (NIGAM; SINGH, 2014; BRAKHAGE, 1998).

Na biossíntese da penicilina com base no *Penicillium chrysogenum* (figura 1), a formação do anel β -lactâmico-tiazolidina inicia-se pela L-cisteína e L-valina, em um processo não ribossomal, por meio de um produto dipeptídico, composto do ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA) e L-cisteína, o α -AAA-cys (ácido α -aminoadípico-cisteína). Em seguida a L-valina é adicionada por uma reação de epimerização, resultando em um composto tripeptídico, o L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (LLD-tripeptídeo). O primeiro produto resultante da ciclização do LLD-tripeptídeo é a isopenicilina N (L- α -AAA-APA), que é o primeiro composto intermediário bioativo da via das penicilinas e cefalosporinas, apesar de baixa atividade antimicrobiana. Na etapa seguinte, a troca do L- α -AAA pelo ácido fenilacético ativado,

catalizada pela enzima penicilina transacetilase, dá origem a benzilpenicilina (penicilina G) (NIGAM; SINGH, 2014; BRAKHAGE, 1998).

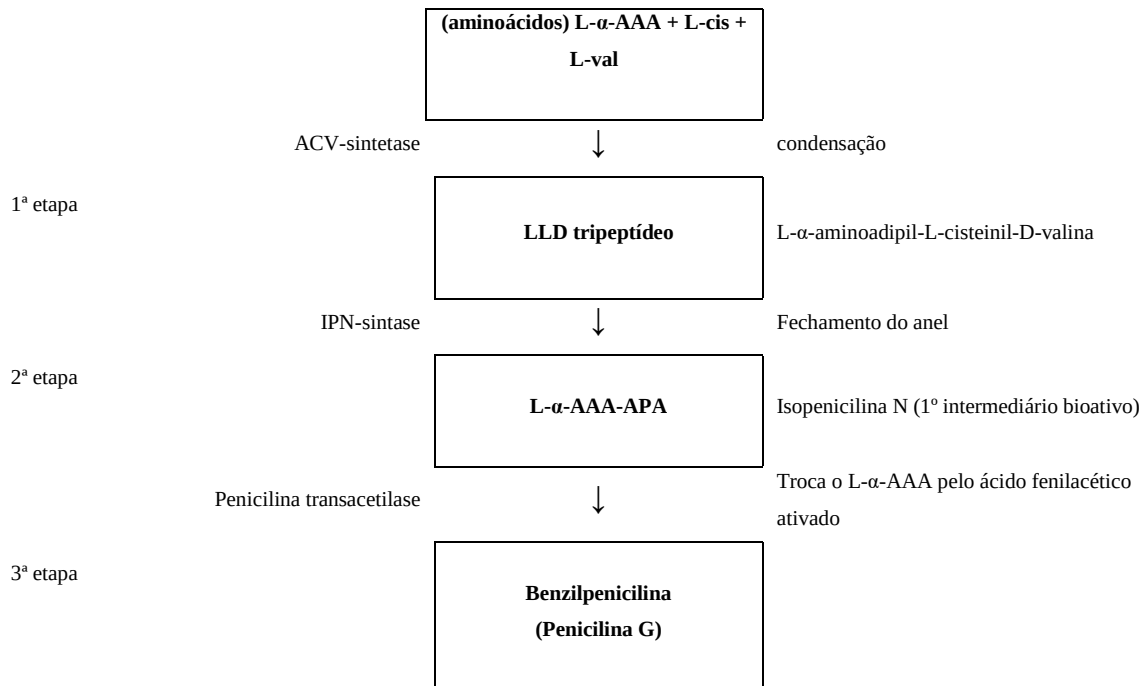


Figura 1 - Biossíntese da Penicilina pelo fungo *Penicillium chrysogenum*.
FONTE: Adaptado (NIGAM; SINGH, 2014) (BRAKHAGE, 1998).

2.4.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas foram descobertas em 1948, por Giuseppe Brotzu, da Universidade de Cagliari (Itália), estudando os microrganismos presentes na saída de um tubo de esgoto, descobrindo que as cepas de *Cephalosporium acremonium* possuíam uma ou mais substâncias que eram antagônicas às bactérias, mas este fungo utilizado primeiramente para a produção de penicilina N. Em 1955, os químicos Edward Abraham e Guy Newton, conseguiram purificar a cefalosporina C com base na cultura do *Cephalosporium* (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; BRAKHAGE, 1998). São antimicrobianos β-lactâmicos produzidos com base nos fungos

Cephalosporium acremonium (*Acremonium chrysogenum*), *Emericellopsis* e *Paecilomyces* spp., possuem atividade de amplo espectro (NIGAM; SINGH, 2014; BRAKHAGE, 1998).

Na biossíntese da cefalosporinas (figura 2), assim como das penicilinas, segue a formação do tripeptídeo L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (LLD) para isopenicilina N (L- α -AAA-APA). Na etapa seguinte, ocorre a produção de seu enantiômero, a penicilina N (D- α -AAA-APA) pela ação da enzima racemase lábil. A expandase promove a expansão do anel, formando a deacetoxicefalosporina C. Em seguida, ocorre a hidroxilação pela dioxigenase, originando o deacetylcefalosporina C, tendo como ponto final da via do fungo a acetilação da cefalosporina C por uma transferase acetil-CoA-dependente (NIGAM; SINGH, 2014) (BRAKHAGE, 1998).

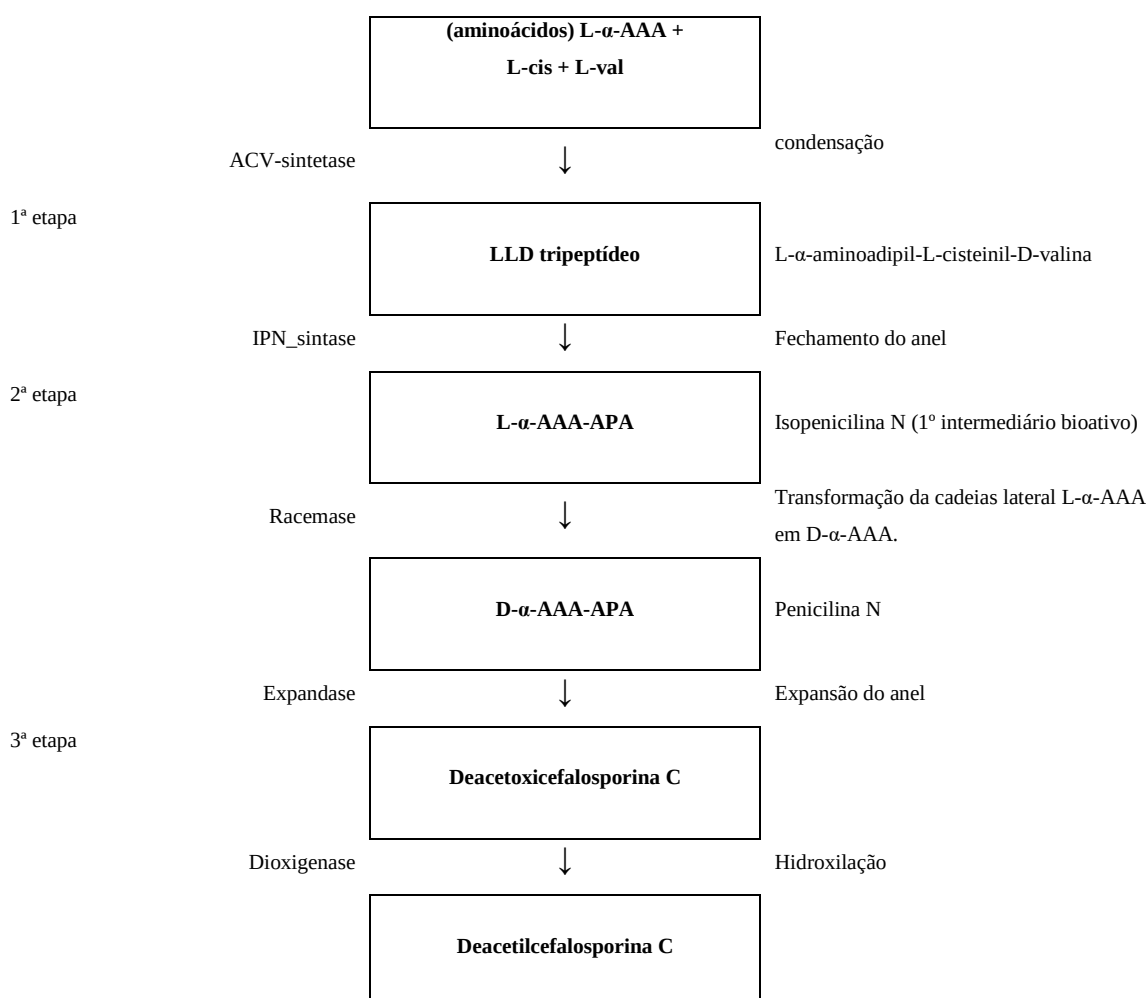


Figura 2 - Biossíntese da Cefalosporina pelo fungo *Cephalosporium acremonium*
Fonte: Adaptado (NIGAM; SINGH, 2014; BRAKHAGE, 1998).

2.4.3 Pleuromutilinas

A pleuromutilina, um metabólito secundário fúngico, produzida por um basidiomiceto, foi isolado pela primeira vez em 1951 por Kavanagh e colaboradores, em uma triagem para compostos com atividade antimicrobiana (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; FAZAKERLEY; HELM; PROCTER, 2013). Produzida com base nos fungos *Pleurotus mutilus* e *P. passeckerianus*, possui atividade contra bactérias Gram positivas, sendo eficaz contra várias formas micoplasmas. Atuam se ligando a subunidade 50S ribossomal, inibindo a síntese de proteínas (NIGAM; SINGH, 2014; WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

A preparação de mais de 66 derivados semi-sintéticos da pleuromutilina, resultou na tiamulina (Denegard®) com atividade antimicrobiana superior contra bactérias Gram positivas e micoplasma, além da retapamulina (Altabax®) (NIGAM; SINGH, 2014; FAZAKERLEY; HELM; PROCTER, 2013).

2.4.4 Ácido fusídico

O ácido fusídico foi isolada pela primeira vez em 1960, com base nos fungos *Fusidium coccineum* (Moniliaceae) ou *Acremonium fusidioides*. Possui atividade contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e anaeróbicos, tais como, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Corinebacteria* spp., *Nocardia* spp., *Neisseria* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, dentre outras. No entanto seu uso é quase que exclusivamente no tratamento de infecções por estafilococos em associação com outro antimicrobiano, devido a possibilidade do surgimento de resistência na monoterapia (NIGAM; SINGH, 2014; ELAZHARI et al., 2012). Atua inibindo a síntese de proteínas, não determinada pelos ribossomos, mas a fatores de translocação durante o processo de alongamento da cadeia peptídica (NIGAM; SINGH, 2014; FARRELL; CASTANHEIRA; CHOPRA, 2011).

2.5 Substâncias antimicrobianas e o metabolismo secundário

A produção de metabólitos secundários por bactérias e fungos, são de grande interesse para a obtenção de novos produtos biologicamente ativos, que apresentam uma variedade de atividades, e dentre elas, a antimicrobiana, além de anticâncer, antiviral e anti-inflamatória (DEBBAB et al., 2010; BHATNAGAR; KIM, 2010).

O fungo marinho, *Nigrospora* spp., produziu quatro novos metabólitos secundários, denominados de nigrospoxidons (A-C) e nigrosporapyrone, juntamente com nove compostos conhecidos. O caldo de cultura obtido, apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 25923) e contra *S. aureus* MRSA (DEBBAB et al., 2010).

O caldo de fungo, obtido de uma espécie de *Aspergillus* spp. marinho (família *Trichocomaceae*), produziu o composto denominado dehidroxichlorofusarielin B, que apresentou atividade antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), MRSA e *Staphylococcus aureus* multirresistente (DEBBAB et al., 2010)

O *Penicillium* spp. marinho, produziu dois novos metabólitos, o penicipyrone e penicilactone, juntamente com três macrolídeos conhecidos (brefeldin A, brefeldin C e 7-oxobrefeldin A). Alguns exibiram atividade antimicrobiana contra o *S. aureus* MRSA SK1 e atividade antifúngica contra o *Microsporium gypseum* SH-MU-4 (DEBBAB et al., 2010).

