



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

PRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
PRODUZIDAS POR *Paecilomyces* H59, INIBIDORAS DO
CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* MRSA

SARA JÉSSICA TEIXEIRA DE ANDRADE

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

SARA JÉSSICA TEIXEIRA DE ANDRADE

PRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
PRODUZIDAS POR *Paecilomyces* H59, INIBIDORAS DO
CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* MRSA

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

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Co-orientador: Cecilia Veronica Nunez

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

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

A553p Andrade, Sara Jéssica Teixeira de
 Produção e identificação de substâncias produzidas por
 Paecilomyces H59, inibidoras do crescimento de S. aureus MRSA. /
 Sara Jéssica Teixeira de Andrade. 2018
 86 f.: il. color; 31 cm.

 Orientadora: João Vicente Braga de Souza
 Coorientadora: Cecília Veronica Nunez
 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
 Universidade Federal do Amazonas.

 1. Resistência bacteriana. 2. Bioprospecção. 3. Fungos
 Amazônicos. 4. S. aureus MRSA. I. Souza, João Vicente Braga de
 II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas



Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da discente Sara Jéssica Teixeira de
Andrade, ocorrida no dia trinta e um de agosto de dois
mil e dezoito.

No dia trinta e um de agosto de dois mil e dezoito, às catorze horas, no Auditório do laboratório de Micologia Médica do INPA, ocorreu a nonagésima defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. A defesa consistiu na apresentação e julgamento da dissertação da discente Sara Jéssica Teixeira de Andrade, mestranda deste Programa de Pós-Graduação, com o título: "Produção e identificação de substâncias produzidas por *Peacilomyces* H59, inibidoras do crescimento de *Saureus* MRSA", somente com a presença da banca avaliadora. Tendo como orientador o Professor Doutor João Vicente Braga de Souza do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e coorientadora a Professora Doutora Cecília Verônica Nunez. A banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado foi presidida pelo Professor Doutor João Vicente Braga de Souza, e teve como demais integrantes as Professoras Doutoras Alita Moura de Lima da Secretaria Municipal de Saúde e Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo da Universidade Federal do Amazonas. Concluída a apresentação e realizadas as arguições correspondentes, a aluna foi considerada, nesta ordem: Professor Doutor João Vicente Braga de Souza (X) Aprovada () Reprovada, Professora Doutora Alita Moura de Lima (X) Aprovada () Reprovada e Professora Doutora Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo () Aprovada () Reprovada. Não tendo mais nada a acrescentar, eu, Emerson Silva Lima, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, lavrei a presente Ata que, após lida, segue também assinada pela mestranda, orientador e membros da Banca Examinadora, Manaus, trinta e um de agosto de dois mil e dezoito.

Prof. Dr. Emerson Silva Lima – Coordenador

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza /Presidente/Orientador

Prof. Dr. Alita Moura de Lima - Membro externo

Prof. Dr. Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo - Membro interno

Sara Jéssica Teixeira de Andrade
Sara Jéssica Teixeira de Andrade – Discente

*Dedico aos meus pais Rosana Andrade e Otoniel Andrade, minha irmã Luana Andrade,
toda minha família e todos meus amigos, pela compreensão, apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar com sabedoria e ter colocado ao meu lado pessoas que foram imprescindíveis nessa caminhada.

A meus pais, Rosana e Otoniel, que sempre me incentivaram e possibilitaram essa caminhada acadêmica.

Ao Prof^o. Dr. João Vicente Braga de Souza, meu orientador, pelos ensinamentos, conselhos, orientações, confiança, incentivo e principalmente paciência nessa jornada intensa para o desenvolvimento deste trabalho. Minha eterna gratidão.

À prof^a Dr^a. Ana Cortez, pela oportunidade e apoio nessa jornada, desde quando eu era muito jovem, onde me passou muitos ensinamentos no qual os levarei por toda minha caminhada.

Aos professores e técnicos da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF/UFAM, José Neto, Karen Magalhães, Emerson Lima e Cléo.

Aos integrantes da família micologia (INPA), Rodrigo Ribeiro, Silviane, Ralyvan, Tayana, Tailah, Beatriz, Luciana, Michele, Katia, Flávia, Walter, Ingrid, Dra. Érica, Leonardo, Luan, Lilian, Amanda, Diego Fernando, Mariane, Joyce, Liliane Rocha, Socorro, Socorrinho, Samira, Arine, Rildo e Vanuza, pela recepção, apoio e auxílio nos ensaios.

Aos técnicos de laboratório Sr. Francisco, Sr. Raimundo Bezerra, Sr. Rosalvo, Dona Eliana e Juliana.

As integrantes do Laboratório de química e Produtos Naturais, minha co-orientadora Dra. Cecilia Nunes pela oportunidade e Maitê por todo o companheirismo do início ao fim.

Aos amigos, Sarah Pessoa, Rodrigo Ribeiro, Rodrigo Lima, Rodrigo Raison, Carlos Eduardo, Fabíola, Lidianne, Carmen, Ana Castro, Maysa, Babbyngttonn Khell, Naiara Praxedes

Aos meus amigos e companheiros da Universidade do Estado do Amazonas, Eliane Santana, Marythelma Henrique, Rosilene Campos, Claudia Patrícia, Maria de Nazaré, Raika Guimarães, Cássia do Rosário Antonio Jorge II, Tiago Pinheiro, Kilmaria, Michella, Paty Karoll, Rudi Procopio, Paulo Magalhaes, Roberto Andrade, Bianca e Eliana.

RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno humano oportunista mais frequentemente associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Esse organismo é extremamente adaptável e ao longo de um curto espaço de tempo desenvolveu estratégias de resistências aos antimicrobianos, dessa forma, a bioprospecção de novas drogas capazes de inibir *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina - MRSA é um importante campo para o desenvolvimento de pesquisas. Nesse contexto, recentemente, no laboratório de micologia – INPA foi identificada uma linhagem fúngica *Paecilomyces* H59 produtora de substâncias capazes de inibir o MRSA. Diante dessa descoberta, o objetivo do estudo foi investigar a produção e caracterização de substância com atividade inibitória frente à MRSA produzida por *Paecilomyces* H59. A estratégia metodológica para alcançar esse objetivo incluiu: a) Caracterização taxonômica de *Paecilomyces* H59; b) Otimização da produção de substâncias ativas por bioprocessamento submerso e c) Isolamento e identificação das substâncias ativas frente o MRSA. A caracterização taxonômica de *Paecilomyces* H59 demonstrou todas as estruturas fúngicas relatadas em literatura identificando-o como pertencente ao gênero supracitado. Os fatores ajustados para a maior produção dos antimicrobianos foram: a) uso da glicose como fonte de carbono; b) qualquer fonte de nitrogênio testada; c) pH 5, d) inóculo 1×10^5 e ausência de agitação orbital. No isolamento e identificação das substâncias ativas as análises da espectrometria de massas com ionização por *Eletronspray* (ESI-EM) das duas fases DCM e AcOEt (frações 5-9 obtidas com o sistema diclorometano/acetato de etila (20:80 – v/v) foi realizado comparações dos espectros e encontrados em ambas as frações picos majoritários e semelhantes com a massa de 155 *m/z* fórmula molecular $C_7H_7O_4$, sugere-se que seja esse o responsável pela atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA. E verificar a citotoxicidade *in vitro* da substância isolada pelo método de Alamar Blue. Os resultados desse trabalho indicam que a bioprospecção de substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por *Paecilomyces* H59 é uma alternativa para a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas com atividade antimicrobiana, sendo vital para proteger a saúde humana frente a bactérias multirresistentes. Pacientes, médicos e a indústria farmacêutica possuem grande interesse nessa abordagem.

Palavras chaves: Resistência bacteriana, Bioprospecção e Fungos Amazônicos.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the human pathogen more related to a disease acquired in the community and the hospital environment. This organism is extremely adaptable and over a short period of time has developed antimicrobial resistance strategies, thus, the bioprospection of new drugs capable of inhibiting methicillin resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA is an important field for research development. In this recent context, in the laboratory of mycology - INPA has been identified a fungal strain, *Paecilomyces* H59 the production of substances capable of inhibiting MRSA. From this finding, the aim of this study was to investigate the production and characterization of an inhibitory component against MRSA produced by *Paecilomyces* H59. The methodological strategy to achieve this goal included: a) Taxonomic characterization of *Paecilomyces* H59; b) Optimization of the production of active substances by submerged bioprocess and c) Isolation and identification of substances active against MRSA. The taxonomic characterization of *Paecilomyces* H59 demonstrated all the fungal structures reported in the literature identifying it as belonging to the previously cited genus. The adjusted factors for the higher antimicrobial production were: a) Use of glucose as carbon source; b) Any source of nitrogen tested; c) pH 5; d) Inoculum 1×10^5 and absence of agitation. In the isolation and identification of active substances, a Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-EM) analyzes was performed in the two phases DCM and AcOEt (fractions 5-9 obtained with the dichloromethane / ethyl acetate system (20:80 v / v) was performed comparisons of the spectra and found in both majority and similar peaks fractions with the mass of 155 m/z molecular formula $C_7H_7O_4$, it is suggested that this is responsible for the antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA. And check the in vitro cytotoxicity of the substance isolated by the Alamar Blue method. Results from this work indicate that the bioprospection of substances with antimicrobial activity produced by *Paecilomyces* H59 is an alternative for the research and development of new drugs with antimicrobial activity and is vital to protect human health against multiresistant bacteria. Patients, physicians and the pharmaceutical industry interest in this approach.

Key words: Bacterial resistance, bioprospecting and amazon fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma de atividades realizadas	42
Figura 2 – Macromorfologia e Micromorfologia de <i>Paecilomyces</i> H59.....	57
Figura 3 – Atividade antimicrobiana das fases DCM e AcOEt - Teste de difusão em ágar por poço.....	60
Figura 4 – Atividade antimicrobiana das Fases DCM e AcOEt - Teste de Bioautografia imersão – agar-overlay.....	60
Figura 5 – Cromatografia em camada delgada da fase DCM e AcOET (frações 5-9).....	62
Figura 6 – Cromatografia em camada delgada e Teste de Bioautografia imersão – agar-overlay (frações 5-9) – Fase DCM.....	63
Figura 7 – Espectros de massa das frações 5-9 da fase DCM.....	64
Figura 8 – Espectros de massa das frações 5-9 da Fase AcOEt.....	65
Figura 9 – Espectro de RMN – fase DCM (frações 5-9).....	66
Figura 10 – Ampliação do espectro de RMN – fase DCM (frações 5-9).....	67
Figura 11 – Espectro bidimensional - fase DCM (frações 5-9).....	68
Figura 12 – RMN – fase DCM (frações 5-9).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos de ação dos antimicrobianos.....	39
Tabela 2 – Influência de diferentes fontes de Carbono e Nitrogênio na produção de substancias antimicrobianas	58
Tabela 3 – Influência do tamanho de inóculo na produção de substancias antimicrobianas.....	58
Tabela 4 – Influência do pH na produção de substancias antimicrobianas.....	59
Tabela 5 – Influência da agitação na produção de substancias antimicrobianas.....	59
Tabela 6 – Sistemas de eluição e frações obtidas a partir do fracionamento da fase DCM.....	61
Tabela 7 - Valores de viabilidade celular das substâncias na linhagem MRC-5.....	69
Tabela 8 – Substâncias produzidas por <i>Paecilomyces</i> sp.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -AAA-cys: Ácido α -aminoadípico-cisteína.

6-APA: Ácido 6-aminopenicilânico.

BDA: Batata-dextrose-ágar.

CA- MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associado à comunidade.

CDC: Centro para Controle e Prevenção de Doenças.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EM: Espectrometria de Massas.

FDA: US Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Drogas dos EUA).

GAIN: Generating Antibiotics Incentives Now (Gerando Antibióticos Incentivos Agora).

HA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associada à infecções hospitalares.

IMI: Iniciativa sobre Medicamentos Inovadores.

ITS: Espaço Interno Transcrito.

L- α -AAA: L- α -aminoadípico.

LLD-tripeptídeo: L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro.

NARSA: Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (Rede sobre a resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*).

ND4BB: NewDrugs4BadBugs.

NEQ: Novas Entidades Químicas.

NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas).

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PBP: Proteína Ligadora de Penicilina.

PMEs: Pequenas e Médias Empresas.

PPR: Penicilina-penicilinase resistente.

P&D: Pesquisa e Desenvolvimento.

RMN: Ressonância Magnética Nuclear.

SCCMEC: Staphylococcal Cassette Chromosome MEC.

TBE: Tris base, EDTA.

VRSA: Staphylococcus aureus resistentes a Vancomicina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Resistência bacteriana	17
2.2. Necessidades de novos antimicrobianos.....	21
2.3. Antimicrobianos produzidos por fungos	23
2.3.1. Penicilina	24
2.3.2. Cefalosporinas	25
2.3.3. Pleuromutilinas	26
2.3.4. Ácido fusídico	27
2.4. Metabólitos secundários produzidos por <i>Paecilomyces</i> sp.....	27
2.5. Condições de cultivo associadas à produção das substâncias antimicrobianas por fungos	29
2.5.1 Fontes de carbono	31
2.5.2. Fontes de Nitrogênio	32
2.5.3. Relação carbono / nitrogênio	32
2.6. Mecanismos de ação dos Antimicrobianos	33
2.6.1. Interferência na síntese da parede celular	35
2.6.2. Alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática	36
2.6.3. Interferência na replicação do DNA	37
2.6.4. Interferência na síntese protéica	37
2.7. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	40
3. OBJETIVOS	41
3.1. Geral	41
3.2. Específicos.....	41
4.MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Micro-organismo	42
4.2.Procedimentos	43
4.2.1. Taxonomia do isolado <i>Paecilomyces</i> H59	43
4.2.2. Influências das condições de cultivo e nutricionais na produção das	

substâncias antimicrobianas	43
4.2.3. Determinação da atividade antimicrobiana	44
4.2.4. Técnica de bioautografia em placas de cromatografia em cama delgada (CCD) pelo método de ágar-overlay.....	45
4.2.5. Isolamento químico das substâncias com atividade antimicrobiana	46
4.2.6. Identificação das substancias isoladas	47
4.2.7. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO.....	74
7. REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é tanto uma bactéria comensal quanto um patógeno humano. Aproximadamente 30% da população humana são colonizadas por *S. aureus* (WERTHEIM et al., 2005). Simultaneamente, é uma das principais causas de bacteremia e endocardite infecciosa (EI), bem como osteoarticular, pele e tecidos moles e pleuropulmonar (COATES et al., 2014; STRYJEWSKI et al., 2014).

O tratamento de infecções para *Staphylococcus aureus* por muitos anos foi realizado com o uso terapêutico da meticilina, contudo, devido à administração indevida, surgiram cepas resistentes a esta droga e passaram a ser denominadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Essa resistência se deve a aquisição do gene *mecA*, que codifica uma PBP (proteína ligadora de penicilina) mutada, impedindo a ligação da droga na parede celular bacteriana (FUDA et al., 2005).

A frequência de infecções ocasionadas por MRSA tem apresentado crescimento contínuo em instituições hospitalares a nível mundial, causando mais de 100 mil infecções a cada ano (BURKE, 2003; COHEN et al., 2008; DE LENCASTRE et al., 2007). Tradicionalmente, as infecções causadas pelo MRSA estavam limitadas aos hospitais (HA-MRSA); mas, nos últimos anos, as infecções associadas ou adquiridas na comunidade (CA-MRSA) estão sendo documentadas de forma crescente em todo o mundo. A bioprospecção de substâncias inibidoras do crescimento de *S. aureus* - MRSA é uma das possibilidades de contornar essa problemática e a literatura apresenta diversos trabalhos com esses objetivos.

O fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus*, isolado de larvas de insetos, foi estudado por Langet al. (2005), onde foi isolado e identificado metabólitos denominado Paecilosetina 1, ativo contra *Bacillus subtilis*, *Cladosporium resinae* e *Trichophyton mentagrophytes*. Outra espécie fúngica com o potencial produtor de

substância ativa é o fungo endofítico de mangue *Paecilomyces variotii* (FEL 32), estudado por Silva et al. (2013) onde identificaram a produção da substância Viriditoxina (dímero – 6'6 binafta-a-piranona, - C₃₄H₃₀O₁₄) responsável pela antimicrobiana frente a: *Micrococcus* sp. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. *S. aureus* coagulase negativa.

Paeciloside A foi isolada de culturas de *Paecilomyces* sp. (CAFT156), um fungo endofítico que ocorre em *Enantia chlorantha* Oliv (Annonaceae). Sua estrutura foi elucidada usando experimentos de RMN, MS, UV, 1D e 2D, com subsequente análise de difração de raios X usando radiação K α de cobre. Paeciloside A, apresentou efeitos inibitórios sobre duas bactérias gram-positivas, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. (TALONTSI et al., 2012).

A floresta amazônica possui grande diversidade e ciclagem de carbono muito veloz demonstrando ser local adequado para realização de estudos de bioprospecção. Recentemente, Lima (2016) investigou a bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos isolados de amostras do solo Amazônico. Esse autor identificou um isolado, *Paecilomyces* H59 como produtor de substâncias antimicrobianas frente à *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA). No entanto, essas substâncias foram apenas parcialmente identificadas de forma que ainda são necessários estudos de identificação taxonômica de *Paecilomyces* H59, avaliação dos fatores de bioprocessos que possuem influência na produção dessas substâncias e ainda caracterização química das substâncias ativas. Desta forma o objetivo deste trabalho foi investigar a produção e caracterização de substância com atividade inibitória frente à *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) produzida por *Paecilomyces* H59.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Resistência bacteriana

O primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberta por Alexander Fleming, em 1929, em um hospital londrino. Ele observou a inibição do crescimento em culturas de estafilococos contaminada por um fungo, mais tarde identificado como *Penicillium notatum* (KONEMAN et al., 2008).

Anos mais tarde, com o advento da Segunda Guerra Mundial, foi essencial que se estudasse ainda mais essas substâncias, pois com a guerra eram inevitáveis o desenvolvimento de processos infecciosos. A penicilina foi então extensamente utilizada contra *Stafilococos* e *Streptococos*, grandes causadores de pneumonias, infecções aéreas superiores, septicemias e entre outras patologias (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

Os antibióticos descobertos se tornaram tão eficazes no combate às infecções bacterianas que surgiu uma confiança geral de que estas doenças seriam erradicadas. As infecções passaram a ser desprezadas em seu papel de “inimigos da sociedade” (COATES, HU et al., 2002; GARCÍA-REY, 2010).

No entanto, as bactérias ajustam-se às mudanças em seu ambiente e desenvolvem mecanismos de resistência que inativam ou limitam a efetividade dos antibióticos. A seleção de bactérias resistentes por um novo antibiótico é quase inevitável, fazendo com que o uso disseminado deste composto, na prática médica seja fortemente relacionado ao aparecimento de bactérias resistentes a estes antibióticos (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988; HOGBERG, HEDDINI et al., 2010; WALSH & TIMOTHY, 2014).

Alguns exemplos de ligação entre o uso de antibióticos e desenvolvimento de resistência são o aumento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e resistentes à vancomicina (ALLEN, 2010).

Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para cepas produtoras de penicilinase, uma vez que essa droga não sofre ação dessa enzima. Porém, já em 1961, relatos de cepas também resistentes à meticilina passaram a ser descritos e foram denominados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). A partir da década de 1980, cepas MRSA passaram a representar um problema endêmico em diferentes proporções nos hospitais de diversos países, incluindo o Brasil (SANTOS et al., 2007).

O MRSA adquiriu grande importância, pois tende a ser multi-resistente e a opção terapêutica torna-se limitada ao uso de glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), oxazolidinonas (linezolida) e estreptograminas. O mecanismo molecular de resistência à meticilina consiste na aquisição de um elemento genético móvel denominado Staphylococcal Cassette Chromosome MEC (SCCMEC) que contém o gene, *mecA*, responsável pela alteração das proteínas ligadoras de penicilina (PBP). As PBPs são enzimas necessárias para a síntese da parede celular bacteriana. A ligação dos beta-lactâmicos a PBP bloqueia sua função e há formação de uma parede celular débil ou imperfeita que prejudica o desenvolvimento adequado da bactéria. O gene *mecA* codifica a PBP com baixa afinidade aos antibióticos beta-lactâmicos, denominada PBP2A ou PBP2. O SCCMEC contendo o *mecA* é incorporado ao cromossomo da bactéria *S. aureus* em um sítio de localização específica, promovendo, então, resistência bacteriana (DEL'ALAMO et al., 2007).

A presença dessas proteínas nas bactérias faz com que a meticilina e os compostos penicilina-penicilinase resistente (PPR) tenham baixa afinidade pelo local de ligação, na

parede celular bacteriana. O grupo PPR é composto pelas drogas: Oxacilina, Meticilina, Nafcilina, Cloxacilina e Dicloxacilina, e constitui a classe de drogas de escolha para o tratamento de infecções por *S. aureus* produtores de penicilinase (beta lactamase positivo) que não apresentam alteração da PBP2a (DEL' ALAMO et al., 2007).

A resistência a um grande número de antibióticos apresentada pelo MRSA torna difícil o controle deste microrganismo no ambiente hospitalar (FOLORUNSO et al., 2000; RUBINOVICH & PITTE, 2001). Além da resistência cruzada a todos os antibióticos beta-lactâmicos, o MRSA adquiriu resistência aos macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, clotrimoxazol e quinolonas (HIRAMATSU et al., 2002), restando os glicopeptídeos como uma das poucas opções terapêuticas.

Com a introdução da vancomicina, em 1958, surgiu uma alternativa no combate às infecções causadas pelo MRSA, utilizada ainda nos dias atuais. Porém, vários efeitos adversos relacionados ao uso de vancomicina têm sido relatados, sendo que o potencial ototóxico e nefrotóxico constituem os principais fatores limitantes para sua ampla utilização (FARBER & MOELER, 1983). A vancomicina apresenta atividade bactericida devido sua capacidade de bloquear a síntese do peptidoglicano, fundamental para a formação da parede celular bacteriana. A inibição da síntese do peptidoglicano ocorre devido à formação de um complexo entre a porção D-alanil-D-alanina do precursor da parede celular e a vancomicina (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Com uso indiscriminado da vancomicina (glicopeptídeos) como opção terapêutica para as cepas MRSA, passaram a surgir bactérias resistentes a essas drogas: *Staphylococcus aureus* resistentes a Vancomicina (VRSA). Após a consolidação dessas cepas no meio hospitalar e comunitário em diversos países do mundo, elas vêm sendo mundialmente estudadas por um programa multidisciplinar: NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*), coordenado pelo NIAID (National

Institute of Allergy and Infectious Diseases). O primeiro caso de VRSA foi reportado no início dos anos 2000, ainda sendo pouco prevalente nos dias de hoje, porém, com grandes chances de maior abrangência. Por isso, o controle da emergência dessa resistência deve ser realizado com critério (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Essas infecções por bactérias resistentes causam aproximadamente 25.000 mortes por ano na União Européia, e, nos Estados Unidos, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que, anualmente, aproximadamente 2 milhões de pessoas sejam infectadas em hospitais o que resulta em 90.000 mortes. Existe o risco de muitas doenças infecciosas tornarem-se incontroláveis, e, atualmente, mais de 70% das bactérias (que causam estas infecções) são resistentes a pelo menos um antibiótico utilizado para tratá-las (FDA, 2011; OMS, 2012).