O caldo obtido da cultura de fungos marinhos do gênero *Exophiala* (família *Herpotrichiellaceae*), produziu os metabólitos secundários, chlorohidroaspironas A e B, que exibiu atividade antimicrobiana, de moderada a fraca, contra o MRSA e *Staphylococcus aureus* multirresistente (DEBBAB et al., 2010; BHATNAGAR; KIM, 2010).

Dois compostos isolados com base no fungo *Alternaria* spp., denominados de ácido xanalterico I e II, apresentaram fraca atividade antimicrobiana contra o *S. aureus* MRSA (DEBBAB et al., 2010).

Investigações químicas do fungo marinho *Ascochyta* spp., resultaram na descoberta do metabólito ascochyatin, que apresentou uma alta atividade antimicrobiana e especificidade contra bactérias Gram positivas e *Candida albicans* (DEBBAB et al., 2010).

O caldo obtido do fungo marinho *Cladosporium* spp., produziu nove compostos, sendo que apenas um, denominado cyclo-(Phe-Pro), apresentou melhor atividade antimicrobiana contra o *Micrococcus luteus* e *Ruegeria* spp. (DEBBAB et al., 2010).

Dos metabólitos secundários obtidos de culturas do fungo *Chaetomium* spp., denominados chaetocyclinones A, B e C, apenas a chaetocyclinone A apresentou uma atividade antifúngica (DEBBAB et al., 2010).

O dioxopiperazine, dentre outros metabólitos secundários obtidos com base em culturas do fungo marinho *Pseudallescheria* spp., apresentou boa atividade antimicrobiana contra o MRSA e *Staphylococcus aureus* multirresistente (BHATNAGAR; KIM, 2010).

A diketopiperazine (DKP), composto isolado com base na cultura do fungo *Penicillium chrysogenum*, um dos fungos endofíticos da planta de mangue *Porteresia coarctata*, apresentou atividade antimicrobiana significativa contra o *Vibrio cholerae*, comparável à da estreptomicina (DEVI et al., 2012).

2.6 Trabalhos realizando triagem de produção de substâncias antimicrobianas produzidos por fungos

Um estudo de atividade antimicrobiana utilizando 200 fungos isolados do solo, tendo como base o Parque Nacional da Serra do Cipó no Brasil, contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 25723) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), apresentou como resultado um percentual de 67% dos extratos mostrando atividade contra a pelo menos uma das bactérias testadas, utilizando o método de disco difusão. Mais de 50% (13 isolados) foram identificados com as espécies mais comuns encontradas no solo em estudo,

dentre eles, o extrato de *Penicillium esclerotiorum* produziu três metabólitos secundários bioativos (sclerotiorin, isochromophilone VI e pencolide), enquanto que o metabólito secundário identificado no extrato de *Penicillium simplicissimum* foi o ácido penicílico (TAKAHASHI et al., 2008).

Em outro estudo de atividade antimicrobiana, foram utilizados dezoito fungos endofíticos isolados com base em plantas de diferentes regiões de Japalbur na Índia, contra cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*. Dos dezoito fungos endofíticos isolados, doze produziram compostos bioativos com atividade antimicrobiana contra alguma bactéria testada e seis não apresentaram atividade, utilizando o método de disco de fusão. Quatro extratos de fungos endofíticos que produziram metabólitos secundários ativos, produziram atividade contra as cinco bactérias testadas (GUPTA et al., 2014).

Na Índia, foram utilizados 130 fungos isolados de solo tendo como base o Parque Nacional de Kaziranga, contra cepas de *Micrococcus luteus* (MTCC 2470), *Staphylococcus aureus* (MTCC 96), *S. aureus* (MLS16 MTCC 2940), *Bacillus subtilis* (MTCC 121), *Escherichia coli* (MTCC 739), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 2453), *Klebsiella planticola* (MTCC 530) e *Candida albicans* (MTCC 3017). Dos 130 isolados, 42 mostraram atividade antimicrobiana; 15 desses isolados mostraram atividade exclusivamente contra bactérias e 20 apresentaram atividade tanto contra bactérias, quanto para a *C. albicans*, e sete isolados apresentaram atividade exclusivamente contra a *C. albicans*, utilizando o método de disco difusão. Dos 42 filtrados de cultura, que apresentaram atividade antimicrobiana, cerca de 32 isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* e um isolado do gênero *Fusarium*, exibiram atividade de amplo espectro (GANESH KUMAR et al., 2010).

2.7 Bioensaios para triagem de substâncias com atividade antimicrobiana

Os métodos de triagem comumente utilizados para a detecção de substâncias com atividade antimicrobiana em produtos naturais, podem ser divididos em três grupos: (a) métodos de difusão (disco de fusão, método do cilindro e difusão em ágar); (b) métodos de diluição (diluição em ágar, macrodiluição e microdiluição); (c) bioautografia (contato, imersão e direto) (YU et al., 2010; CHOMA; GRZELAK, 2011). Os métodos de difusão e bioautografia são técnicas qualitativas, uma vez que esses métodos só irão dar uma idéia da presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Já os métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, pois irão determinar a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo (VALGAS; MACHADO, 2007).

2.7.1 Métodos de difusão

O método do disco difusão consiste em adicionar a solução ou substância a ser investigada em discos de papel filtro (cerca de 6 mm de diâmetro), aplicar os discos sobre a superfície do meio de cultura inoculado com o microrganismo teste, e após incubação, verificar se houve ou não o aparecimento da zona ou halo de inibição de crescimento do microrganismo. O método do cilindro, envolve a utilização de cilindros de porcelana ou aço inoxidável (usualmente com 8 mm x 6 mm x 10 mm), que são postos sobre a superfície do meio de cultura previamente inoculado com o microrganismo teste, e adicionar a solução ou substância a ser investigado nos cilindros. Após incubação, os cilindros são removidos, para a verificação do aparecimento de zonas ou halos de inibição de crescimento de microrganismos. No ensaio de perfuração em ágar, alguns poços (cerca de 6 mm de diâmetro) são feitos no meio de cultura inoculado com o microrganismo teste, onde a solução ou substância a ser investigado é aplicada e deixada a temperatura ambiente, antes da incubação. Em seguida é verificado se houve o

aparecimento de zonas ou halos de inibição de crescimento de microrganismos (CHOMA; GRZELAK, 2011; OSTROSKY et al., 2008).

2.7.2 Métodos de diluição

A diluição em ágar, várias concentrações da solução ou substância a ser investigada, são adicionadas na placa com meio de cultura, cada placa com uma concentração diferente, em seguida o microrganismo teste é inoculado, e após a incubação é verificado qual a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo (MIC). No ensaio de microdiluição, uma suspensão do microrganismo teste, é adicionada a uma placa com vários poços contendo diferentes concentrações da solução ou substância a ser investigada, e após a incubação é verificado o MIC. A macrodiluição utiliza o mesmo princípio da microdiluição, entretanto utiliza uma série de tubos, cada um contendo uma concentração diferente (CHOMA; GRZELAK, 2011; OSTROSKY et al., 2008).

2.7.3 Bioautografia e Cromatografia de camada delgada (CCD)

A bioautografia detecta qualitativamente a substância ou as substâncias que produziram atividade antimicrobiana contra as bactérias ou fungos testados. Na placa de CCD, as substâncias presentes na suspensão do extrato bruto são separadas, utilizando um sistema de solventes adequados, se apresentando na em forma de zonas. Pode ser utilizada diretamente com a CCD, indicando na mesma placa separação e detecção das substâncias que apresentaram atividade antimicrobiana. Na bioautografia de contato, as substâncias antimicrobianas difundem-se de uma placa de CCD para uma placa de ágar inoculado, sendo removidas após alguns minutos ou horas, para permitir a difusão, sendo em seguida incubadas e posteriormente observadas as zonas de inibição de crescimento nos locais em que as substâncias

antimicrobianas estavam em contato com o ágar. Já a bioautografia de imersão é uma combinação de contato e direta. O cromatograma é coberto com o meio ágar inoculado e após solidificação e incubação, é observado o halo de inibição de crescimento, assim como na cromatografia direta. Entre todos os métodos bioautográficos, o mais amplamente aplicado é a bioautografia direta. Uma suspensão bacteriana ou fúngica é aplicada por pulverização ou imersão em uma placa de CCD desenvolvida, e em seguida é incubada em condições úmidas, que para visualização das zonas de inibição, são utilizados sais de tetrazólio. (CHOMA; GRZELAK, 2011; DEWANJEE et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos do solo Amazônico com ação frente as principais bactérias multirresistentes.

3.2 Específicos

- 3.2.1 Investigar a atividade antimicrobiana dos filtrados das culturas dos diferentes fungos;
- 3.2.2 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana;
- 3.2.3 Determinar o sistema cromatográfico e o fator de retenção (R_f) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana;
- 3.2.4 Caracterizar a fração com atividade antimicrobiana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo possui etapas que estão descritas no fluxograma a seguir:

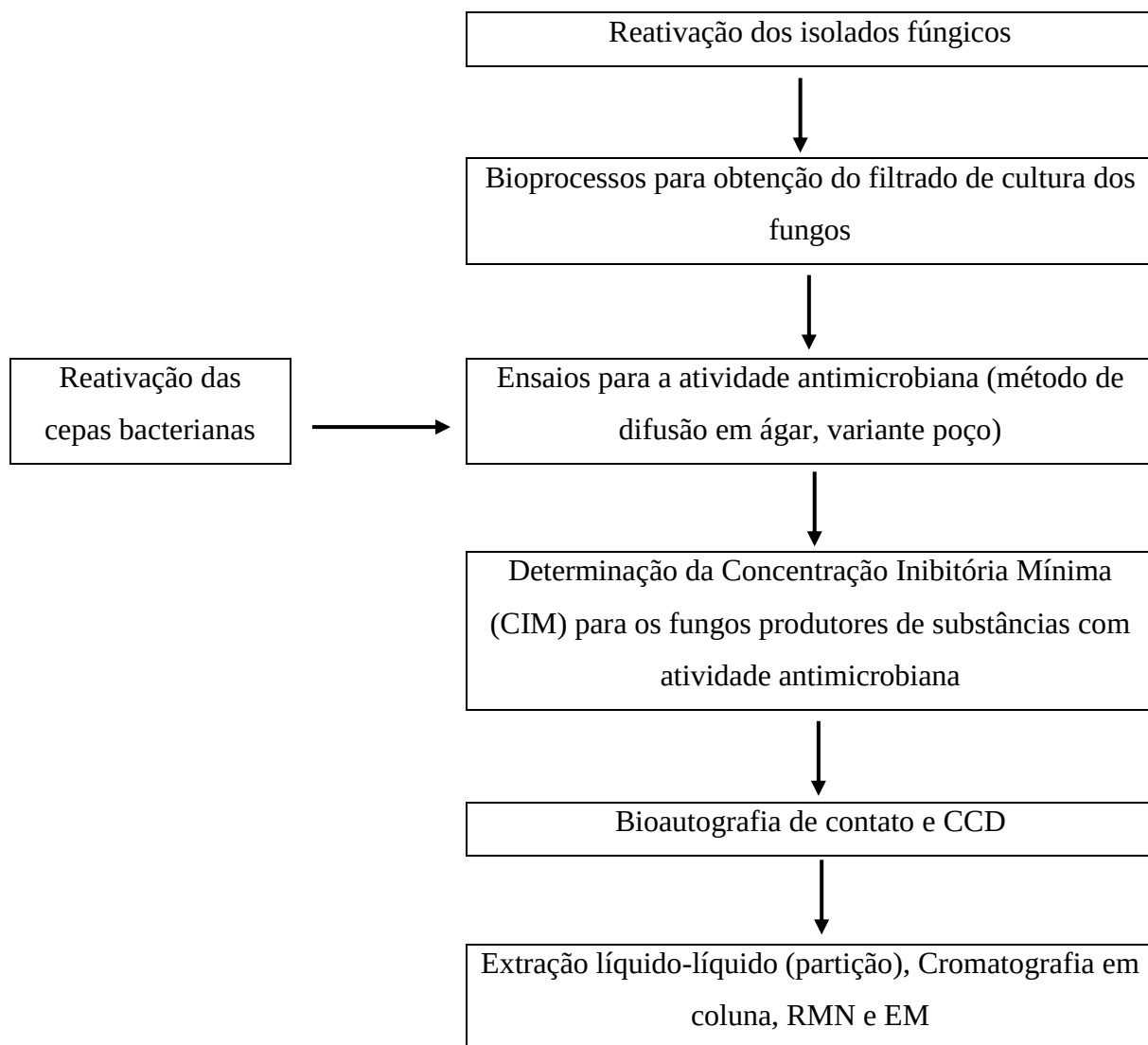


Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos que foram propostos pelo presente projeto

4.1 Microrganismos

Nos bioensaios foram utilizadas as cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (VRE), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 (KPC), *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 (1088) e *Acinetobacter baumannii* OXA-23 (1–8). Estas linhagens encontravam-se mantidas em *ependorf* com caldo BHI / glicerol a 15% v/v e congeladas à -70°C no Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas – LACEN/AM. As cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 (1088) e *Acinetobacter baumannii* OXA-23 (1–8) foram cedidas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC/ALERTA) – UNIFESP.