O potencial de resistência coloca em risco a capacidade de tratamento de infecções comuns, que ocorrem tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares, tornando-se um imenso problema de saúde pública. Os ambientes hospitalares são os locais de maior preocupação em relação ao surgimento de bactérias resistentes, pois são locais onde há o favorecimento da seleção destas bactérias resistentes (BARRETT, 2005; FERNANDES, 2006; HOGBERG et al., 2010).

No entanto, as infecções hospitalares podem ser adquiridas tanto por pacientes do hospital (mais suscetíveis) quanto por visitantes e funcionários. Este último é um fato que ocorre menos frequentemente, mas que aumenta as chances de levar as bactérias hospitalares para a comunidade (BRASIL, 2004). Historicamente patógenos multidrogas resistentes eram limitados ao âmbito hospitalar. No entanto, a partir dos anos 90 estes patógenos se tornaram problemas importantes também na comunidade externa aos hospitais, afetando inclusive pessoas com contato limitado ou sem contato com o ambiente hospitalar (CHEN et al., 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmou que a resistência bacteriana é uma das principais ameaças à saúde humana, e isso não é mais uma previsão para o futuro, já existem situações em que bactérias são resistentes à maioria, ou até a todos, os antibióticos disponíveis. A OMS, inclusive, afirma que “sem uma ação coordenada e urgente, o mundo caminha para uma era pós-antibiótica, onde infecções comuns e ferimentos leves, que por décadas foram tratáveis, podem voltar a matar” (OMS, 2014).

A resistência bacteriana e a diminuição significativa da efetividade dos medicamentos acarretam uma necessidade crítica para o desenvolvimento de novas substâncias antibacterianas (PAYNE & TOMASZ, 2007). Ao mesmo tempo, a resistência bacteriana reduz a atratividade do desenvolvimento de novos agentes, pois: reduz o ciclo de vida da droga, aumenta o risco (os investidores têm menos tempo para recuperar os seus investimentos), restringe as vendas (muitos governos adotam esquemas para limitar o uso desses fármacos para evitar resistência) e torna prioritária a necessidade de estratégia para o gerenciamento do ciclo de vida (por exemplo, desenvolvendo uma formulação de liberação controlada), (KRESSE et al., 2007).

Outros fatores, intrínsecos ao setor antibiótico, diminuem a atratividade de pesquisa em novos antibióticos como: o fato da terapia antibacteriana ser aguda e não crônica; a natureza madura do mercado (que é caracterizado pelo baixo crescimento); falta de incentivo financeiro devido ao baixo retorno do investimento (KRESSE et al., 2007).

2.2. Necessidades de Novos Antimicrobianos

Atualmente já existem bactérias patogênicas que não respondem mais a nenhum dos agentes antibacterianos disponíveis. Inclusive algumas espécies apresentam mecanismos de resistência a qualquer tipo de antibióticos que possam ser desenvolvidos.

Pesquisas revelaram que uma vez que a resistência bacteriana se estabeleça na comunidade e no ambiente hospitalar existe pouca possibilidade, ou até mesmo nenhuma de reversão da resistência bacteriana (NORDBERG et al., 2013).

Além disso, outros fatores causam a necessidade por novos antibióticos. O primeiro é que existe a necessidade de opções terapêuticas para tratamento de infecções, pois existem indivíduos infectados por bactérias suscetíveis a somente um ou dois antibióticos que não toleram estes agentes, tornando o tratamento sem opções terapêuticas. Em segundo lugar, o aumento da resistência bacteriana nos hospitais faz com que seja necessária a liberação desses pacientes do hospital, para evitar infecções nosocomiais, criando a necessidade de novos antibióticos com perfil farmacocinético que favoreçam uma dose única e que possam ser tomadas em casa (RICE, 2003).

O número de novos antibióticos no mercado diminuiu significativamente nos últimos anos (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2011), sendo que na última década somente dez Novas Entidades Químicas (NEQ) foram aprovadas (KAPLAN et al., 2013). Isso fez com que a OMS incluísse os agentes antibacterianos na lista de medicamentos prioritários para o mundo (KAPLAN et al., 2013).

O assunto já vem sendo discutido desde meados da última década e diversas medidas estão sendo tomadas ao redor do mundo para conter o surgimento e disseminação de bactérias resistentes, como: programas de vigilância, desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos, entre outros (KAPLAN et al., 2013).

Nesse contexto estão também as medidas de incentivo, adotadas em alguns países, para atrair o interesse da indústria para Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos fármacos, como, por exemplo, extensões de prazo de vigência de patentes, exclusividade de mercado e processo regulatório especial para aprovação de novos compostos (NORDBERG et al., 2013). Exemplos específicos destas ações são: o programa da

Iniciativa sobre Medicamentos Inovadores (IMI) na União Européia denominado “NewDrugs4BadBugs” (ND4BB) onde foram disponibilizados €223.7 milhões de Euros para unir Pequenas e Médias Empresas (PMEs), academia e grandes empresas farmacêuticas na pesquisa por novos antibióticos (KAPLAN et al., 2013).

Nos Estados Unidos foi promulgada, em 2012, a Lei GAIN (*Generating Antibiotics Incentives Now*) que prevê um adicional de cinco anos de exclusividade de mercado, designação de produto prioritário e processo regulatório acelerado para novos antibióticos contra patógenos de interesse (KAPLAN et al., 2013). Cabe ressaltar que este adicional de exclusividade não se dá por extensão de prazo de patente e sim pela não aprovação de uma nova versão do mesmo fármaco pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) mesmo que o fármaco não esteja protegido por uma patente (TILLOTSON, 2012).

Esses incentivos e a necessidade por novos antibacterianos fez com que algumas grandes empresas passassem a reinvestir em P&D de antibióticos. A Roche, uma das primeiras a sair da P&D em antibióticos em 1999, fez uma parceria com a Polyphor (Suíça) para desenvolvimento clínico de um novo antibiótico e a Sanofi, que em 2004 desativou seu setor de P&D em antibióticos, vem reestabelecendo seu interesse na área desde 2011 (AN ANTIBIOTIC COMEBACK, 2014).

Muito deve ser feito ainda para reverter à situação, são necessários políticas e esforços colaborativos globais para incentivo de pesquisa de novos compostos e para o combate ao surgimento e disseminação de bactérias resistentes (KAPLAN et al., 2013).

2.3. Antimicrobianos produzidos por fungos

Os diversos antimicrobianos hoje utilizados na prática clínica podem ser obtidos a partir de 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). As principais substâncias antimicrobianas produzidas por fungos são: as penicilinas, cefalosporinas, pleuromutilinas e o ácido fusídico (WRIGHT, 2014).

2.3.1. Penicilina

Em 1928, Alexander Fleming, observou em uma placa de Petri, que um mofo contaminante estava colonizando e lizando as colônias bacterianas que estavam crescendo ao redor. A conclusão de Fleming foi que o mofo estava produzindo uma substância bacteriolítica capaz de matar as colônias bacterianas. 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 et al., 2014).

Após a descoberta da penicilina diversas técnicas de fermentação em massa, foram implementadas para aumentar sua produção, 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 (BRAKHAGE, 1998; WRIGHT et al., 2014).

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 et al.,2014; NIGAM et al.,2014). São antimicrobianos β -lactâmicos, produzidas com base no *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus nidulans* e *Cephalosporium acremonium*, possui atividade contra bactérias gram positivas (BRAKHAGE, 1998; NIGAM et al., 2014).

Na biossíntese da penicilina com base no *Penicillium chrysogenum*, 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, catalisada pela enzima penicilina transacetilase, dá origem a benzilpenicilina (penicilina G) (BRAKHAGE, 1998; NIGAM et al., 2014).

2.3.2. Cefalosporinas

As cefalosporinas foram descobertas em 1948, por Giuseppe Brotzu, da Universidade de Cagliari (Itália), suas descobertas foram feitas a partir de estudos realizados com 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* (BRAKHAGE, 1998; WRIGHT et al., 2014). São antimicrobianos β -lactâmicos produzidos com base nos fungos *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*), *Emericellopsis* e *Paecilomyces* spp. possuem atividade de amplo espectro (NIGAM et al., 2014; BRAKHAGE, 1998).

Na biossíntese da cefalosporinas, 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 de acetoxicefalosporina C. Em seguida, ocorre a hidroxilação pela dioxigenase, originando o deacetilcefalosporina C, tendo como ponto final da via do fungo a acetilação da cefalosporina C por uma transferase acetil-CoA-dependente (BRAKHAGE, 1998; NIGAM et al., 2014).

2.3.3. Pleuromutilinas

Antimicrobiano produzido por um basidiomiceto, a pleuromutilina, um metabólito secundário fúngico, foi isolado pela primeira vez em 1951 por Kavanagh e colaboradores, em uma triagem para compostos com atividade antimicrobiana (FAZAKERLEY et al., 2013; NIGAM et al., 2014;). 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 et al., 2014; WRIGHT et al., 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 et al., 2014; FAZAKERLEY et al., 2013).

2.3.4. Ácido fusídico

O ácido fusídico foi isolado pela primeira vez em 1960, com base nos fungos *Fusidium coccineum* (Moniliaceae) ou *Acremonium fusidioides*. Possui atividade contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e anaeróbicas, 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 contra infecções por estafilococos associados a outros antimicrobianos, devido à possibilidade do surgimento de resistência na monoterapia (NIGAM et al., 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 (FARRELL et al., 2011; NIGAM et al., 2014).

2.4 Metabólitos secundários produzidos por *Paecilomyces*

O gênero *Paecilomyces* foi identificado por Samson (1974), que descreveu sua estreita relação com *Penicillium*, diferindo na ausência de colônias com coloração verde e pelas fiálides cilíndricas curtas. Geralmente apresentam conidióforos simples ou em sinemata, verticilados e sustentados por fiálides. Seus conídios podem ser elípticos unicelulares, hialinos ou pigmentados. A colônia pode apresentar dependendo da espécie e do meio de cultura, coloração esverdeada, esbranquiçada a amarela (SAMSON, 1974).

Os fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* têm sido fonte de novos metabólitos secundários farmacologicamente ativos, representados principalmente pelas paecilotoxinas (peptídeos lineares altamente tóxicos, também designados por leucinostatinas) de *P. lilacinus*, paeciloquinonas (antraquinonas, inibidores da proteína tirosina quinase) de *P. carneus* P-177, paecilosetina (derivado de ácido tetrâmico, antibiótico) de *P. farinosus*, e uma série de tricotecenos de *P. tenuipes* (YANG et al., 2009). Guo et al. (2007) verificaram que uma extração do micélio do fungo *Paecilomyces* sp., obtida por uma mistura de acetato de etila, metanol e clorofórmio, proporcionou o isolamento de um novo dímero metabólito denominado Paecilin A e seu monômero Paecilin B, que apresentaram efeitos de inibição sobre células KB e a topoisomerase I humana, em ensaios de citotoxicidade e efeitos anticancer.