Foram investigados quanto a produção de substâncias antimicrobianas, os fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica pertencentes a coleção de interesse médico do Instituto de Pesquisa da Amazônia - INPA: *Aspergillus calidoustus* (4BV13), *Aspergillus* (H63), *Fusarium solani* (C1), *Fusarium subglutinas* (H30), *Paecilomyces* (H59), *Penicillium citrinum* (2AV18), *Penicillium esclerotiorum* (2AV2), *Penicillium esclerotiorum* (2AV6), *Penicillium purpurogenum* (2BV41) e *Trichoderma longibrachitum* (17H).

4.2 Procedimentos

4.2.1 Investigar a atividade antimicrobiana do filtrado de cultura dos fungos

4.2.1.1 Reativação das cepas fúngicas

Os isolados fúngicos pertencentes a coleção de interesse médico do Instituto de Pesquisa da Amazônia-INPA, foram subcultivados em tubo com ágar dextrose de batata (PDA) e incubados a temperatura de 25 °C por 7 dias para reativação das mesmas.

4.2.1.2 Bioprocessos para obtenção do filtrado de cultura dos fungos

O bioprocesso para cada fungo desse estudo foi realizado em Erlenmeyer (150 mL) contendo 50 mL do meio Sabouraud caldo (Difco™). A esse meio foi inoculado aproximadamente 1×10^4 esporos/mL dos fungos a serem investigados e incubados por 14 dias, em condições estáticas, a 25 °C. Os concentrados dos bioprocessos foram submetidos a filtração (filtro qualitativo tipo celulose Whatman n.4). O filtrado foi esterilizado por microfiltração a 0,22 µm (Millipore) e submetido aos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em ágar, variante poço, com adaptações (DE LIMA et al., 2011; SOUZA et al., 2004).

4.2.1.3 Reativação das cepas bacterianas

As cepas bacterianas Gram positivas e Gram negativas, mantidas em *ependorf* com caldo BHI / glicerol a 15% v/v e congeladas à -70 °C no Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas – LACEN, foram subcultivadas em ágar sangue de carneiro (Biomerieux®) e ágar MacConkey (Biomerieux®) e incubadas a temperatura de 35-37°C por 24 horas para a reativação das mesmas.

4.2.1.4 Determinação da atividade antimicrobiana

O método de difusão em ágar foi realizado conforme a CLSI (2012), EUA: norma M02-A11 (Padrões de Desempenho Antimicrobiano para Testes de Sensibilidade em disco), com

adaptações descritas a seguir. Foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no meio de cultura ágar Mueller-Hinton em placas de Petri, com o auxílio de um tubo de vidro estéril (6 mm x 230 mm). Para a preparação do inóculo bacteriano com turvação de 0,5 da escala de MacFarland, foi utilizado o aparelho DensiCHECK™-plus (Biomérieux®) e semeado na superfície contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia), com o uso de um swab estéril. Foram adicionadas alíquotas de 100 µL do filtrado de cultura dos fungos nos poços devidamente identificados. Para o controle positivo de formação do halo de inibição, foram utilizados discos comerciais (Laborclin) impregnados com: 30 µg de vancomicina para *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) e *faecalis* ATCC 29212; 30 µg de cefoxitina para o *S. aureus* ATCC 25923; 30 µg de teicoplanina para *E. faecalis* ATCC 51299 (VRE); 5 µg de ciprofloxacina para *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 (1088); e 10 µg de gentamicina para *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (KPC), *K. pneumoniae* ATCC 13883, *E. coli* ATCC 25922 e *A. baumannii* OXA-23. Para o controle negativo, foram utilizados discos estéreis sem antimicrobianos (Cefar).

4.2.2 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana.

Os filtrados de cultura dos fungos que apresentaram atividade antibacteriana foram liofilizados no aparelho *Wizard 2.0*, da marca *SP Scientific*, da linha *Advantage Plus* e submetidos a determinação da CIM utilizando o método de microdiluição em caldo, de acordo como descrito pela “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” – CLSI (2012), EUA: norma M7-A9 (Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico), com as modificações descritas a seguir. Os testes foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços, com fundo plano, distribuídos em oito fileiras horizontais (A-H) e doze colunas verticais (1-12). A solução estoque do filtrado de

cultura dos fungos liofilizados foi preparada na concentração inicial de 3,2 mg/mL, dissolvidos em DMSO a 10%. A suspensão bacteriana com turvação de 0,5 da escala de McFarland, ($1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$) foi preparada utilizando o aparelho DensiCHECK™-plus (Biomérieux®), em seguida foi diluída 1/10 com salina, obtendo uma diluição de aproximadamente 10^7 UFC/mL .

Foi adicionado 100 μL do meio caldo Mueller-Hinton caldo nos poços das colunas de 1 a 12, nas fileiras de A D. Na sequência foi adicionado 100 μL do concentrado do filtrado de cultura do fungo na concentração inicial de 1600 $\mu\text{g/mL}$, nos poços das colunas 1, nas fileiras de A e B (testes em duplicata). O antimicrobiano comercial com concentração inicial de 50 $\mu\text{g/mL}$, foi adicionada aos poços da coluna 1, nas fileiras C e D (testes em duplicata) com a finalidade de investigar a reprodutibilidade do ensaio. Em seguida foram realizadas diluições sucessivas com meio caldo Mueller-Hinton até a coluna onze da placa de microdiluição, com concentrações variando de 1600 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$ para concentrado do filtrado de cultura dos fungos e de 50 a 0,048 $\mu\text{g/mL}$ para os antimicrobianos comerciais, desprezando-se os últimos 100 μL da solução de diluição. Em seguida, foi adicionado 10 μL do inóculo bacteriano com uma concentração de bactérias de 10^7 UFC/mL , da primeira a décima primeira coluna. A coluna 12 foi destinada a controles internos de qualidade, sendo as fileiras de A-C para o controle positivo (crescimento de cada amostra de bactéria) e as fileiras de D-F para o controle negativo (esterilidade do meio usado na reação) (figura 3). A incubação foi realizada por 24 horas a 35-37 °C. A leitura foi realizada após o período de incubação, mediante composição visual com o controle de crescimento positivo.

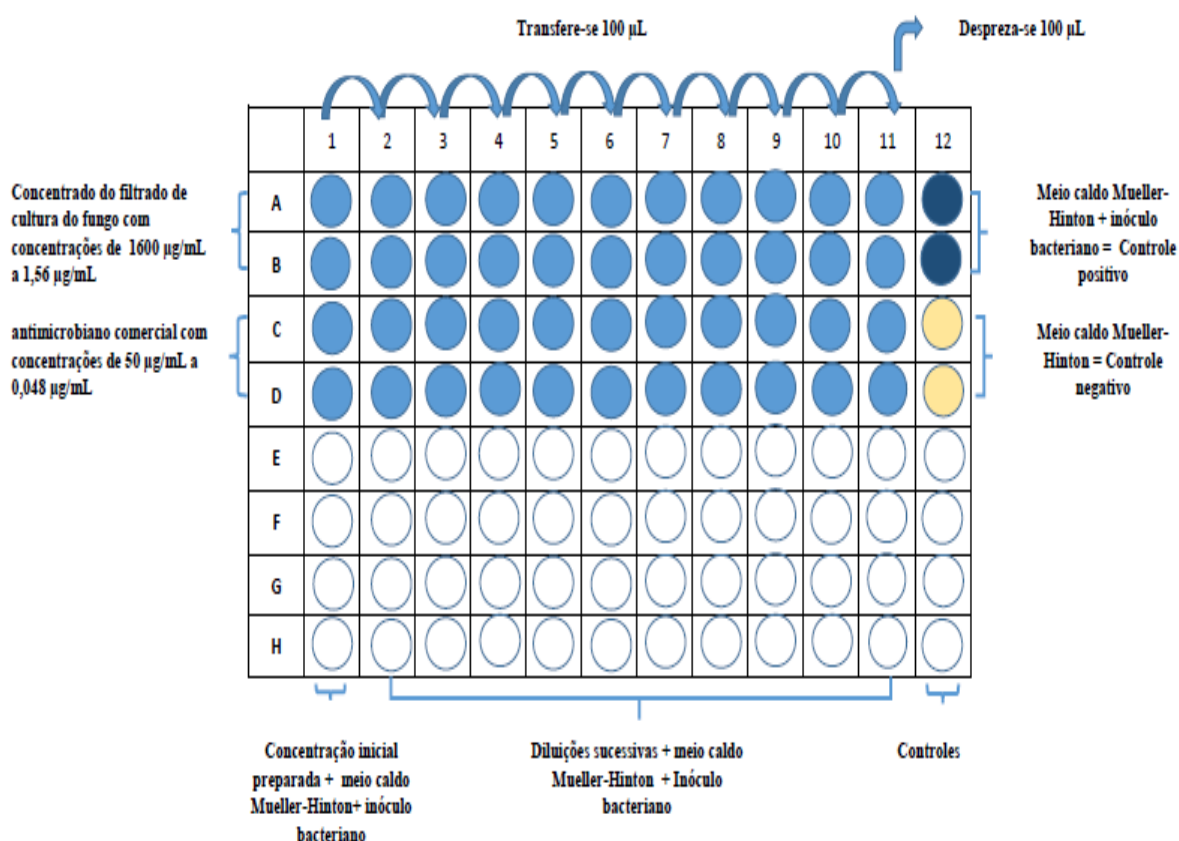


Figura 4 – Distribuição na placa de microdiluição.

FONTE: Adaptado do Laboratório de Micologia do INPA, 2015.

4.2.3 Determinar o sistema cromatográfico e fator de retenção (Rf) do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana

Para determinar o sistema cromatográfico e fator de retenção (Rf) da zona com atividade antimicrobiana, foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada em Sílica gel G60 F250 (Sigma) com superfície oposta de alumínio (5,5 cm x 1,5 cm) e a bioautografia de contato adaptada (RAJINIRAJA; JAYARAMAN, 2014). Foram aplicados 10 µL (100 mg/mL) do concentrado do filtrado de *Paecilomyces* (H59) na superfície e então desenvolvido com sistemas de solventes de diferentes polaridades: hexano 100%, hexano/acetato de etila (1:1 – v/v), acetato de etila 100%, acetato de etila/metanol (1:1 – v/v) e metanol 100%. As placas cromatográficas foram reveladas sob UV a 365 nm, e a zona com atividade antimicrobiana foi

detectado por bioautografia de contato, onde a placa de CCD foi invertida e colocada sobre a superfície do ágar MH inoculado com uma suspensão bacteriana a 0,5 da escala de MacFarland), permanecendo por 45 minutos para permitir a difusão das substâncias separadas. Em seguida a placa de CCD foi retirada e o ágar MH incubado a 35-37 °C por 24 h. O fator de retenção (Rf) da zona com atividade antimicrobiana foi calculado.

4.2.4 Caracterizar a fração com atividade antimicrobiana.

4.2.4.1 Extração líquido-líquido (partição)

Uma vez determinado o sistema cromatográfico, o concentrado do filtrado de *Paecilomyces* (H59) foi submetido preliminarmente à extração líquido-líquido (partição). Foi solubilizado 1 g em uma solução hidrometanólica (35 mL de água destilada + 25 mL de metanol) e misturado com 50 mL de acetato de etila 100%, em funil de separação, em seguida, a mistura foi agitada e deixada em repouso para obtenção de duas fases: a fase hidrometanólica e a fase acetato de etila. As fases obtidas foram recolhidas cada uma em Erlenmeyer isoladamente, sendo esse processo de renovação do solvente para extração repetido três vezes. Em seguida as fases foram concentradas em rotaevaporador e submetidas ao teste de atividade antimicrobiana utilizando o método de difusão em ágar (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4.2.4.2 Atividade antimicrobiana das fases obtidas na extração líquido-líquido (partição)

As fases foram submetidas ao método de difusão em ágar conforme a CLSI (2012), EUA: norma M02-A11 (Padrões de Desempenho Antimicrobiano para Testes de Sensibilidade

em disco), com adaptações descritas a seguir. Para a preparação do inóculo bacteriano de *Staphylococcus aureus* MRSA, com turvação de 0,5 da escala de MacFarland, foi utilizado o aparelho DensiCHECK™-plus (Biomerieux®) e semeado na superfície do ágar Mueller Hinton, com o uso de um swab estéril. Foram preparadas soluções de 1000 µg/mL de cada fase obtida e adicionadas alíquotas de 40 µL em discos estéreis sem antimicrobiano devidamente identificadas. Para o controle positivo de formação do halo de inibição, foi utilizado um disco comercial impregnado com 30 µg de vancomicina, e para o controle negativo, disco comercial sem antimicrobiano. A incubação foi realizada por 24 horas a 35-37 °C.

4.2.4.3 Cromatografia em coluna aberta

A fase que apresentou atividade antimicrobiana foi fracionada por meio de cromatografia em coluna aberta, utilizando Alumina (Sigma, Grado: Super I, tipo: WN-6: Neutro) como fase estacionária (h x Ø = 18,5 x 0.5 cm) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), na proporção 1:50 (100 mg da fração : 5g da fase estacionária) e eluída com 10 mL de diclorometano/acetato de etila (1:1), 10 mL de acetato de etila 100%, 10 mL de acetato de etila/metanol (9:1), 10 mL de acetato de etila/metanol (8:2), 10 mL de acetato de etila/metanol (7:3), 10 mL de acetato de etila/metanol (1:1) e 10 mL de metanol 100%. As frações obtidas após a evaporação dos solventes, foram submetidas a cromatografia de camada delgada comparativa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4.2.4.4 Cromatografia de camada delgada comparativa

Cada fração obtida foi solubilizada com 1 mL de acetato de etila e submetida a técnica de cromatografia de camada delgada em Sílica gel G60 F250 (Sigma) com superfície oposta de

alumínio (10 cm x 10 cm). Foram aplicados aproximadamente 10 µL na superfície em duas placas e então uma desenvolvida com 5 mL do sistema diclorometano (DCM)/acetato de etila (1:9 – v/v) e a outra com 5 mL de metanol/acetato de etila (1:9 – v/v). As placas cromatográficas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico, seguida de aquecimento a 100 °C. Posteriormente, as frações de interesse foram enviadas para a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e submetidas ao teste de atividade antimicrobiana utilizando o método de difusão em ágar.

4.2.4.5 Caracterização química

A caracterização da estrutura da substância antimicrobiana foi realizada por RMN no aparelho Bruker Fourier 300; os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. As análises por espectrometria de massas (EM) foram realizadas em aparelho micrOTOF-Q, da Bruker Daltonics. Ambas análises foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais – LTQPN do INPA.

4.2.4.6 Atividade antimicrobiana das frações combinadas de interesse

As frações de interesse foram submetidas ao método de difusão em ágar conforme a CLSI (2012), EUA: norma M02-A11 (Padrões de Desempenho Antimicrobiano para Testes de Sensibilidade em disco), com adaptações descritas a seguir. Para esse ensaio, foram utilizadas uma bactéria Gram positiva e uma Gram negativa, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) e *Acinetobacter baumannii* OXA-23 (1–8), respectivamente. Para preparação do inóculo bacteriano com turvação de 0,5 da escala de MacFarland, foi utilizado o aparelho DensiCHECKTM-plus (Biomérieux®) e semeado na superfície do ágar Mueller Hinton, com o

uso de um swab estéril. Foram preparadas soluções de 1000 µg/mL de cada fase obtida e adicionadas alíquotas de 40 µL em discos estéreis sem antimicrobiano devidamente identificadas. Para o controle positivo de formação do halo de inibição, foi utilizado um disco comercial impregnado com 30 µg de vancomicina e com 10 µg de gentamicina, para a bactéria Gram positiva e Gram negativa, respectivamente. Para o controle negativo, foi utilizado um disco comercial sem antimicrobiano. A incubação foi realizada por 24 horas a 35-37 °C.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana do filtrado de cultura dos fungos investigados

A atividade antimicrobiana de dez filtrados de cultura de fungos pertencentes à coleção de microrganismos do INPA foi avaliada frente a cepas bacterianas ATCC com e sem fenótipos de resistência. Os resultados estão expressos em valores do diâmetro do halo de inibição em mm (Tabela 1).

Como pode ser observado, o filtrado do fungo *Aspergillus* (H63) apresentou halo de inibição de 8 mm para *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) e *S. aureus* ATCC 25923. O filtrado do fungo *Paecilomyces* (H59) apresentou halo de inibição de 13 mm para *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA/ORSA positiva), 14 mm para *S. aureus* ATCC 25923, 8 mm para a *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ES β L), 12 mm para *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (KPC), 15 mm para o *A. baumannii* OXA-23 e 14 mm para a *E. coli* ATCC 25922.

Tabela 1 - Resultados do *screening* do filtrado de fungos isolados do solo Amazônico pelo método de difusão em ágar, variante poço, formação do halo de inibição (em mm), controles positivos (CP) e controles negativos (CN) com discos comerciais.

FILTRADO DE FUNGOS	Diâmetro do halo de inibição (mm)								
	BACTÉRIAS								
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 (EsβL)	<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 1705 (KPC)	<i>P. aeruginosa</i> SPM-1088	<i>A. baumannii</i> OXA-23	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)
<i>Aspergillus calidoustus</i> (4BV13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> (H63)	-	-	-	-	-	-	-	8	8
<i>Fusarium solani</i> (C1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium subglutinas</i> (H30)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> (H59)	14	-	-	8	12	-	15	14	13
<i>Penicillium citrinum</i> (2AV18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium esclerotiorum</i> (2AV2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium esclerotiorum</i> (2AV6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium purpurogenum</i> (2BV41)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma longibrachitum</i> (17H)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP - Controle positivo	GEN 23	VAN 18	TEI 16	CIP 25	GEN 20	PB 17	GEN 22	OXA 27	VAN 20
CN - Controle negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CP - Controle positivo: VAN - vancomicina (30 µg/disco), CFO - cefoxitina (30 µg/disco), TEI - teicoplanina (30 µg/disco), CIP - ciprofloxacina (5 µg/disco) e GEN - gentamicina (10 µg/disco), Polimixina B (300 unidades). CN - Controle negativo: discos estéreis sem antimicrobianos.

5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana

Com o intuito de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), o concentrado do filtrado do fungo *Aspergillus* (H63) foi testado contra duas bactérias e do fungo *Paecilomyces* (H59) foi testado contra seis bactérias (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) do concentrado do filtrado de *Aspergillus* (H63) e *Paecilomyces* (H59) isolados do solo Amazônico com atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo e controles positivos com antimicrobianos comerciais.

BACTÉRIAS	Concentrado do filtrado de fungos		CP	CN	Antimicrobianos comerciais
	<i>Aspergillus</i> (H63)	<i>Paecilomyces</i> (H59)	CMH + inóculo bacteriano	CMH	
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	1600 µg/mL	800 µg/mL	+	-	Van: 0,8 µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1600 µg/mL	800 µg/mL	+	-	Oxa: 0,2 µg/mL
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 (ESBL)	-	800 µg/mL	+	-	Cip: 0,2 µg/mL
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 1705 (KPC)	-	800 µg/mL	+	-	Gen: 1,6 µg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	800 µg/mL	+	-	Gen: 0,4 µg/mL
<i>A. baumannii</i> OXA-23	-	400 µg/mL	+	-	Gen: 1,6 µg/mL

*CP - Controle positivo (+) CN - Controle negativo (-). CMH (caldo Mueller Hinton). Antimicrobianos comerciais: Van (Vancomicina); Cip (Ciprofloxacina); Oxa (Oxacilina); e Gen (Gentamicina).

5.3 Determinação do sistema cromatográfico e fator de retenção (Rf) do concentrado do filtrado de cultura dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana

Para determinar o sistema cromatográfico foi realizada a CCD utilizando solventes e sistemas de solventes de diferentes polaridades (a – e) e para determinação do valor do Rf das substâncias de interesse foram realizadas bioautografias (Tabela 3). A figura 7 mostra os cromatogramas com os diferentes sistemas de solventes utilizados e revelados em UV a 365nm, o Rf e as zonas de inibição na bioautografia de contato. O sistema de solventes acetato de etila/metanol (1:1 – v/v) apresentou zonas de separação na placa cromatográfica revelada em UV a 365 nm e a bioautografia permitiu determinar qual apresentou atividade antimicrobiana (Rf 0,66) (Figura 5 - d).

Tabela 3 - Análise por cromatografia em camada delgada e bioautografia de contato do concentrado de filtrado do *Paecilomyces* (H59) frente ao *S. aureus* (MRSA) com os sistemas de solventes utilizados na fase móvel e valores de Rf das zonas com atividade antimicrobiana.

Tipo de detecção (UV)	Solventes e sistema de solventes (fase móvel)		Número de bandas	Valor do Rf da banda com atividade
365 nm	(a)	Hexano	1	0,00
365 nm	(b)	Hexano/acetato de etila (1:1)	2	0,20
365 nm	(c)	Acetato de etila	2	0,60
365 nm	(d)	Acetato de etila/metanol (1:1)	3	0,66
365 nm	(e)	Metanol	1	0,82

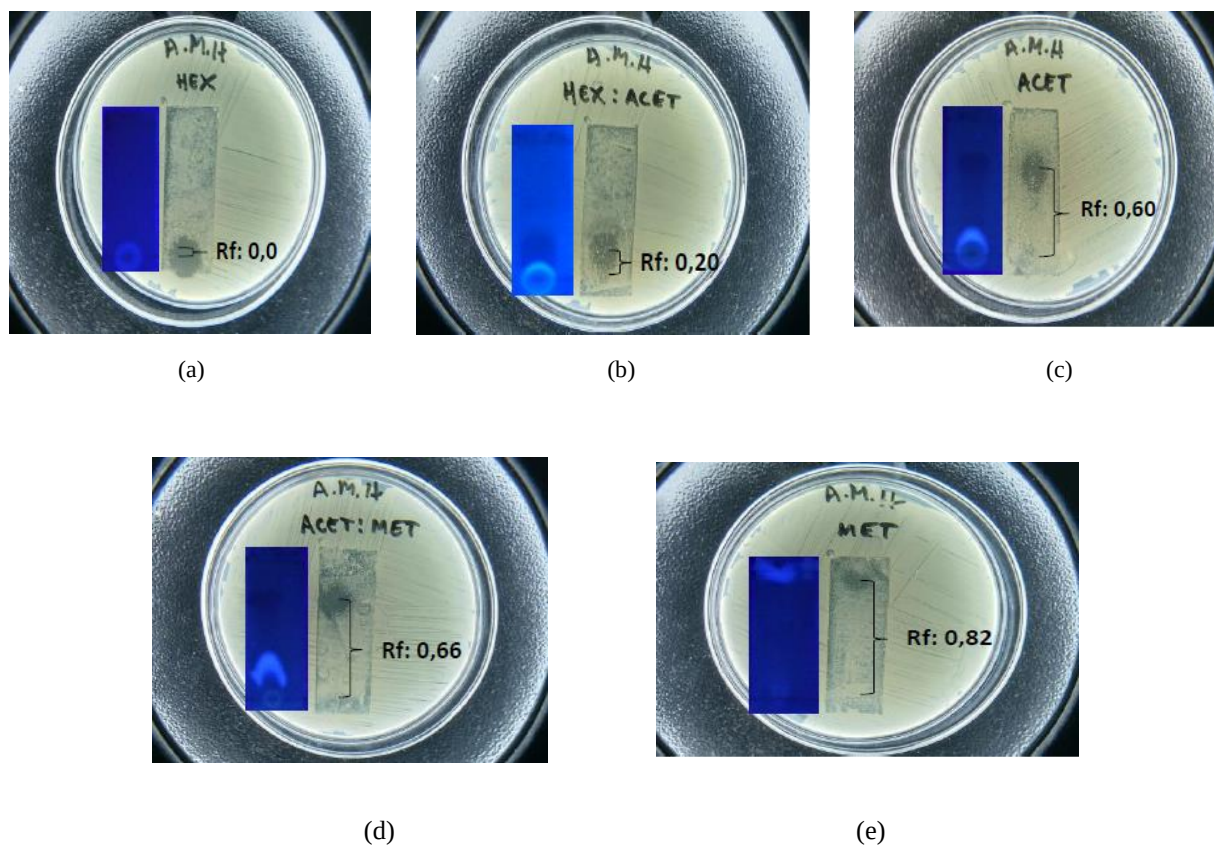


Figura 5 – Cromatografia em camada delgada revelada em UV a 365 nm e bioautografia de contato do concentrado de filtrado do *Paecilomyces* (H59) frente ao *S. aureus* (MRSA), mostrando a zona de atividade antimicrobiana e os valores do fator de retenção (Rf). Sistema de solventes: Hexano (a); Hexano/acetato de etila (1:1) (b); Acetato de etila (c); Acetato de etila/metanol (1:1) (d); e Metanol (e). HEX: hexano; ACE: acetato de etila; MET: metanol. FONTE: Próprio autor.