Farinosone A e B foram isoladas do extrato micelialdo fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus* juntamente com farinosa C, um novo metabólito derivado da etapa inicial da biossíntese de alcalóides da piridona (CHENG et al., 2004). Quatro policetídeos (Paecilocin A-B-C-D) foram isolados do fungo *Paecilomyces variotii*, derivados da água-viva *Nemopilemanomurai*, apresentando estruturas químicas elucidadas por análises espectroscópicas de RMN. Estes compostos mostraram atividade inibitória contra bactérias patogênicas fármaco-multirresistentes (*Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*) (LIU et al., 2011).

Yang et al. (2009) estudaram os processos envolvidos na síntese do Paecilodepsipeptídeo A, isolado do fungo patogênico *P. cinnamomeus*, cujo extrato apresentou atividade citotóxica moderada para duas linhagens celulares do câncer, KB e BC, juntamente com os seus derivados lineares Paecilodepsipeptídeos B e C. O Paecilodepsipeptídeo A apresentou também atividade contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, causador da malária. O composto Saintopin foi isolado a partir de

Paecilomyces sp. apresentando atividade citotóxica para linhagens de células tumorais, por inibição de enzimas nucleares (DNA-topoisomerasas) essenciais para o controle da topologia do DNA em células de mamíferos, nos processos de replicação, transcrição e recombinação. As DNA-topoisomerasas I e II são enzimas que alteram a conformação do DNA através de um rearranjo de suas cadeias de oligonucleotídeos. A enzima DNA-topoisomerase II já foi identificada como o alvo celular primário para vários agentes antitumorais clinicamente importantes em humanos (YAMASHITA et al., 1990; ISHIYAMA et al., 1998). Paecilomide, um novo alcalóide derivado da piridona e potente inibidor da acetilcolinesterase, foi isolado do extrato de *Paecilomyces lilacinus*, com estrutura elucidada por modernas técnicas de ressonância magnética nuclear e por espectrometria de massa, em pesquisa realizada por Teles e Takahashi (2013).

2.5. Condições de cultivo associadas à produção das substâncias antimicrobianas por fungos

Para a produção de substâncias com um potencial antimicrobiano, vários fatores são essenciais para a produção deste metabólito, o microrganismo produtor é o fator mais determinante para o sucesso ou fracasso de um bioprocesso. O microorganismo ideal deve apresentar características especiais como bom rendimento de produção, ser de fácil cultivo e manutenção, manter constância fisiológica, ser sensível às mudanças induzidas pela exposição controlada a agentes mutagênicos e, preferencialmente, não ser patogênica (BU'LOC & KRISTIANSEN, 1987).

A produção de um metabólito fúngico requer um conhecimento detalhado das características de crescimento e da fisiologia do fungo em estudo. Devendo-se considerar no bioprocesso, diferentes condições fisiológicas, levando em consideração que, cada

fungo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico (PAPAGIANNI, 2004).

Essas diferenças ocorrem não apenas entre o modo do cultivo, isto é, em substrato líquido ou sólido, devido à alteração em algum fator que venha a interferir no desenvolvimento do fungo. Por isso, a cada processo, as condições precisas e o correto estágio de desenvolvimento do microrganismo devem ser estabelecidos para que seja alcançada a produção máxima do metabólito de interesse. Sendo um ponto que necessita grande atenção para maximizar a capacidade e potencial de produção dessas substâncias bioativas (PAPAGIANNI, 2004).

A produção de substâncias antimicrobianas ocorre durante o processo fermentativo e é influenciada por fatores físicos e também pela composição nutricional do meio (PISAREVA & KUJUMDZIEVA, 2010; PURWADARIA et al., 2010). Assim, uma mesma linhagem pode produzir diversas substâncias, pois sofre influência direta das condições da cultura (MIYAKE et al., 2008).

As fontes de carbono e nitrogênio influenciam no crescimento do fungo, produção de substâncias bioativas e no rendimento da substância desejada (PISAREVA & KUJUMDZIEVA, 2010; RUIZ et al., 2010). O carbono é necessário ao metabolismo celular para a obtenção de energia e está relacionado à formação de biomassa (CHATTERJEE *et al.*, 2009; CELESTINO, 2013).

Muitos metabólitos secundários são produzidos em resposta às condições adversas do ambiente, por isso altas concentrações de glicose podem reprimir a produção de pigmentos (MARCOLETA et al., 2011; RUIZ et al., 2010). Estudos têm mostrado a influência dos carboidratos na produção de substâncias antimicrobianas produzidos por fungos ou até mesmo na depleção da produção (MARCOLETA et al., 2011; VELMURUGAN et al., 2010).

As fontes nitrogenadas regulam a expressão de genes de interesse e podem ativar vias metabólicas importantes na produção dessas substâncias, além de participarem da estrutura química dos mesmos, sendo um importante fator a ser considerado na produção desses compostos (CHATTERJEE et al., 2009; HAJAJ et al., 2012).

Portanto, alternativas para melhorar a produção de substâncias antimicrobianas em larga escala, como o estudo das fontes de carbono e nitrogênio de meios de cultivo, podem diminuir os custos e aumentar o rendimento, melhorando a viabilidade da produção industrial, uma vez que são executadas muitas etapas desde o processo fermentativo até a purificação, o que pode ocasionar baixas concentrações do produto de interesse (LIVERMORE, 2011).

2.5.1. Fontes de carbono

A maioria dos fungos utiliza glicose, mas muitos outros açúcares podem servir como fontes de carbono. A utilização de outros compostos orgânicos como fonte de carbono que não sejam carboidratos, juntamente com a necessidade universal por açúcares para finalidades biossintéticas, indica a ocorrência de gliconeogênese nestes fungos. Fungos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que podem hidrolisar amido (amilases), celulose (celulases), lignina (lignase), quitina (quitinase), proteínas (proteases), entre outras, sendo a produção dependente da espécie fúngica e das condições de cultivo (CELESTINO, 2013).

Considerando que o ciclo dos ácidos tricarboxílicos está presente praticamente em todos os fungos, os intermediários do ciclo podem atuar como fonte de carbono para muitos deles. Para muitos fungos uma fonte exógena destes ácidos não consegue penetrar na célula, entretanto o ácido cítrico e ácido succínico podem ser utilizados por muitos deles. Outros ácidos orgânicos como os ácidos lácticos, tartárico e acético e ácidos graxos

de cadeia longa podem ser assimilados por alguns fungos. Os ácidos orgânicos são fornecidos como sais (de sódio, potássio ou amônio) para evitar que o meio se torne muito ácido. O glicerol é uma ótima fonte de carbono para muitos fungos. Alguns fungos produzem lipase extracelular que hidrolisa lipídios a glicerol e ácidos graxos, que podem ser assimilados. Apesar de os aminoácidos e proteínas serem usados principalmente como fonte de nitrogênio eles, também, podem atuar como fonte única de carbono por alguns fungos (CARLILE & WATKINSON, 1997; CELESTINO, 2013).

2.5.2. Fontes de Nitrogênio

A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados. Como um dos maiores reguladores da assimilação de nitrogênio temos a amônia e, na sua presença, é reprimida a utilização de outras fontes nitrogenadas como nitrato, aminoácido e proteína. Os aminoácidos e pequenos peptídeos obtidos de hidrolisados de proteínas (peptonas) podem ser transportados para dentro da célula. Peptídeos grandes e proteínas necessitam, antes, ser hidrolisados por enzimas extracelulares, as proteinases (CARLILE & WATKINSON, 1997; CELESTINO, 2013).

2.5.3. Relação carbono / nitrogênio

Um meio balanceado poderá conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio (10:1). Uma relação de 10:1 ou menos garante um alto conteúdo protéico e uma relação muito maior, por exemplo, 50:1, favorece acumulação de álcool metabólitos secundários derivados do acetato, lipídeos ou polissacarídeos extracelulares.

Por isso, a relação carbono/nitrogênio exige grande atenção durante o cultivo em processos fermentativos (CARLILE & WATKINSON, 1997; CELESTINO, 2013).

2.6.Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Os antibióticos podem ser classificados de diversas formas. A maneira mais comum de classificá-los é de acordo com o modo de ação contra o organismo infectante, podendo também ser classificados conforme sua estrutura química e quanto ao espectro de ação que pode ser largo (compostos ativos contra bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas), baixo (compostos efetivos contra um grupo restrito de bactérias) e intermediário (substâncias com atividade contra algumas espécies bacterianas gram-negativas) o que dependerá da espécie bacteriana os quais estes são ativos (GUIMARÃES et al., 2010).

A atividade dos antimicrobianos depende da ligação dos mesmos aos seus alvos bioquímicos, com saturação suficiente para bloquear a função celular normal e deter o crescimento microbiano. As penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos contêm em sua estrutura um anel betalactâmico, que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin Binding Protein*), inibindo a reação de transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano. Com isso, há o impedimento da formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes do peptideoglicano, ocasionando uma perda na rigidez da parede celular. Acredita-se, também, que tais drogas podem atuar promovendo a ativação de enzimas autolíticas, resultando na degradação da parede (FISHER et al., 2005).

A vancomicina (glicopeptídeo), por sua vez, se liga covalentemente à extremidade do pentapeptídeo (D-Ala-D-Ala) e o complexo formado com o precursor do

peptideoglicano previne a ação das transglicosilases e das transpeptidases (WRIGHT, 2007).

Outro exemplo de mecanismo de ação dos antibióticos é a inibição da síntese proteica. Neste grupo estão os macrolídeos, como eritromicina, claritromicina e azitromicina, e as lincozamidas, que se ligam à subunidade ribossomal 50S e inibem a translocação do complexo ribossômico. A linezolina e os aminoglicosídeos (estreptomicina, gentamicina, canamicina,) interferem com a formação do complexo de iniciação, a primeira interagindo com a subunidade 50S do ribossomo, e os últimos com a subunidade 30S. As tetraciclina também se ligam à subunidade ribossomal 30S (sítio A), impedindo a ligação do aminoacetil-tRNA, enquanto o cloranfenicol se liga à subunidade ribossomal 50S, inibindo a ligação do tRNA e da peptidil transferase e, assim, a elongação do peptídeo (TENSON& MANKIN, 2006).

As quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacino, norfloxacino, entre outros) e anovobiocina previnem a replicação do DNA e a transcrição por meio da inibição da DNA girase ou da topoisomerase IV. A transcrição do RNA é inibida pela atividade da rifampicina sobre a RNA polimerase (HAWKEY, 2003).

Polimixinas atuam como agentes tensoativos catiônicos, que rompem a estrutura dos fosfolipídios da membrana celular e aumentam a permeabilidade da célula. São extremamente eficientes contra Gram-negativos, pois afetam tanto a membrana citoplasmática como a membrana externa da parede celular (KAYE, 2004). A daptomicina, um lipopeptídeo aprovado pelo FDA em 2003, também atua nos fosfolipídeos, promovendo rápida despolarização da membrana celular, com conseqüente perda do potencial de membrana e inibição de todo metabolismo celular (STRAUS& HANCOCK, 2006).

Outro importante mecanismo de ação é o antagonismo metabólico, que ocorre, geralmente, por meio de inibição competitiva. Neste grupo se destacam o trimetoprim e as sulfonamidas, que afetam enzimas da via metabólica do ácido fólico. A isoniazida afeta o metabolismo do NAD ou piridoxal, inibindo a síntese do ácido micólico - “fator corda” (TAVARES, 2002).