5.4 Caracterização da fração com atividade antimicrobiana

Para isolamento das substâncias com atividade antimicrobiana foi realizada uma extração líquido-líquido (partição) obtendo-se duas fases, a hidrometanólica e acetato de etila. Apenas a fase acetato de etila apresentou atividade antimicrobiana com halo de inibição de 11 mm frente ao *S. aureus* MRSA (figura 6).

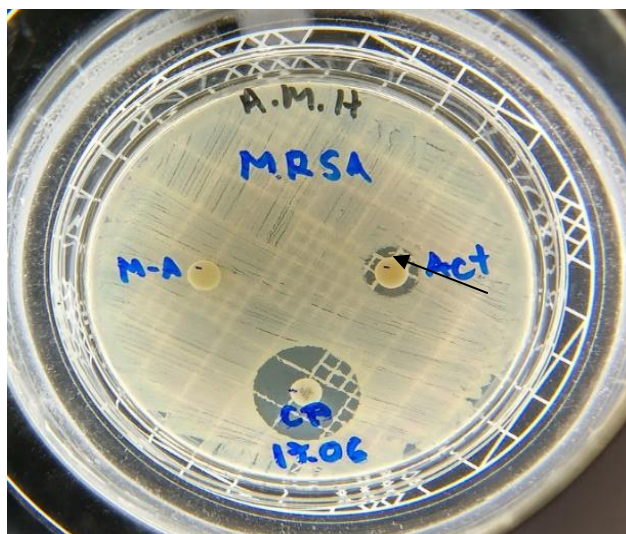


Figura 6 – Resultado da atividade antimicrobiana da fase hidrometanólica (M-A) e AcOEt (Act) pelo método de difusão em ágar, por disco de difusão (formação do halo de inibição em mm), do concentrado do filtrado de *Paecilomyces* (H59) frente a cepa de *S. aureus* (MRSA) e controles positivos (CP) com disco comercial de vancomicina 30 µg.

FONTE: Próprio autor.

Com o intuito de isolar os componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana presentes na fase acetato de etila, essa última foi submetida a cromatografia em coluna aberta desenvolvida com os sistemas diclorometano/acetato de etila (1:9 – v/v) que resultou em 9 frações (1 – 9) e com o sistema metanol/acetato de etila (1:9 – v/v) que resultou em outras 9 frações (10 – 18). As frações do sistema diclorometano/acetato de etila (1:9 – v/v) foram selecionadas para dar continuidade da investigação pois apresentaram as substâncias majoritárias, como demonstrado nas CCDs realizadas (Figura 7).

Visando investigar o potencial das frações do sistema diclorometano/acetato de etila (1:9 – v/v), as frações 3-4, 5-7 e 8 foram reunidas, de acordo com as suas similaridades na CCD (Figura 9) e então submetidas a análise de RMN de ^1H . A fração 5-7 foi a que se mostrou um componente majoritário mais isolado e os dados do RMN encontram-se na tabela 4.

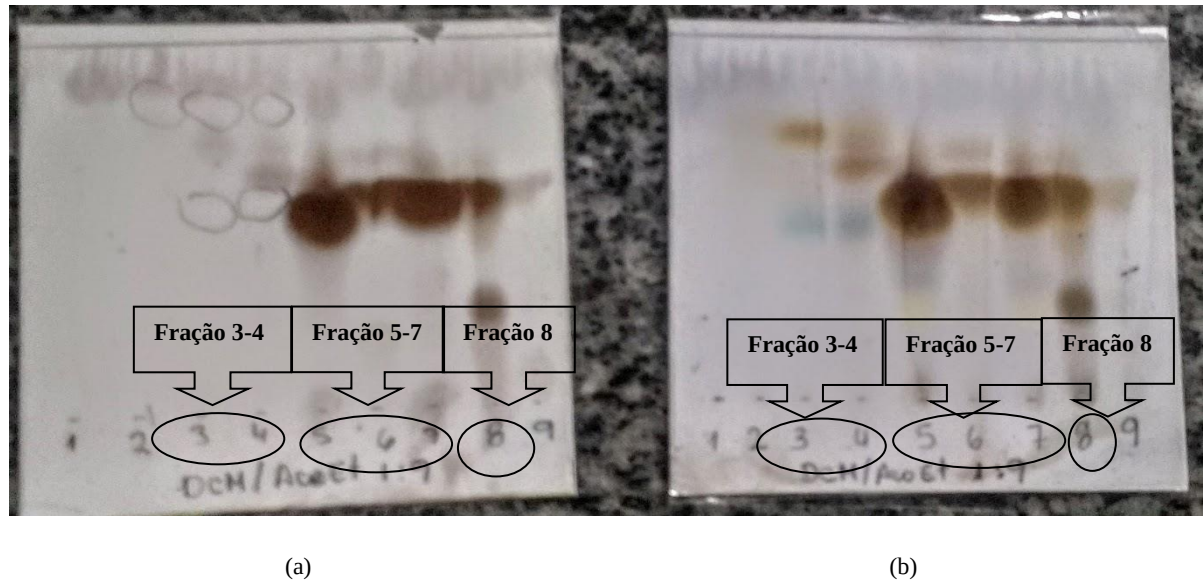


Figura 7 - Cromatografia em camada delgada comparativa do concentrado do filtrado de *Paecilomyces* (H59) com o sistema de solventes diclorometano (DCM)/acetato de etila (AcOEt), revelada com Sulfato cérico (a) e anisaldeído sulfúrico (b) mostrando os três grupos de frações separadas. Grupo A (frações 3-4), grupo B (frações 5-7) e grupo C (fração 8).

FONTE: Próprio autor.

Tabela 4 - Dados de RMN de δ_C , δ_H e HMBC de $C_{14}H_{12}O_4$ em DMSO- d_6 , obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do *Paecilomyces* (H59).

Posição	δ_C	δ_H m (J em Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
	OH	8,71 d (J= 2,8 Hz)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6
1	58,60 CH ₂	4,40 d (J= 5,3 Hz)	C-2, C-3, C-4
2	129,57 C		
3	114,31 CH	6,73 d (J= 2,8 Hz)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-7
4	146,68 C		
5	150,0 C		
6	115,42 CH	6,54 d (J= 8,47 Hz)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-7
7	113,66 CH	6,42 dd (J= 8,47; 2,8 Hz)	C-2, C-4, C-5, C-6
	OH	8,71 d (J= 2,8 Hz)	C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'
1'	58,60 CH ₂	4,40 d (J= 5,3 Hz)	C-2', C-3', C-4'
2'	129,57 C		
3'	114,31 CH	6,73 d (J= 2,8 Hz)	C-1', C-2', C-4', C-5', C-7'
4'	146,68 C		
5'	150,0 C		
6'	115,42 CH	6,54 d (J= 8,47 Hz)	C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-7'
7'	113,66 CH	6,42 dd (J= 8,47; 2,8 Hz)	C-2', C-4', C-5', C-6'

* As correlações atribuídas foram baseadas nos experimentos COSY

Com a finalidade de investigar se a fração 5-7 ainda apresentava atividade antibacteriana foi realizado o ensaio pelo método de disco de fusão. Os resultados estão descritos na tabela 5 e demonstrados na figura 8.

Tabela 5 - Resultado da atividade antimicrobiana da fração 5-7 pelo método de difusão em ágar, disco de difusão (formação do halo de inibição em mm), frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Acinetobacter baumannii* OXA-23, controle positivo (CP) com disco comercial de vancomicina 30 µg e gentamicina 10 µg. Para controle negativo (CN), foram utilizados discos estéreis sem antimicrobianos.

	Diâmetro do halo de inibição	Controle positivo (CP)	Controle negativo (CN)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	18 mm	VAN=22 mm	0 mm
<i>Acinetobacter baumannii</i> (OXA-23)	17 mm	GEN=23 mm	0 mm

CP - Controle positivo: VAN - vancomicina (30 µg/disco) e GEN - gentamicina (10 µg/disco). CN - Controle negativo: discos estéreis sem antimicrobianos.

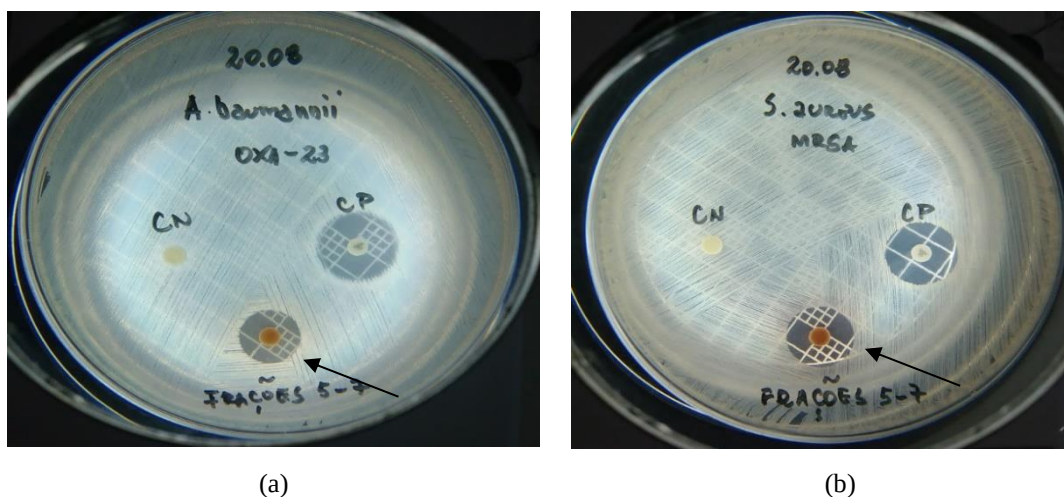


Figura 8 - Resultado da atividade antimicrobiana da fração 5-7 pelo método de disco difusão em ágar, por disco de difusão (formação do halo de inibição em mm), frente as cepas: (a) *A. baumannii* OXA-23 com controle positivo (CP) de gentamicina 10 µg; e (b) *S. aureus* (MRSA) com controle positivo (CP) de vancomicina 30 µg. CN - Controle negativo: discos estéreis sem antimicrobianos.

FONTE: Próprio autor.

6 DISCUSSÃO

A diminuição nos programas de pesquisa e desenvolvimento (P & D) de novos antimicrobianos pelas indústrias farmacêuticas e o aumento alarmante do aparecimento de bactérias MDR, levou a um renascimento da descoberta de novos antimicrobianos, incluindo aqueles com base em fontes naturais (SILBER et al., 2016). Os fungos do solo representam uma parte dos recursos naturais, sendo de grande importância para produção de substâncias para a indústria de alimentos, farmacológica e biotecnológica (VALENCIA; CHAMBERGO, 2013). Fontes microbianas foram produtoras de milhares de antimicrobianos naturais. Mais da metade dos antimicrobianos foram produzidos por actinomicetes (cerca de 64%), 10-15% por bactérias e cerca de 20% por fungos (SILBER et al., 2016) (NIGAM; SINGH, 2014). Dos 10 fungos de solo Amazônico desse estudo, o filtrado de cultura dos fungos *Aspergillus* (H63) e *Paecilomyces* (H59) apresentaram atividade antimicrobiana contra duas ou mais bactérias testadas. Esse tipo de pesquisa teve por objetivo buscar fungos do solo Amazônico capazes de produzir substâncias antimicrobianas frente as principais bactérias multirresistentes, sendo uma abordagem importante para pacientes, médicos e indústrias farmacêuticas, visto o problema mundial de saúde pública acarretado por essas superbactérias.

No presente trabalho, o filtrado da cultura do fungo *Aspergillus* (H63) apresentou atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram positivas *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) e *S. aureus* ATCC 25923, pelo método de difusão em ágar. Shaaban et al. (2013), durante um programa contínuo para pesquisa de metabólitos secundários bioativos com base em microrganismos, verificou que o extrato bruto de *Aspergillus fumigatus* (isolado R7) exibiu atividade antimicrobiana frente a cocos Gram positivos (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), em ensaio iniciais

utilizando o método difusão em ágar. As atividades foram atribuídas as substâncias: fumiquinazoline-F e fumiquinazoline-D. Em um estudo realizado por Svahn (2015), utilizando 61 cepas de fungos filamentosos isoladas do leite do rio Isakavagu, Índia, sendo que várias mostraram atividade antimicrobiana quando foram submetidas a ensaios iniciais frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas. O *Aspergillus fumigatus* (cepa 1) foi escolhida para o estudo, pois o seu filtrado de cultura apresentou atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus* Van A, *S. aureus* MRSA, *E. coli* ESβL e *P. aeruginosa*. A atividade antimicrobiana foi atribuída a substância gliotoxina e seus derivados. Furtado et al. (2005) verificou atividade antimicrobiana do extrato bruto obtido do caldo de cultura do *A. fumigatus* isolado de amostras de solo do Pantanal-MS, Brasil, frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Micrococcus luteus* ATCC 9341, utilizando o método de difusão em agar. Todas as substâncias isoladas (Dicetopiperazinas 1-7) inibiram o crescimento do *S. aureus* e *M. luteus*. Os nossos resultados concordam com alguns autores quanto a atividade antimicrobiana frente a cocos Gram positivos (*S. aureus* MRSA e *S. aureus* ATCC 25923, mas divergem quanto as bactérias Gram negativas, onde não houve inibição do crescimento microbiano.

O filtrado da cultura do fungo *Paecilomyces* (H59) apresentou atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e bactérias Gram negativas *K. pneumoniae* ATCC 700603 (EsβL positiva), *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 (KPC), *A. baumannii* OXA-23 e *Escherichia coli* ATCC 25922, pelo método de difusão em ágar. O gênero *Paecilomyces* são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários bioativos de diferentes estruturas químicas e atividades biológicas diferentes, incluindo atividade citotóxica, imunoestimulante e antimicrobiana (leucinostatins A, D, H e K) (WANG et al., 2002). Com relação à espécie *Paecilomyces*, não foram encontradas informações na literatura sobre a atividade antimicrobiana desta espécie, sendo, portanto, o primeiro relato desta espécie. A CIM do

concentrado do filtrado da cultura de *Paecilomyces* (H59) demonstrou potencial inibitório frente as cepas investigadas (tabela 2). A CIM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2012: norma M7-A9). Embora não haja um consenso na literatura para os padrões aceitáveis de inibição de produtos naturais, quando comparados com os antimicrobianos convencionais, alguns autores sugerem uma classificação com base nos resultados do CIM. Duarte (2006), sugere como forte inibição, CIM até 500 µg/mL; inibição moderada, CIM entre 600 e 1500 µg/mL; e como fraca inibição, CIM acima de 1600 µg/mL. Já Holetz et al. (2002) e Reagasini et al. (2010), utilizaram em seus estudos os seguintes padrões de atividade: CIM inferior a 100 µg/mL (potente inibidor), variando 100-500 µg/mL (inibidor moderado), 500-1000 µg/mL (fraco inibidor) e acima de 1000 µg/mL foram considerados sem atividade. Sartoratto et al. (2004) consideram como forte inibidor valores de MIC entre 50-500 µg/mL, atividade moderada entre 600-1500 µg/mL e fraca atividade acima de 1500 µg/mL. Considerando-se os critérios adotados nessas classificações, o concentrado de filtrado da cultura do *Paecilomyces* (H59) apresentou resultados de CIM com atividade antimicrobiana variando entre forte inibição e inibição moderada, mostrando um forte potencial para pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas frente a bactérias multirresistentes.

Quando se desconhece a natureza das substâncias ativas presentes nos extratos naturais, faz-se necessário uma análise químico-farmacológica, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Várias metodologias são descritas (CCD, bioautografia, cromatografia em coluna, CLL, etc.), utilizando solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e outros de polaridades similares, visando o isolamento e purificação de prováveis metabólitos secundários ativos (FILHO; YUNES, 1998). Dentre as substâncias com atividade antimicrobiana isoladas de fungos, podemos destacar: alcalóides,

peptídeos, esteróides, terpenóides, quinonas, flavonóides, compostos alifáticos, fenóis, etc.) (YU et al., 2010). As substâncias ativas do isolado *Paecilomyces* (H59) demonstraram solubilidade em solventes orgânicos de alta e de média polaridade e as cromatografias preparativas permitiram isolar uma fração contendo uma substância antimicrobiana com atividade de amplo espectro.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e os mapas de contorno (COSY, HMBC e HSQC), juntamente com os dados da espectrometria de massas com ionização por *Eletronspray* (ESI-EM) sugerem que, a substância majoritária da fração ativa 5-7 é a da substância de íon molecular 244 m/z , com fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$. O presente trabalho é o primeiro a propor a existência dessa substância. Novos estudos ainda serão necessários de forma a elucidar a sua estrutura química e avaliar a atividade antimicrobiana dessa substância isoladamente das demais substâncias da fração.

Com os resultados desse estudo, conclui-se que os fungos do solo Amazônico, são potenciais produtores de substâncias antimicrobianas frente as principais bactérias MDR, visto a grave ameaça à saúde pública mundial causada por esses microrganismos. Esse tipo de pesquisa atualmente é de suma importância, devido ao crescente aumento da resistência bacteriana, bem como, a falta de novos agentes antimicrobianos para combatê-las, contribuindo para o renascimento da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas com atividade antimicrobiana, com base em produtos naturais.

7 CONCLUSÃO

=>O filtrado do fungo *Aspergillus* (H63) apresentou atividade antimicrobiana para tanto para o *S. aureus* (MRSA) e o *S. aureus* (selvagem). O filtrado do fungo *Paecilomyces* (H59) apresentou atividade antimicrobiana de amplo espectro, para o *S. aureus* (MRSA) e o *S. aureus* (selvagem), *K. pneumoniae* EsβL, *K. pneumoniae* KPC, *A. baumannii* OXA-23 e para a *E. coli* ATCC 25922;

=>O concentrado de filtrado do fungo *Aspergillus* (H63) na concentração de 1600 µg/mL, conseguiu inibir o crescimento do *S. aureus* MRSA e o *S. aureus* selvagem. O concentrado de filtrado do fungo *Paecilomyces* (H59), na concentração de 800 µg/mL, conseguiu inibir o crescimento do *S. aureus* MRSA e o *S. aureus* selvagem, *K. pneumoniae* EsβL, *K. pneumoniae* KPC e da *E. coli* selvagem, e de 400 µg/mL, o do *A. baumannii* OXA-23;

=> A fração 5-7 mostrou atividade antimicrobiana frente as bactérias *S. aureus* MRSA e *A. baumannii* OXA-23, mostrando ser de amplo espectro;

=> Uma das substâncias produzidas por *Paecilomyces* (H59) presente na fração 5-7 foi caracterizada com fórmula molecular C₁₄H₁₂O₄, sendo necessário mais estudos para elucidação de sua estrutura química e avaliação da sua atividade microbiana frente ao *S. aureus* MRSA e *A. baumannii* OXA-23.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, n. December, p. 134, jan. 2010.

BEBELL, L. M.; MUIRU, A. N. Antibiotic Use and Emerging Resistance. **Global Heart**, v. 9, n. 3, p. 347–358, 2014.

BECKER, D. E. Antimicrobial Drugs. **Anesthesia Progress**, v. 60, n. 3, p. 111–123, 2013.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2673–2701, 2010.

BRAKHAGE, A. A. Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 547–585, 1998.

BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 2, p. 413–8, 2014.

BRUSSELAERS, N.; VOGELAERS, D.; BLOT, S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. **Annals of intensive care**, v. 1, n. 1, p. 47, 2011.

CASSIR, N.; ROLAIN, J.; BROUQUI, P. Antimicrobials , Resistance and Chemotherapy A new strategy to fight antimicrobial resistance : the revival of old. n. October, p. 1–15, 2014.

CELESTINO, J. D. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 2010, p. 2684–2691, 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition**. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests f or Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: Campinas ed. UNICAMP: 2006, 2006. p. 452.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 287–292, 2013.

DE LIMA, A. M. et al. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of mycobacterium tuberculosis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 8, 2011.

DEBBAB, A. et al. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. **Microbial biotechnology**, v. 3, p. 544–563, 2010.

DEVI, P. et al. Isolation and Characterization of Antibacterial Compound from a Mangrove-Endophytic Fungus, *Penicillium chrysogenum* MTCC 5108. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 617–623, 2012.

DEWANJEE, S. et al. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 75–84, 2015.

DUARTE, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, p. 16, 2006.

ELAZHARI, M. et al. Characterization of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in the community of Casablanca (Morocco). **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 2, p. 96–100, 2012.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, p. 25–64, 2014.

FARRELL, D. J.; CASTANHEIRA, M.; CHOPRA, I. Characterization of global patterns and the genetics of fusidic acid resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. SUPPL. 7, 2011.

FAZAKERLEY, N. J.; HELM, M. D.; PROCTER, D. J. Total synthesis of (+)-pleuromutilin. **Chemistry - A European Journal**, v. 19, n. 21, p. 6718–6723, 2013.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

FURTADO, N. A. J. C. et al. Diketopiperazines Produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. **J. Braz; Chem. Soc.**, v. 16, n. 6, p. 1448–1453, 2005.

GANESH KUMAR, C. et al. Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 20, n. 4, p. 283–289, 2010.

GUPTA, D. et al. SCREENING OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM SOME MEDICINAL PLANTS IN JABALPUR REGION FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY. p. 1655–1666, 2014.

HÖGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: Challenges and recent advances. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 11, p. 509–515, 2010.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

JUNIOR, N. L. S. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: Disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 229–244, 2010.

KONEMAN, E. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

LEWIS, J. S.; JORGENSEN, J. H. Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 40, n. 2, p. 280–285, 2005.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 5, p. 371–387, 2013.

LIVERMORE, D. M. Discovery research: The scientific challenge of finding new antibiotics.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 66, p. 1941–1944, 2011.

LUO, Y.; COBB, R. E.; ZHAO, H. Recent advances in natural product discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 230–237, 2014.

MAGIORAKOS, A. et al. Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. **Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **International journal of toxicology**, v. 22, n. 2, p. 135–143, 2003.

MOELLERING, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 1, p. 2–9, 2011.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. **Production of Secondary Metabolites – Fungi**. 2. ed. [s.l: s.n.].

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, p. 1–84, 2016.

OLIPHANT, C. M.; EROSCHENKO, K. Antibiotic resistance, Part 1: Gram-positive pathogens. **Journal for Nurse Practitioners**, v. 11, n. 1, p. 70–78, 2015.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PYÖRÄLÄ, S. et al. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. **Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 230–239, 2014.

REGASINI, L. O. et al. Atividade antimicrobiana de *Pterogyne nitens* Tul., *Fabaceae*, contra fungos oportunistas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 706–711, 2010.

RICE, L. B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. **JMCP**, v. 87, n. 2, p. 198–208, 2012.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004.

SHAABAN, M. et al. Bioactive secondary metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus*: Structural elucidation and bioactivity studies. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 41, n. 1, p. 50–60, 2013.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015.

SILBER, J. et al. From Discovery to Production: Biotechnology of Marine Fungi for the Production of New Antibiotics. **Marine Drugs**, v. 14, n. 7, p. 137, 2016.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 71–109, jan. 2011.

SONG, J.-H. What's new on the antimicrobial horizon? **International journal of antimicrobial agents**, v. 32 Suppl 4, p. S207–S213, 2008.

SOUZA, A. Q. L. DE et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens benth*. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185–195, 2004.

SVAHN, S. Analysis of Secondary Metabolites from *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium nalgiovense*. **Acta Universitatis Upsaliensis.**, p. 57, 2015.

TAKAHASHI, J. A. et al. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* , *Salmonella typhimurium* , *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 18, p. 198–204, 2008.