2.6.1. Interferência na síntese da parede celular

A parede celular é responsável por dar forma e rigidez à célula bacteriana. Ela serve como uma barreira osmótica permite que as bactérias retenham nutrientes, proteínas essenciais e ácidos nucleicos no seu interior e mantenham certas moléculas em seu exterior (KOCH, 2003).

A membrana externa tem constituição diferente conforme a bactéria seja Gram negativa ou Gram positiva. Entretanto, todas têm uma camada em comum, o peptidoglicano (KOCH, 2003). Nos microrganismos Gram positivos, esse muco peptídico compreende 60% da parede celular, sendo o restante constituído de ácidos teóicos, ribonucleato de magnésio e carboidratos. Já nos Gram negativos, ele constitui 10% da parede, formando, então, uma camada basal sobre a qual se situa uma camada externa composta por lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e proteínas (JANKNEGTT et al., 1996; HARBARTH et al., 2001).

A síntese do peptidoglicano ocorre em três etapas: a primeira ocorre no citoplasma bacteriano e resulta na formação de um derivado do ácido Nacetilmurâmico, o ácido uridinodifosfato-N-acetilmurâmico. Na segunda etapa da síntese da parede celular ocorre a formação de um composto derivado do ácido Nacetilmurâmico com um pentapeptídeo, que será transportado por um fosfolipídeo para fora da membrana citoplasmática, juntamente com moléculas de N8acetilglicosamina. No meio externo

ocorrerá à terceira etapa com as reações detransglicosilação e transpeptidação (MAINARDI, 2002).

Proteínas ligadoras de penicilina ou PBPs (*Penicillin-Bindin Proteins*) são proteínas situadas na face externa da membrana citoplasmática, que têm atividade enzimática de transglicosidases, transpeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, e participam na terceira etapa da biossíntese das novas moléculas de peptideoglicano (PERIRI, MAZZEI, 1999). Estas PBPs são os principais alvos dos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), os quais inibem sua ação e, conseqüentemente, a formação do peptideoglicano havendo lise osmótica (SING, 2004).

2.6.2. Alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática

A membrana citoplasmática ou membrana interna, como também é chamada, se localiza abaixo da parede celular e envolvendo o citoplasma onde se encontram as organelas essenciais para as funções vitais do microrganismo. Sua constituição é a mesma para Gram positivos e negativos. Cerca de 66% de sua constituição são proteínas e 33% são lipídeos, principalmente fosfolipídeos (YAO & MOELLERING, 2007).

Ela possui permeabilidade seletiva que controla a passagem de soluções para dentro e fora da célula e também apresenta um sistema enzimático de transporte ativo. É onde ocorre a síntese de ATP por oxidação fosforilativa e onde estão as enzimas envolvidas na síntese do peptideoglicano (YAO & MOELLERING, 2007).

Alterações físico-químicas da membrana citoplasmática levam à morte bacteriana, pois a permeabilidade seletiva é rompida, havendo a saída de elementos vitais à célula, como fosfatos, íons, purinas e ácidos nucléicos, ou entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano. Além disso, a morte celular pode ocorrer por alterações do

sistema respiratório da célula. Existem antibióticos que se ligam aos constituintes normais da membrana provocando desordem funcional. Estes são os mecanismos de ação das polimixinas e tirotricina (YAO& MOELLERING, 2007).

2.6.3. Interferência na replicação do DNA

Quando as duas fitas da dupla hélice de DNA (ácido desoxirribonucléico) são separadas, cada uma pode servir como um molde para síntese de uma nova fita complementar, produzindo duas novas fitas idênticas com orientação antiparalela. Este processo é chamado replicação e é feito por polimerases.

Na replicação, ocorrem dois fenômenos físicos: a desnaturação e a renaturação da dupla fita, ou seja, fusão da dupla fita realizada principalmente pela topoisomerase, e reanelamento formando uma nova fita (WAGA& STILLMAN, 1998). Antibióticos que têm como mecanismo de ação interferir na replicação do DNA atuam, na grande maioria das vezes, ligando-se à topoisomerase, como no caso das quinolonas e do ácido nalidíxico (HARDY& COZZARELLI, 2003).

2.6.4. Interferência na síntese protéica

A síntese proteica é um processo metabólico, feito a partir de genes cromossômicos que envolve três fases: a iniciação, a extensão e a terminação (NOLLER, 1984). A iniciação envolve a reação que precede a ligação entre o primeiro e o segundo aminoácido que irão formar a proteína. Ocorre então, a ligação do ribossomo à sequência que precede a região codificadora do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) formando um complexo que contém o primeiro aminoacilRNA transportador (tRNA). A molécula de mRNA possui códons, que são sequências específicas formadas por três bases. O tRNA possui anticódons que se ligam aos códons do mRNA. Os códons especificam a

inserção na cadeia peptídica em formação do aminoácido transportado pelo Trna (SACHS, SARNOW, HENTZ, 1997).

A extensão envolve todas as reações com adição de aminoácidos à extremidade carboxila da cadeia polipeptídica em formação. Durante esta etapa, os ribossomos movem-se do 5'terminal ao 3'terminal do mRNA que está sendo traduzido. Este processo chama-se translocação. A formação das ligações peptídicas é catalisada pela peptidiltransferase (SACHS, SARNOW, HENTZ, 1997).

A terminação é feita por um códon de terminação e é seguida respectivamente pela liberação da proteína sintetizada e pela dissociação do ribossomo e do mRNA (SACHS, SARNOW, HENTZ, 1997).

A síntese protéica pode sofrer interferência em várias fases, como na formação dos RNA (RNA mensageiro, RNA ribossomal e RNA de transporte), na fixação do mRNA ou do tRNA ao ribossomo. A interferência na síntese dos RNA é observada com as rifampicinas, que se ligam de maneira irreversível à RNA polimerase. Já o cloranfenicol atua ligando-se à fração 30S do ribossomo, impedindo a ligação do tRNA, inibindo a ação da peptidil transferase. As lincosaminas (clindamicina e lincomicina) atuam da mesma maneira que o cloranfenicol e o tiafenicol, porém ligam-se à porção 50S. As tetraciclinas ligam-se à fração 30S impedindo a ligação do tRNA e consequentemente o aporte de aminoácidos. Os macrolídeos ligam-se também a porção 50S inibindo a translocação do tRNA e bloqueando a união dos aminoácidos na formação da cadeia peptídica (YAO & MOELLERING, 2007). A tabela 1 mostra os principais agentes antimicrobianos e seus respectivos sítios de ação para atividade frente aos microorganismos.

Tabela 1 - Mecanismos de ação dos antimicrobianos.

Agente	Sítio de ação	Efeito
beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos (aztreonam)	Parede Celular: proteínas ligadoras de penicilina (PBPs).	Inibe a transpeptidação, impede a síntese da parede celular.
Vancomicina, Teicoplanina	Parede celular: terminal D-alanil- Dalaninado pentapeptídeo precursor do peptideoglicano	Inibe a polimerização dos sacarídeos precursores de peptideoglicano(transglicosilação) impede a síntese da parede celular
Aminoglicosídeos	Síntese proteica: subunidade 30s do ribossomo	Inibe o alongamento do peptídeo, causa leitura errada do código genético, inibe a síntese proteica.
Tetraciclina	Síntese proteica: subunidade 30s do ribossomo.	Inibe a ligação com t RNA, inibe a síntese de proteica.
Cloranfenicol	Síntese proteica: subunidade 50s do ribossomo.	Bloqueia a ligação amino-acil do tRNA.
Macrolídeos	Síntese proteica: subunidade 50s do ribossomo	Bloqueia a transferência do aminoácido ao peptídeo, inibe a síntese proteica.
Clindamicina	Clindamicina Síntese proteica subunidade ribossomo 50s	Bloqueia a transferência do aminoácido ao peptídeo, inibe a síntese proteica.
Quinupristina, Dalfopristina	Síntese proteica: subunidade 50s do ribossomo.	Bloqueia a extrusão de cadeias Peptídicas, inibe a síntese proteica
Oxazolidinas (linezolida)	Síntese proteica: subunidade 50s do ribossomo.	Bloqueia a formação do complexo de iniciação 70s, inibe a síntese proteica.
Rifampicina	Síntese do ácido nucléico: subunidade B do DNA dependente RNA polimerase	Inibe a síntese do RNA
Metronidazol	Síntese do ácido nucléico	Causa danos aos ácidos nucléicos, inibe a síntese do DNA.
Quinolonas	Síntese do ácido nucléico: DNA girase e topoisomerase IV	Dificultam o espiralamento do DNA, inibe a síntese do DNA.
Sulfonamidas	Síntese do ácido fólico diidropteroato sintetase	Inibição competitiva com a síntese do diidrofolato para ácido <i>p</i> -aminobenzóico, pteroato e ácido glutâmico.
Trimetoprim	Síntese do ácido fólico Dihidrofolato redutase	Inibe redução do diidrofolato ao ácido Tetrahidrofólico.

Fonte: Craig WA 2004.

2.6.5 Citotoxicidade *in vitro*

O Alamar Blue é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Em células com proliferação o Alamar Blue é reduzido. A forma oxidada é azul e não-fluorescente (indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea e fluorescente (indicando célula viável).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994) com o intuito de analisar a viabilidade celular das células da linhagem MRC-5 na presença de diferentes concentrações das substâncias testadas. As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM alta glicose completo, e para o teste transferidas para placas de 96 poços na concentração celular de $0,5 \times 10^4$ células/ poço. A placa foi então mantida em cultura por 24 h em incubadora de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂. Após este tempo, foram adicionadas as amostras nas devidas concentrações supramencionadas e a placa permaneceu em cultura por 24 horas nas mesmas condições. O grupo controle negativo recebeu no poço somente meio de cultura e como controle positivo de fármaco padrão de morte foi utilizado Doxorrubicina nas concentrações de 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 e 20 µM. Decorrido 24h de tratamento, foi acrescentado dez microlitros da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% -1:20 em meio de cultura sem soro fetal bovino) em cada poço da placa. Após 3 h de metabolização de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa meia hora antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de microplaca Elisa (marca Beckman e Coulter). Os dados foram analisados em relação ao controle utilizando o Programa de estatística GraphPad Prisma versão 5.0.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar a produção e identidade de substâncias inibidoras do crescimento *S. aureus* MRSA produzidas por *Paecilomyces* H59.

3.2. Específicos

- Caracterização taxonômica de *Paecilomyces* H59.
- Estudar a influência das condições de cultivo e nutricionais na produção das substâncias antimicrobianas.
- Realizar o isolamento químico das substâncias com atividade antimicrobiana.
- Verificar a citotoxicidade *in vitro* da substância isolada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma a seguir (Figura 1) apresenta as principais etapas do presente projeto de pesquisa.

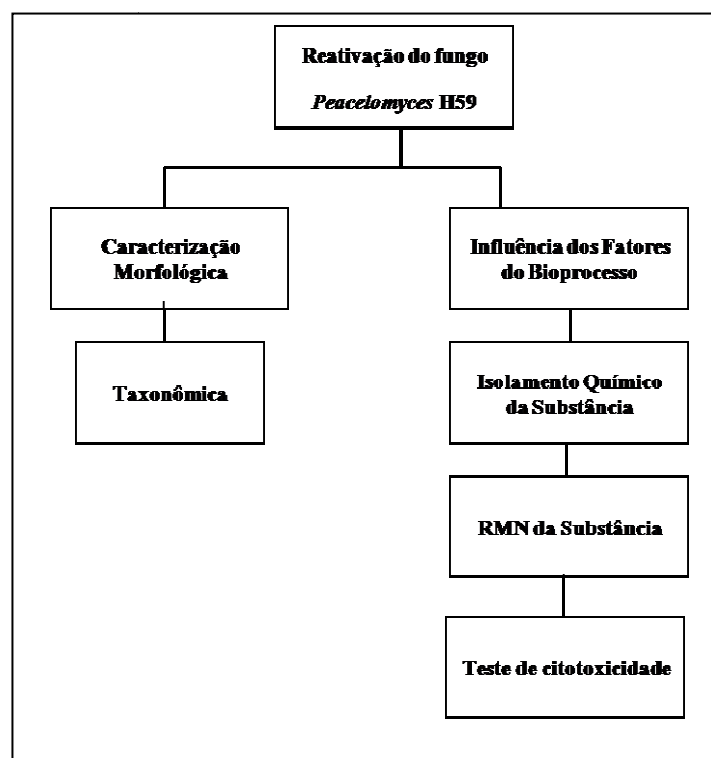


Figura 1. Fluxo das atividades realizadas no presente trabalho.

4.1 Micro-organismo

O isolado H59, foi obtido da Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA, e mantido em meio BDA e armazenado em geladeira a 4°C.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do fungo H59 foi utilizado o microrganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina - MRSA), no qual foi mantido em meio Agar nutriente (NA – 5,0 g/L de peptona; 3,0 g/L de extrato de carne e 10% de glicerol).

4.2 Procedimentos

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foi calculado a média e o desvio padrão para cada uma das determinações realizadas.

4.2.1 Taxonomia do isolado H59

O isolado H59 foi semeado em tubo de ensaio contendo meio de cultivo batata dextrose ágar – BDA (MERCK®) e incubado a $\pm 26^{\circ}\text{C}$ por 7 dias para ser avaliado macro e micro-morfológicamente.

Na análise macromorfológica, o isolado foi semeado em um ponto central de uma camada de ágar distribuído em placa de Petri. Realizando-se uma observação da morfologia da colônia: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, analisando também a velocidade de crescimento.

Para a análise micromorfológica, um fragmento de ágar BDA (20 x 20 x 10 mm) foi semeado com o fungo e colocado sob uma lamínula estéril (22 x 22 mm). Esse fragmento foi incubado em uma placa de Petri a 26°C por ± 14 dias. Após esse período, a lamínula foi retirada com o auxílio de uma pinça, cuidadosamente, e sobre a lâmina estéril foi adicionado uma gota de corante azul de lactofenol-algodão. As estruturas foram visualizadas em microscópio óptico com objetiva de 40 x (RIDELL, 1950).

4.2.2 Influências das condições de cultivo e nutricionais na produção das substâncias antimicrobianas

O bioprocesso foi realizado em erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de caldo Czapek: Nitrato de sódio (3g/L); Fosfato monobásico de potássio (1,3 g/L); Cloreto de potássio (0,5 g/L); Sulfato de magnésio (0,5 g/L); Sulfato ferroso (0,01 g/L); Sacarose

(30 g/L). A esse meio foi inoculado com 1×10^4 esporos/mL do fungo *Paecilomyces* H59 e incubados por 14 dias, em condições estáticas, realizando-se os testes em triplicatas e em diferentes erlenmeyers, mantendo os bioprocessos em condições estáticas por 15 dias e temperatura ambiente.

A constituição nutricional dos meios de cultivo também foi investigada. Os bioprocessos foram realizados como descrito anteriormente, no entanto, foram avaliados, de forma univariada, a influência do tipo de fonte de carbono [30g/L] (Sacarose, Glicose, Frutose, Galactose, Arabinose, Ramnose e Xilose), da fonte de nitrogênio [3 g/L] (Nitrato de sódio, Peptona, Extrato de malte, extrato de levedura e glutamato monossódico).

A influência das condições de cultivo foi investigada na produção de substância com atividade antimicrobiana. Os bioprocessos foram realizados como descrito no parágrafo anterior, no entanto, foi avaliada, de forma univariada, a influência do tamanho de inóculo (10^2 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^8), pH's (3, 5, 7 e 9), agitação orbital (0, 50, 100 e 150 rpm) .

Após o tempo determinado de cada processo, os concentrados foram submetidos à filtração (filtro qualitativo tipo celulose Whatman nº 4). O filtrado foi esterilizado por microfiltração em membrana de 0,22 μ m (Millipore) e submetido aos ensaios de atividade antimicrobiana em difusão em ágar por poço, (VALGAS, 2007).

4.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana

O método de difusão em ágar por poço foi realizado conforme Valgas (2007). Foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no meio de cultura ágar MH em placas de Petri. Para a preparação do inóculo bacteriano com turvação de 0,5 da escala de MacFarland, foi utilizado o aparelho espectrofotômetro (QUIMIS®) e semeado na superfície do ágar

Mueller Hinton (MERCK®), 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 30 µg de vancomicina para *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA). Para o controle negativo, foi utilizado água.

4.2.4 Técnica de bioautografia em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) pelo método do ágar-overlay

Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizadas inicialmente as fases DCM e AcOEt obtidas a partir do caldo de *Paecilomyces* H59, assim como a fração obtida por LIMA, 2016 (Fração H59) e posteriormente as frações reunidas de 5 - 9 obtidas do fracionamento da fase DCM. Para isto as amostras foram aplicadas em cromatoplasas de sílica G 60 F254 de 7 x 10 cm, aplicou-se 10µL de cada fase (DCM, AcOEt e H59) na concentração de 1 mg/mL, reservando uma área para a aplicação do controle positivo: solução de vancomicina (30 µg/mL). Para avaliação das frações de 5-9 obtidas da fase DCM foram aplicadas 10 µL na concentração de 33,3 µg/mL. A eluição foi realizada no sistema diclorometano/acetato de etila (20:80 – v/v). Após a eluição, as placas foram deixadas na bancada durante um período de 1h para total evaporação do solvente utilizado, as cromatoplasas foram colocadas em placas de Petri (20 x 100 mm de diâmetro) estéreis, as quais foram coberta com aproximadamente 10 mL do meio ágar Müller Hinton, liquefeito a 45 °C, no qual previamente tinha sido adicionado 1200 µL de uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2 mg/mL) por cada 40 mL de meio ágar. Após a solidificação do meio, foi preparado o inóculo bacteriano com turvação de 0,5 da escala de MacFarland, para o qual foi utilizado o aparelho espectrofotômetro (QUIMIS®) obtendo-se uma absorbância entre 0.08 e 0.10 a 625 nm o

que equivale a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL, e semeado sobre a placa. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 24 horas. A atividade foi detectada através da formação do halo de inibição (esbranquiçado) contra um fundo roxo (SAXENA, 1995).

4.2.5 Isolamento químico das substâncias com atividade antimicrobiana

Para o isolamento das substâncias produzidas por *Paecilomyces* H59 foi realizado um bioprocessamento nas condições otimizadas para obtenção de um volume contendo os antimicrobianos, esse volume foi submetido à extração líquido-líquido (partição) com os solventes diclorometano (DCM) - (NUCLEAR®) e acetato de etila (AcOEt) - (SYNTH®) e após evaporação dos solventes as fases foram analisadas em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Cada fração obtida foi solubilizada com 1 mL de AcOEt e aplicados aproximadamente 10 µL na superfície da placa cromatográfica de Sílica gel G60 F254 com superfície oposta de alumínio (5 cm x 5 cm) e então desenvolvida com 5 mL do sistema diclorometano/acetato de etila (20:80 – v/v). As placas cromatográficas foram reveladas com luz ultravioleta (254nm / 365nm) e anisaldeído sulfúrico.

Após análises a fase DCM foi fracionada por coluna cromatográfica aberta (CCA) em Sílica gel como fase estacionária ($h \times \varnothing = 15,5 \times 0,8$ cm) (Sigma-Aldrich® G60 F254), e eluída com 35 mL de diclorometano/acetato de etila (9:1), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (8:2), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (6:4), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (1:1), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (4:6), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (3:7), 25 mL de acetato de etila 100%, 25 mL de metanol 100%. Obtendo-se 38 frações, as quais após a evaporação dos solventes foram submetidas a análise por (CCDC) observando-se a semelhança das frações 5 a 9

quando reveladas com luz ultravioleta (254nm / 365nm) e anisaldeído sulfúrico pelo qual foram reunidas. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4.2.6 Identificação das substâncias isoladas

A identificação/caracterização das amostras foi realizada por meio das análises dos espectros de RMN no aparelho Bruker Fourier 300; os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz de ^1H e de ^{13}C (mono e bidimensionais) e LC/EM realizadas em aparelho micrOTOF-Q, da Bruker Daltonics, as quais foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais – LTQPN do INPA.

4.2.7 Citotoxicidade *in vitro*

Células: As linhagens celulares utilizadas foram MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) cultivadas em meio de cultivo DMEM alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, mantidas em incubadora de CO_2 a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 .

Amostra: A amostra foi solubilizada em meio de cultura DMEN alta glicose e testado nas concentrações decrescentes 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho encontram-se expostos na forma de artigo, que será submetida à revista International Journal of Microbiology.

Produção e Identificação de Substâncias Produzidas por *Paecilomyces* H59, Inibidoras do Crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA

Sara Jéssica T. de Andrade,¹ João V. B. Souza,² Ana C. A. Cortez², Cecília Veronica Nunez³, Maria Teresa Fachin Espinar³, Rodrigo Ribeiro Cruz Santos¹, Lilian Ferrari de Freitas² Ralyvan A. dos Santos²

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Av. General Rodrigo Octavio Jordão, 1200, 69067-005, Amazonas, Brasil.

²Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Av. André Araújo, 2936, 69080-971, Amazonas, Brasil.

³Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, 69067-375, Manaus.

E-mail: João V. B. d. Souza; joao.souza@inpa.gov.br

Resumo

Staphylococcus aureus é um patógeno humano oportunista mais frequentemente associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. Esse organismo é extremamente adaptável e ao longo de um curto espaço de tempo desenvolveu estratégias de resistências aos antimicrobianos, dessa forma, a bioprospecção de novas drogas capazes de inibir *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina-MRSA é um importante campo para o desenvolvimento de pesquisas. Nesse contexto, recentemente, no laboratório de micologia – INPA foi identificado uma linhagem fúngica, *Paecilomyces* H59 produtora de substâncias capazes de inibir o MRSA. Diante dessa descoberta, o objetivo do estudo foi investigar a produção e caracterização de substância com atividade inibitória frente à MRSA produzida por *Paecilomyces* H59. A estratégia metodológica para alcançar esse objetivo incluiu: a) Caracterização taxonômica de *Paecilomyces* H59; b) Otimização da produção de substâncias ativas por bioprocessamento submerso e c) Isolamento e identificação das substâncias ativas frente ao MRSA. A caracterização taxonômica de *Paecilomyces* H59 demonstrou todas as estruturas fúngicas relatadas em literatura identificando-o como pertencente ao gênero supracitado. Os fatores ajustados para a maior produção dos antimicrobianos foram: a) uso da glicose como fonte de carbono; b) qualquer fonte de nitrogênio testada; c) pH 5, d) inóculo 1×10^5 e ausência de agitação orbital. No isolamento e identificação das substâncias ativas as análises da espectrometria de massas com ionização por *Eletronspray* (ESI-EM) das fases DCM e AcOEt (frações 5-9) demonstram picos

majoritários e semelhantes com a massa de 155 m/z fórmula molecular $C_7H_7O_4$, sugerindo-se que seja esse o responsável pela atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina - MRSA. E verificar a citotoxicidade *in vitro* da substância isolada pelo método de Alamar Blue. Os resultados desse trabalho indicam que a bioprospecção de substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por *Paecilomyces*H59 é uma alternativa para pesquisa e desenvolvimento de novas drogas com atividade antimicrobiana, sendo vital para proteger a saúde humana frente a bactérias multirresistentes. Pacientes, médicos e a indústria farmacêutica possuem grande interesse nessa abordagem.