THEURETZBACHER, U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 15–20, 2009.

THEURETZBACHER, U. Resistance drives antibacterial drug development. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 433–438, 2011.

THEURETZBACHER, U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 295–299, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9–18, 2013.

VALGAS, C.; MACHADO, S. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. p. 369–380, 2007.

WANG, J. et al. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces sp.* and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 51–57, 2002.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, v. 1, p. 234, 2014.

WRIGHT, P. M.; SEIPLE, I. B.; MYERS, A. G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840–8869, 2014.

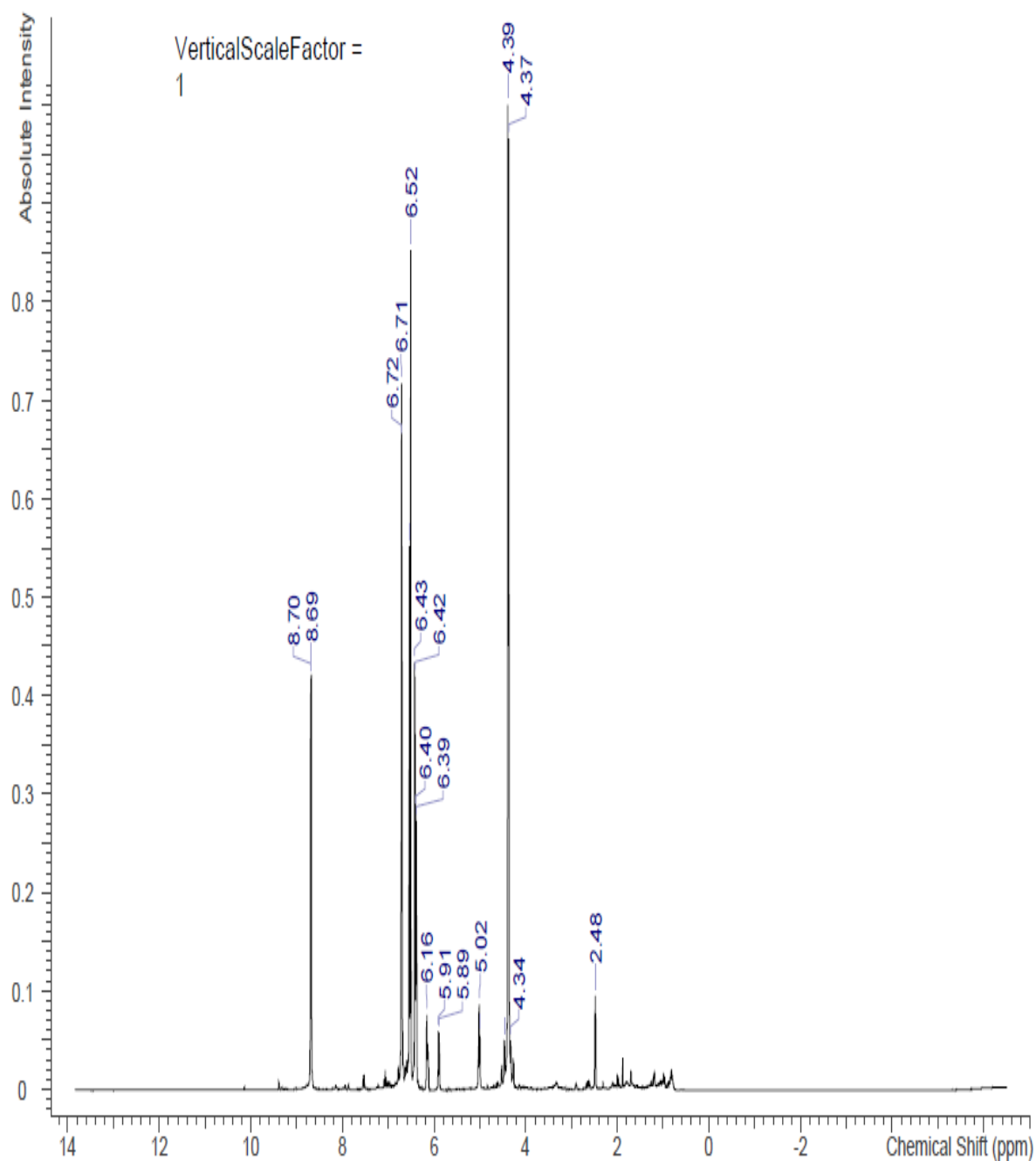
YANLING, J.; XIN, L.; ZHIYUAN, L. The Antibacterial Drug Discovery. **Drug Discovery**, p. 289–307, 2013.

YU, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 437–449, 2010.

APÊNDICE B - Equipe científica

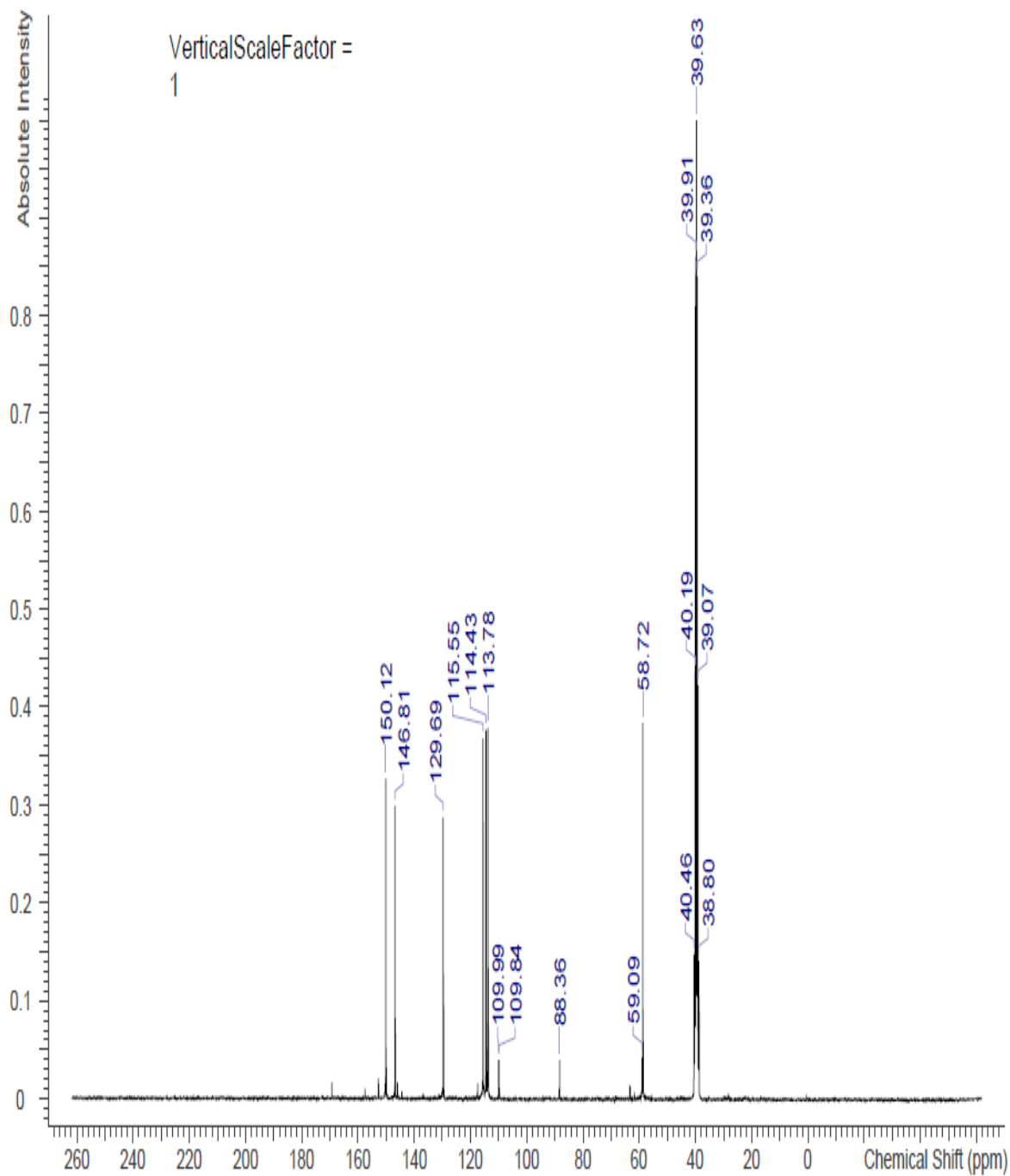
Nome	Formação	Título	Órgão	Atividade
João Vicente Braga de Souza	Farmacêutico	Ph.D.	INPA	Orientador
Alita Moura de Lima	Biomédica	Doutorado	INPA	Apoio técnico
Rildo Mendes de Lima	Farmacêutico	-	UFAM	Mestrando
Mayte Fachin	Farmacêutica	Mestrado	INPA	Apoio técnico
Cecília Verónica Nunez	Química	Ph.D.	INPA	Apoio técnico

APÊNDICE C - Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) da substância, com fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$, obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do *Paecilomyces* H59.



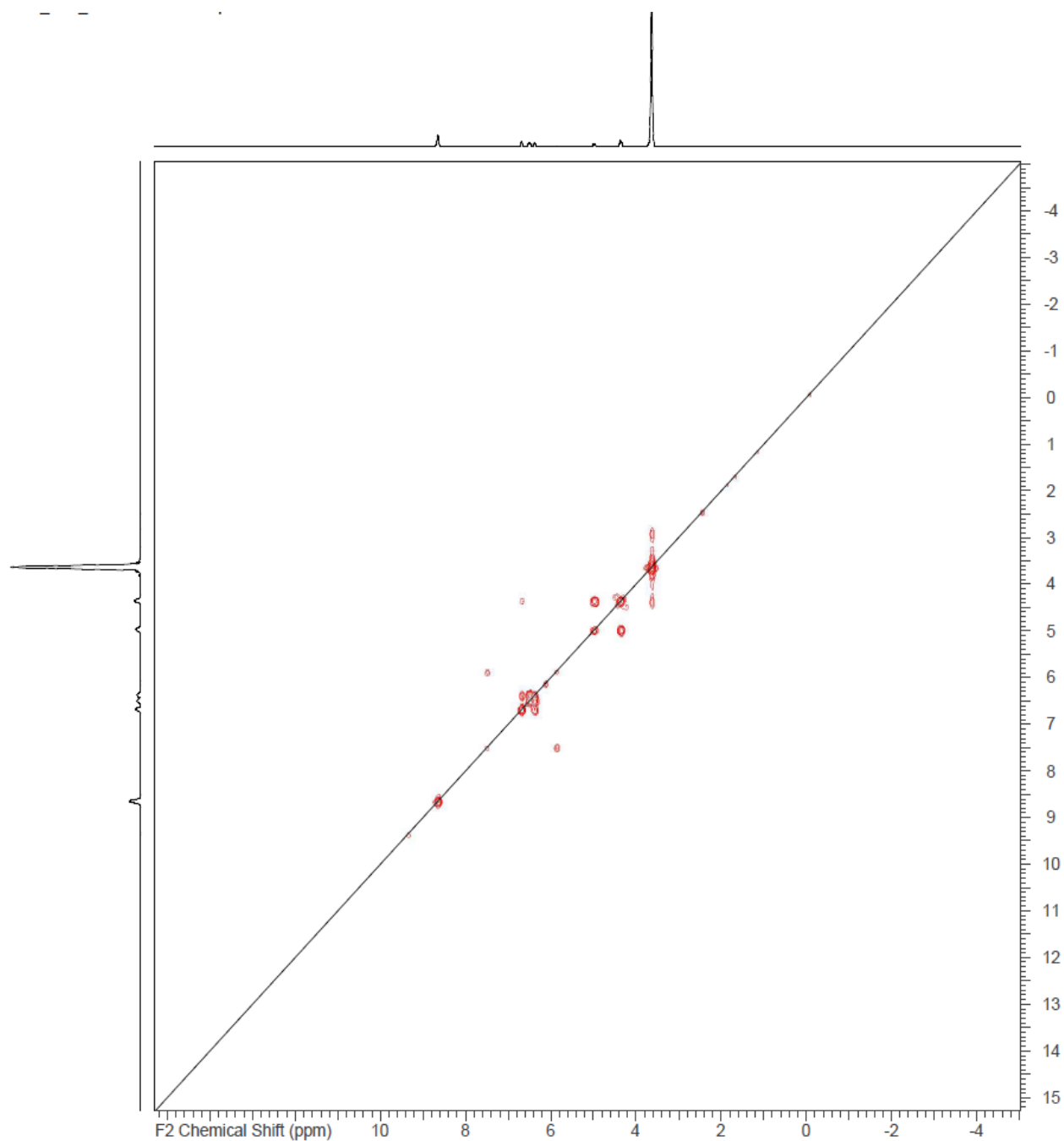
Fonte: programa ACD/Spectrus Processor 2016.1.

APÊNDICE D - Espectro de RMN ^{13}C (300MHz, DMSO-d₆) da substância, com fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$, obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do *Paecilomyces* H59.



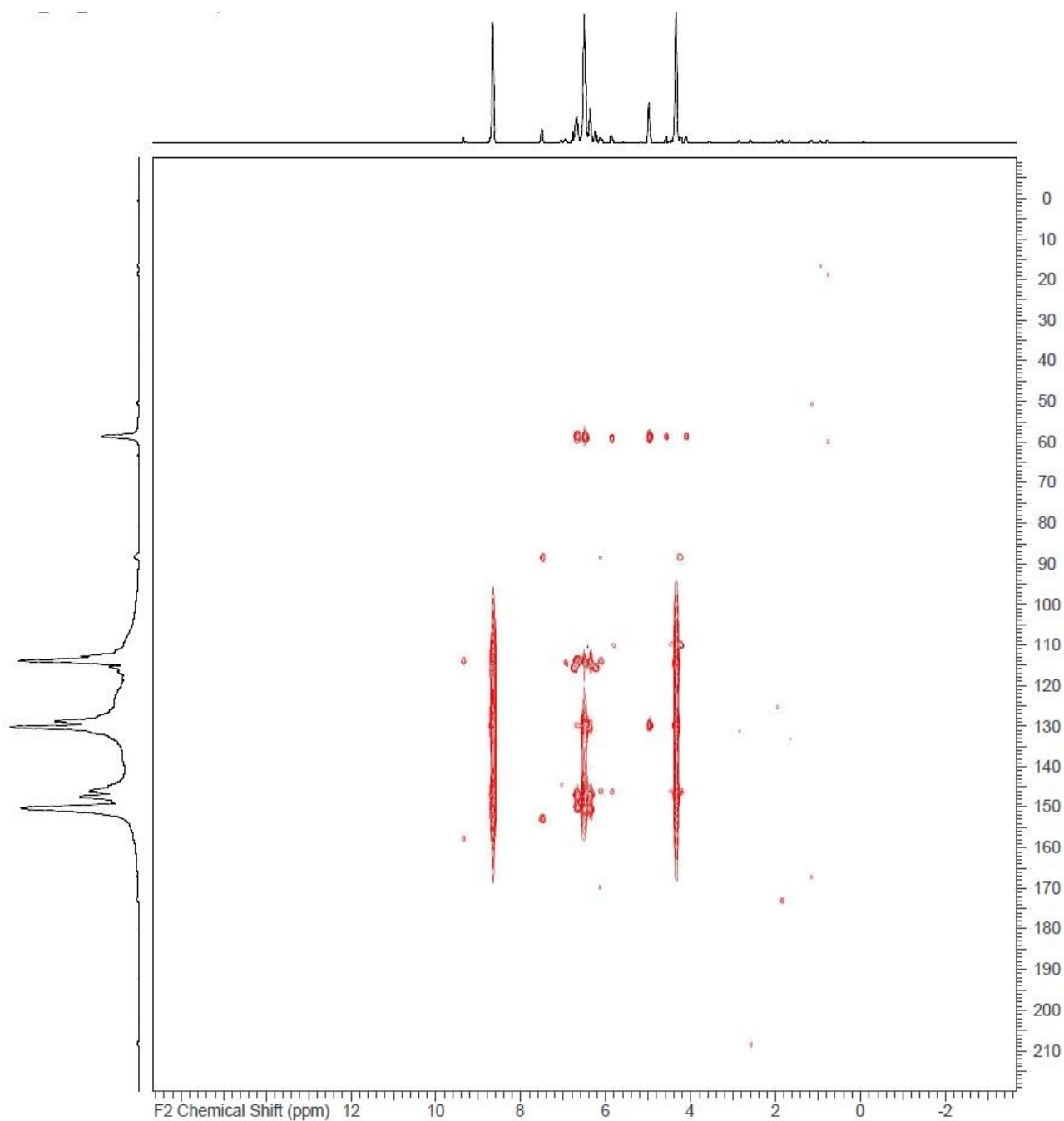
Fonte: programa ACD/Spectrus Processor 2016.1.

APÊNDICE E - Mapa de contorno de COSY (300/75 MHz, DMSO-d6) da substância, com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_4$, obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do *Paecilomyces* H59.



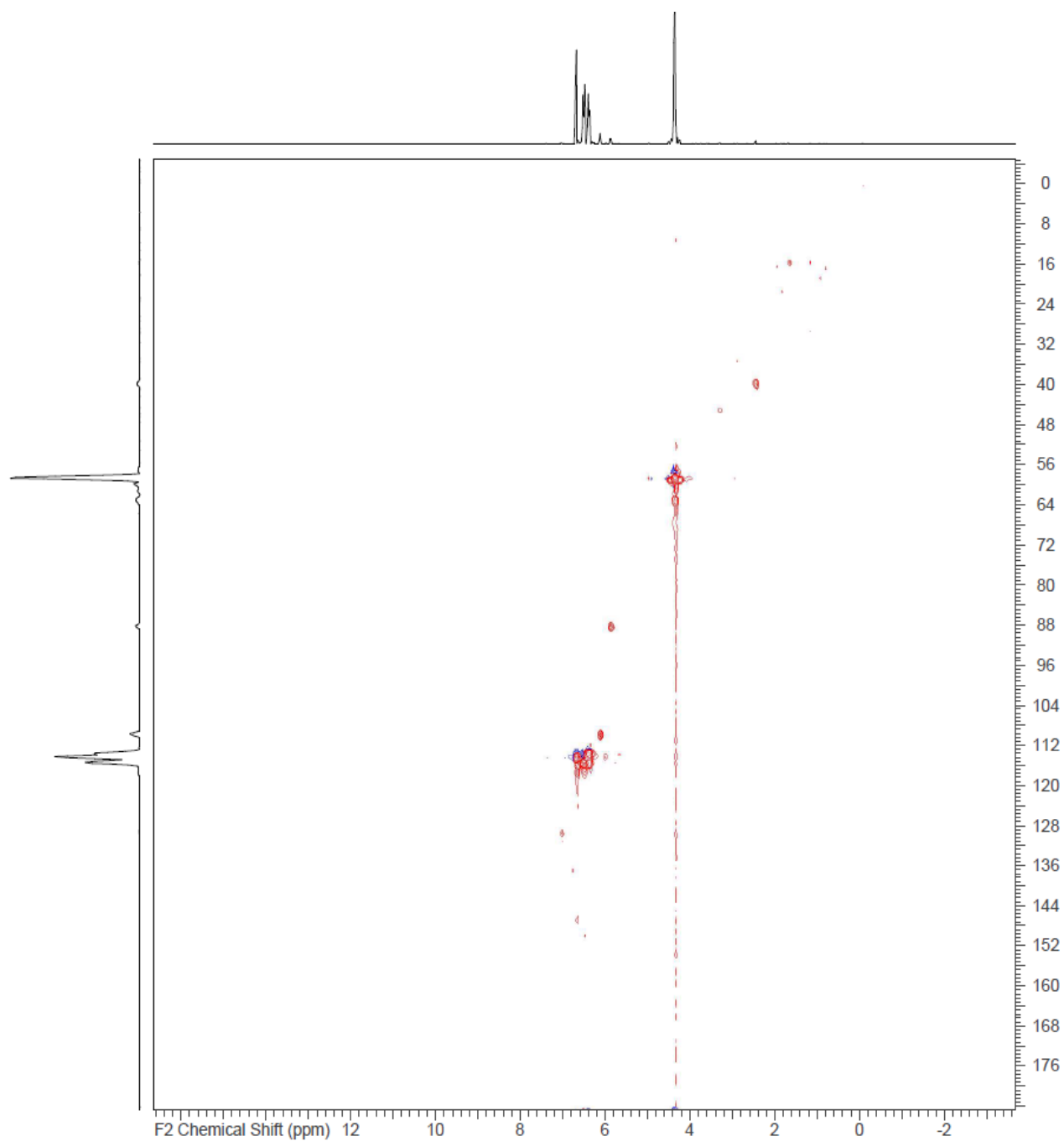
Fonte: programa ACD/Spectrus Processor 2016.1.

APÊNDICE F - Mapa de contorno de HMBC (300/75 MHz, DMSO-d6) da substância, com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_4$, obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do *Paecilomyces* H59.



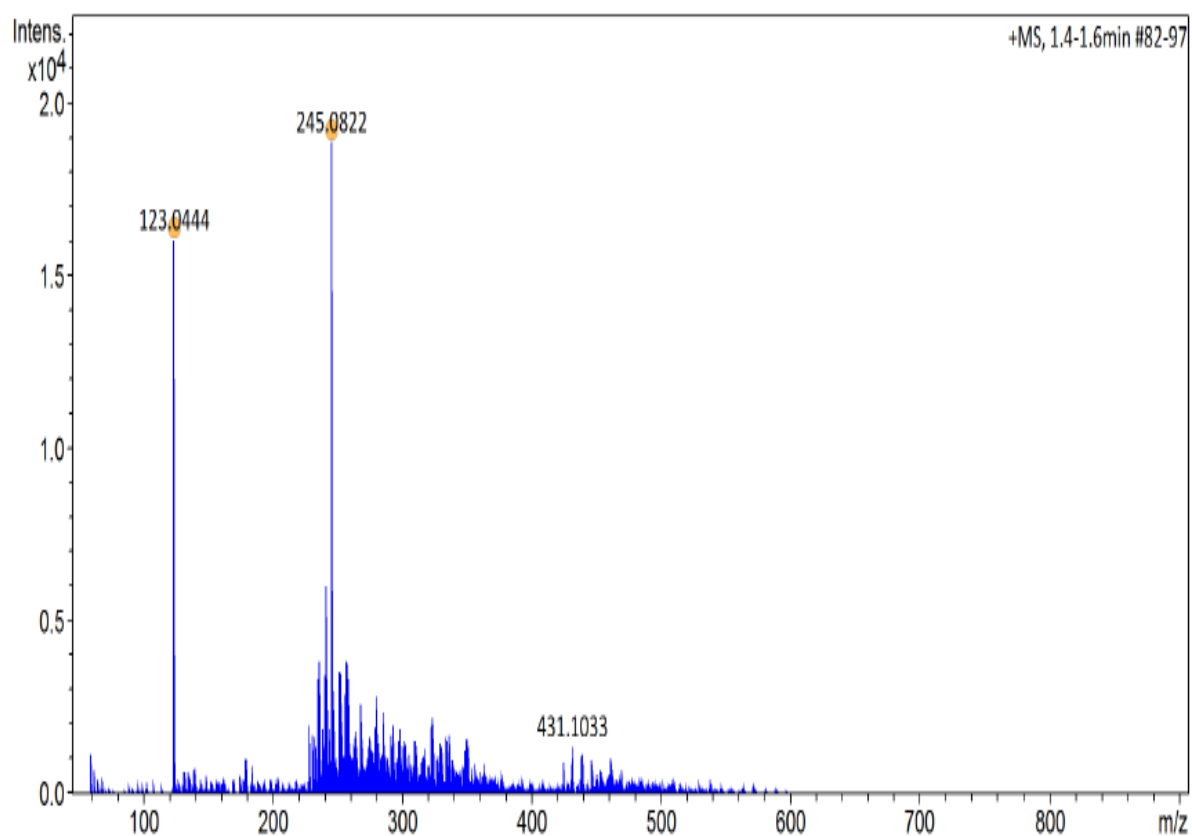
Fonte: programa ACD/Spectrus Processor 2016.1.

APÊNDICE G - Mapa de contorno de HSQC (300/75 MHz, DMSO-d6) da substância, com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_4$, obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do *Paecilomyces* H59.



Fonte: programa ACD/Spectrus Processor 2016.1.

APÊNDICE H – Espectro de massas (ESI+) da substância, com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_4$, obtida da fração 5-7 do concentrado de cultura do *Paecilomyces* H59.



Fonte: programa ACD/Spectrus Processor 2016.1.