Palavras chaves: Resistência bacteriana, Bioprospecção e Fungos Amazônicos.

1 Introdução

O *Staphylococcus aureus* é tanto uma bactéria comensal quanto um patógeno humano. Aproximadamente 30% da população humana são colonizadas por *S. aureus* (WERTHEIM et al., 2005). Simultaneamente, é uma das principais causas de bacteremia e endocardite infecciosa (EI), bem como osteoarticular, pele e tecidos moles e pleuropulmonar (COATES et al., 2014; STRYJEWSKI et al., 2014).

O tratamento de infecções para *Staphylococcus aureus* por muitos anos foi realizado com o uso terapêutico da metilicina, contudo, devido à administração indevida, surgiram cepas resistentes a esta droga e passaram a ser denominadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA). Essa resistência se deve a aquisição do gene *mecA*, que codifica uma PBP (proteína ligadora de penicilina) mutada, impedindo a ligação da droga na parede celular bacteriana (FUDA et al., 2005).

A frequência de infecções ocasionadas por MRSA tem apresentado crescimento contínuo em instituições hospitalares a nível mundial, causando mais de 100 mil infecções a cada ano (BURKE, 2003; DE LENCASTRE et al., 2007; COHEN et al., 2008;). Tradicionalmente, as infecções causadas pelo MRSA estavam limitadas aos hospitais (HA-MRSA); mas, nos últimos anos, as infecções associadas ou adquiridas na

comunidade (CA-MRSA) estão sendo documentadas de forma crescente em todo o mundo. A bioprospecção de substâncias inibidoras do crescimento de *S. aureus* - MRSA é uma das possibilidades de contornar essa problemática e a literatura apresenta diversos trabalhos com esses objetivos.

O fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus*, isolado de larvas de insetos, foi estudado por (LANG et al., 2005), onde foi isolado e identificado metabólitos denominado Paecilosetina 1, ativo contra *Bacillus subtilis*, *Cladosporium resinae* e *Trichophyton mentagrophytes*. Outra espécie fúngica com o potencial produtor de substância ativa é o fungo endofítico de mangue *Paecilomyces variotii* (FEL 32), estudado por (SILVA et al., 2013) onde identificaram a produção da substância Viriditoxina (dímero – 6'6binafta-a-piranona, - C₃₄H₃₀O₁₄) responsável pela antimicrobiana frente a: *Micrococcus* sp. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. *S. aureus* coagulase negativa.

Paeciloside A foi isolada de culturas de *Paecilomyces* sp. (CAFT156), um fungo endofítico que ocorre em *Enantia chlorantha* Oliv (Annonaceae). Sua estrutura foi elucidada usando experimentos de RMN, MS, UV, 1D e 2D, com subsequente Análise de difração de raios X usando radiação K α de cobre. Paeciloside A, apresentou efeitos inibitórios sobre duas bactérias gram-positivas, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (TALONTSI et al., 2012)

A floresta amazônica possui grande diversidade e ciclagem de carbono muito veloz demonstrando ser local adequado para realização de estudos de bioprospecção. Recentemente, Lima (2016) investigou a bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos isolados de amostras do solo Amazônico. Esse autor identificou um isolado, *Paecilomyces*H59 como produtor de substâncias antimicrobianas frente a *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA). No entanto, essas substâncias foram apenas

parcialmente identificadas de forma que ainda são necessários estudos de identificação taxonômica de *Paecilomyces*H59, avaliação dos fatores de bioprocessos que possuem influência na produção dessas substâncias e ainda caracterização química das substâncias ativas. Desta forma o objetivo deste trabalho foi investigar a produção e caracterização de substância com atividade inibitória frente à *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) produzida por *Paecilomyces*H59.

2 Materiais e Métodos

2.1 Micro-organismo

O isolado H59, foi obtido da Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA, e mantido em meio BDA e armazenado em geladeira a 4°C.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do fungo H59 foi utilizado o microrganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina - MRSA), no qual foi mantido em meio Agar nutriente (NA – 5,0 g/L de peptona; 3,0 g/L de extrato de carne e 10% de glicerol).

2.2 Taxonomiado isolado H59

O isolado H59 foi semeado em tubo de ensaio contendo meio de cultivo batata dextrose ágar – BDA (MERCK®) e incubado a +/- 26°C por 7 dias para ser avaliado macro e micro-morfologicamente.

Na análise macromorfológica, o isolado foi semeado em um ponto central de uma camada de ágar distribuído em placa de Petri. Realizando-se uma observação da morfologia da colônia: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, Analisando também a velocidade de crescimento.

Para a análise micromorfológica, um fragmento de ágar BDA (20 x 20 x 10 mm) foi semeado com o fungo e colocado sob uma lamínula estéril (22 x 22 mm). Esse fragmento foi incubado em uma placa de Petri a 26 °C por +/- 14 dias. Após esse período, a lamínula foi retirada com o auxílio de uma pinça, cuidadosamente, e sobre a lâmina estéril foi adicionado uma gota de corante azul de lactofenol-algodão. As estruturas foram visualizadas em microscópio óptico com objetiva de 40x (RIDELELL, 1950).

2.3 Influências das condições de cultivo e nutricionais na produção das substâncias antimicrobianas

O bioprocesso foi realizado em erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de caldo Czapek: Nitrato de sódio (3g/L); Fosfato monobásico de potássio (1,3 g/L); Cloreto de potássio (0,5 g/L); Sulfato de magnésio (0,5 g/L); Sulfato ferroso (0,01 g/L); Sacarose (30 g/L). A esse meio foi inoculado com 1×10^4 esporos/mL do fungo *Paecilomyces* H59 e incubados por 14 dias, em condições estáticas, realizando-se os testes em triplicatas e em diferentes erlenmeyers, mantendo os bioprocessos em condições estáticas por 15 dias e temperatura ambiente.

A constituição nutricional dos meios de cultivo também foi investigada. Os bioprocessos foram realizados como descrito anteriormente, no entanto, foram avaliados, de forma univariada, a influência do tipo de fonte de carbono [30g/L] (Sacarose, Glicose, Frutose, Galactose, Arabinose, Ramnose e Xilose), da fonte de nitrogênio [3 g/L] (Nitrato de sódio, Peptona, Extrato de malte, extrato de levedura e glutamato monossódico).

A influência das condições de cultivo foi investigada na produção de substância com atividade antimicrobiana. Os bioprocessos foram realizados como descrito no parágrafo anterior, no entanto, foi avaliada, de forma univariada, a influência do tamanho

de inóculo (10^2 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^8), pH's (3, 5, 7 e 9), agitação orbital (0, 50, 100 e 150 rpm) .

Após o tempo determinado de cada processo, os concentrados foram submetidos à filtração (filtro qualitativo tipo celulose Whatman nº 4). O filtrado foi esterilizado por microfiltração em membrana de 0,22 μ m (Millipore) e submetido aos ensaios de atividade antimicrobiana em difusão em ágar por poço, (VALGAS, 2007).

2.4 Determinação da atividade antimicrobiana

O método de difusão em ágar por poço foi realizado conforme Valgas (2007). Foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no meio de cultura ágar MH em placas de Petri. Para a preparação do inóculo bacteriano com turvação de 0,5 da escala de MacFarland, foi utilizado o aparelho espectrofotômetro (QUIMIS®) e semeado na superfície do ágar Mueller Hinton (MERCK®), com o uso de um swab estéril. Foram adicionadas alíquotas de 100 μ L do filtrado de cultura dos fungos nos poços devidamente identificados. Para o controle positivo de formação do halo de inibição, foram utilizados 30 μ g de vancomicina para *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA). Para o controle negativo, foi utilizados água.

2.5 Técnica de bioautografia em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) pelo método do ágar-overlay

Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizadas inicialmente as fases DCM e AcOEt obtidas a partir do caldo de *Paecilomyces* H59, assim como a fração obtida por LIMA (2016) (Fração H59) e posteriormente as frações reunidas de 5 - 9 obtidas do fracionamento da fase DCM. Para isto as amostras foram aplicadas em cromatoplasas de

sílica G 60 F254 de 7 x 10 cm, aplicou-se 10 µL de cada fase (DCM, AcOEt e H59) na concentração de 1 mg/mL, reservando uma área para a aplicação do controle positivo: solução de vancomicina (30 µg/mL). Para avaliação das frações de 5-9 obtidas da fase DCM foram aplicadas 10 µL na concentração de 33,3 µg/mL. A eluição foi realizada no sistema diclorometano/acetato de etila (20:80 – v/v). Após a eluição, as placas foram deixadas na bancada durante um período de 1h para total evaporação do solvente utilizado, as cromatoplasmas foram colocadas em placas de Petri (20 x 100 mm de diâmetro) estéreis, as quais foram cobertas com aproximadamente 10 mL do meio ágar Müller Hinton, liquefeito a 45 °C, no qual previamente tinha sido adicionado 1200 µL de uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2 mg/mL) por cada 40 mL de meio ágar. Após a solidificação do meio, foi preparado o inóculo bacteriano com turvação de 0,5 da escala de MacFarland, para o qual foi utilizado o aparelho espectrofotômetro (QUIMIS®) obtendo-se uma absorbância entre 0.08 e 0.10 a 625 nm o que equivale a uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL, e semeado sobre a placa. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 24 horas. A atividade foi detectada através da formação do halo de inibição (esbranquiçado) contra um fundo roxo (SAXENA, 1995).

2.6 Isolamento químico das substâncias com atividade antimicrobiana

Para o isolamento das substâncias produzidas por *Paecilomyces* H59 foi realizado um bioprocessamento nas condições otimizadas para obtenção de um volume contendo os antimicrobianos, esse volume foi submetido à extração líquido-líquido (partição) com os solventes diclorometano (DCM) - (NUCLEAR®) e acetato de etila (AcOEt) - (SYNTH®) e após evaporação dos solventes as fases foram analisadas em cromatografia

em camada delgada comparativa (CCDC). Cada fração obtida foi solubilizada com 1 mL de AcOEt e aplicados aproximadamente 10 µL na superfície da placa cromatográfica de Sílica gel G60 F254 com superfície oposta de alumínio (5 cm x 5 cm) e então desenvolvida com 5 mL do sistema diclorometano/acetato de etila (20:80 – v/v). As placas cromatográficas foram reveladas com luz ultravioleta (254nm / 365nm) e anisaldeído sulfúrico.

Após análises a fase DCM foi fracionada por coluna cromatográfica aberta (CCA) em Sílica gel como fase estacionária (h x Ø = 15,5 x 0.8 cm) (Sigma-Aldrich® G60 F254), e eluída com 35 mL de diclorometano/acetato de etila (9:1), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (8:2), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (6:4), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (1:1), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (4:6), 25 mL de diclorometano/acetato de etila (3:7), 25 mL de acetato de etila 100%, 25 mL de metanol 100%. Obtendo-se 38 frações, as quais após a evaporação dos solventes foram submetidas a análise por (CCDC) observando-se a semelhança das frações 5 a 9 quando reveladas com luz ultravioleta (254nm / 365nm) e anisaldeído sulfúrico pelo qual foram reunidas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.7 Identificação das substâncias isoladas

A identificação/caracterização das amostras foi realizada por meio das análises dos espectros de RMN no aparelho Bruker Fourier 300; os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz de ^1H e de ^{13}C (mono e bidimensionais) e LC/EM realizadas em aparelho micrOTOF-Q, da Bruker Daltonics, as quais foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais – LTQPN do INPA.

2.8 Teste de citotoxicidade (Método Alamar blue)

Células: As linhagens celulares utilizadas foram MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) cultivadas em meio de cultivo DMEM alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostra: A amostra foi solubilizada em meio de cultura DMEN alta glicose e testado nas concentrações decrescentes 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 e 50 µg/mL.

3 Resultados

3.1 *Paecilomyces* H59

Com a finalidade de investigar a taxonomia de *Paecilomyces* H59 foram realizados ensaios macro e micromorfológicos. Quanto à macromorfologia, *Paecilomyces* H59 apresentou: a) colônias em BDA atingindo um diâmetro de 6 cm em 14 dias; b) micélio em forma de feltro densamente emaranhado de crescimento excessivo apresentando micélio aéreo; c) verso e reverso de coloração verde-oliva; d) odor e exsudato não pronunciados. Quanto aos aspectos micromorfológicos, *Paecilomyces* H59 apresentou: a) Hifas vegetativas hialinas de paredes lisas; b) conidióforos de paredes lisas, hialinos, consistindo de ramos curtos repetidamente ramificados; c) uma ou duas fiálides mais alongadas; d) conídios de tamanhos diferentes, mais ou menos elipsoidais hialinos ocorrendo em grandes cadeias lineares. Portanto, confirmou-se que o isolado em questão demonstra pertencer ao gênero *Paecilomyces* (figura 2).

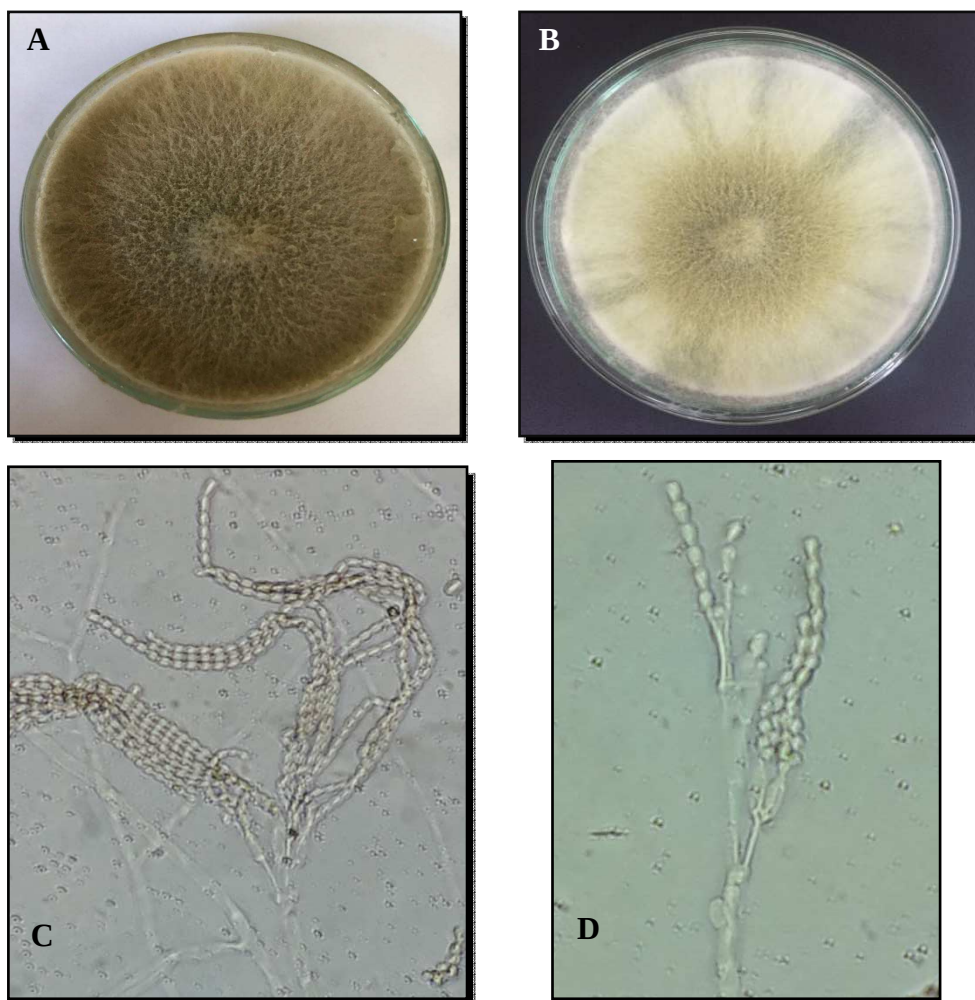


Figura 2 - Imagens macromorfológica e micromorfológicas do isolado *Paecilomyces*H59:A) Verso da placa, B) Reverso da placa, C e D) Morfologia dos conidióforos, fiálides e conídeos.

3.2 Influência das condições de cultivo e nutricionais

A influência dos fatores de bioprocesso na produção de substâncias antimicrobianas produzidas por *Paecilomyces* H59 foi investigada. Diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas em bioprocessos submersos (Tabela 2). Glicose foi a fonte de carbono mais adequada para a produção de substâncias antimicrobianas por *Paecilomyces* H59. Todas as fontes de nitrogênio investigadas foram adequadas para o bioprocessos.

Tabela 2- Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de substâncias inibidoras do crescimento de MARSA por *Paecilomyces*H59.

FONTE DE CARBONO	Halo frente a <i>S. aureus</i> (mm)
Glicose	24±1
Ramnose	19 ±1
Sacarose	17 ±1
Arabinose	15 ±1
Xilose	14 ±1
Galactose	10±1
Frutose	---

FONTE DE NITROGÊNIO	Halo frente a <i>S. aureus</i> (mm)
Extrato de levedura	18 ±1
Nitrato de sódio	17 ±1
Extrato de malte	16 ±1
Glutamato monossódico	16 ±1
Peptona	15 ±1

3.3 Influência das condições de cultivo na produção de substâncias antimicrobianas (pH, inóculo e agitação)

Foi investigada a influência dos fatores como: tamanho de inóculo, pH inicial, agitação orbital para se obter as concentrações ideais na produção de substâncias antimicrobianas por *Paecilomyces* H59. As análises das influências foram realizadas de forma univariada em bioprocessamento submerso.

O tamanho de inóculo de 1×10^5 células/mL foi o mais adequado para a produção de substâncias antimicrobianas (Tabela 3).

Tabela 3- Influência do tamanho de inóculo na produção de substâncias antimicrobianas.

TAMANHO DO INÓCULO	Halo frente a <i>S. aureus</i> (mm)
1×10^2	7±1
1×10^4	10±1
1×10^5	17 ±1
1×10^6	11±1
1×10^8	11±1

Na análise da influência de pH, o mais adequado para a produção de substâncias antimicrobianas foi o pH 5 (Tabela 4).

Tabela 4- Influência do pH na produção de substâncias antimicrobianas.

pH INICIAL	Halo frente a <i>S. aureus</i> (mm)
3	9±1
5	17±1
7	14±1
9	10±1

Nas condições experimentais, a agitação orbital de 100 rpm foi o mais adequado para a produção de atividade antimicrobiana (Tabela 5).

Tabela 5- Influência da agitação orbital na produção de substâncias antimicrobianas.

AGITAÇÃO ORBITAL (rpm)	Halo frente a <i>S. aureus</i> (mm)
0	14 ±1
50	14±1
100	17±1
150	10±1

3.4 Isolamento e caracterização química da substância com atividade antimicrobiana

Para isolamento das substâncias com atividade antimicrobiana foi realizada uma partição líquido-líquido obtendo-se duas frações, a Diclorometano (DCM) e Acetato de etila (AcOEt). Ambas frações apresentaram atividade antimicrobiana nos testes de difusão em ágar (VALGAS, 2007) (Figura 3) e bioautografia método de imersão - ágar overlay (Figura 4) (SAXENA, 1995).

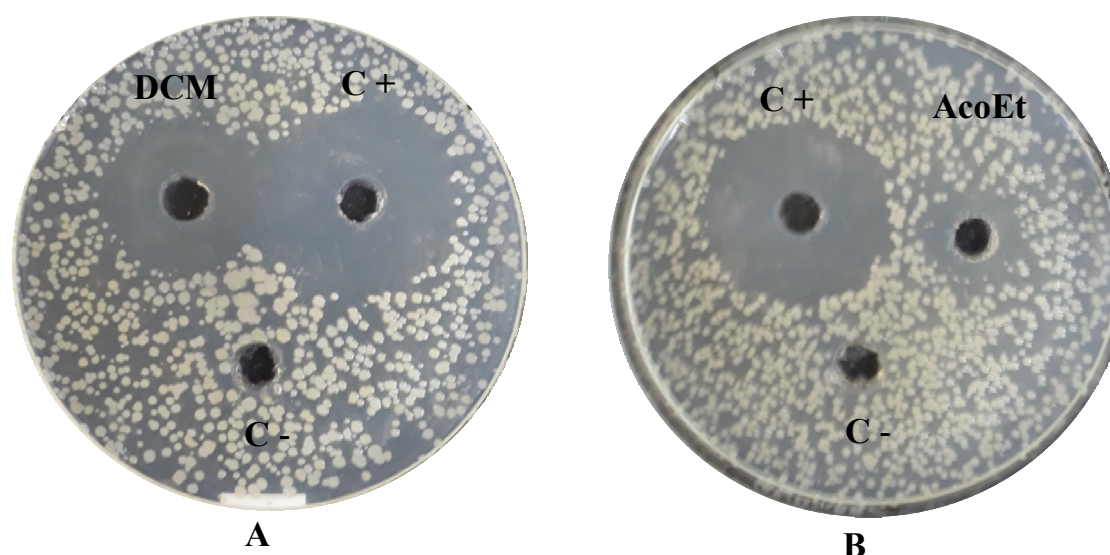


Figura 3 – Resultado da atividade antimicrobiana da fase DCM (A) e AcOEt (B) pelo método de difusão em ágar (formação do halo de inibição em mm), frente a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), controles positivos (C+) vancomicina 30 µg/mL e controles negativos (C-) água.



Figura 4 – Resultado da atividade antimicrobiana da fase DCM, AcOEt e H59 pelo método de imersão (agar overlay) formação do halo de inibição, frente a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e controles positivos (C+) vancomicina.

Com o objetivo de isolar os componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana presentes na fase diclorometano, essa última foi submetida à cromatografia em coluna aberta desenvolvida com os sistemas diclorometano/acetato de etila (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7), AcOEt 100% e MeOH 100% que resultou em 38 frações (Tabela 6). As frações 5-9 foram selecionadas para dar continuidade na investigação, pois apresentaram as substâncias majoritárias, como demonstradas nas CCDs realizadas (Figura 5) e apresentaram atividade antimicrobiana (Figura 6).

Tabela 6: Sistemas de eluição e frações obtidas para cada sistema no fracionamento da fração DCM do isolamento das substâncias produzidas por *Paecilomyces* H59

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM/ AcOEt 9:1	1-4
DCM/ AcOEt 8:2	5-10
DCM/ AcOEt 7:3	11-17
DCM/ AcOEt 6:4	18-24
DCM/ AcOEt 1:1	25-29
DCM/ AcOEt 4:6	30-33
AcOEt 100%	34-36
MeOH 100%	37-38

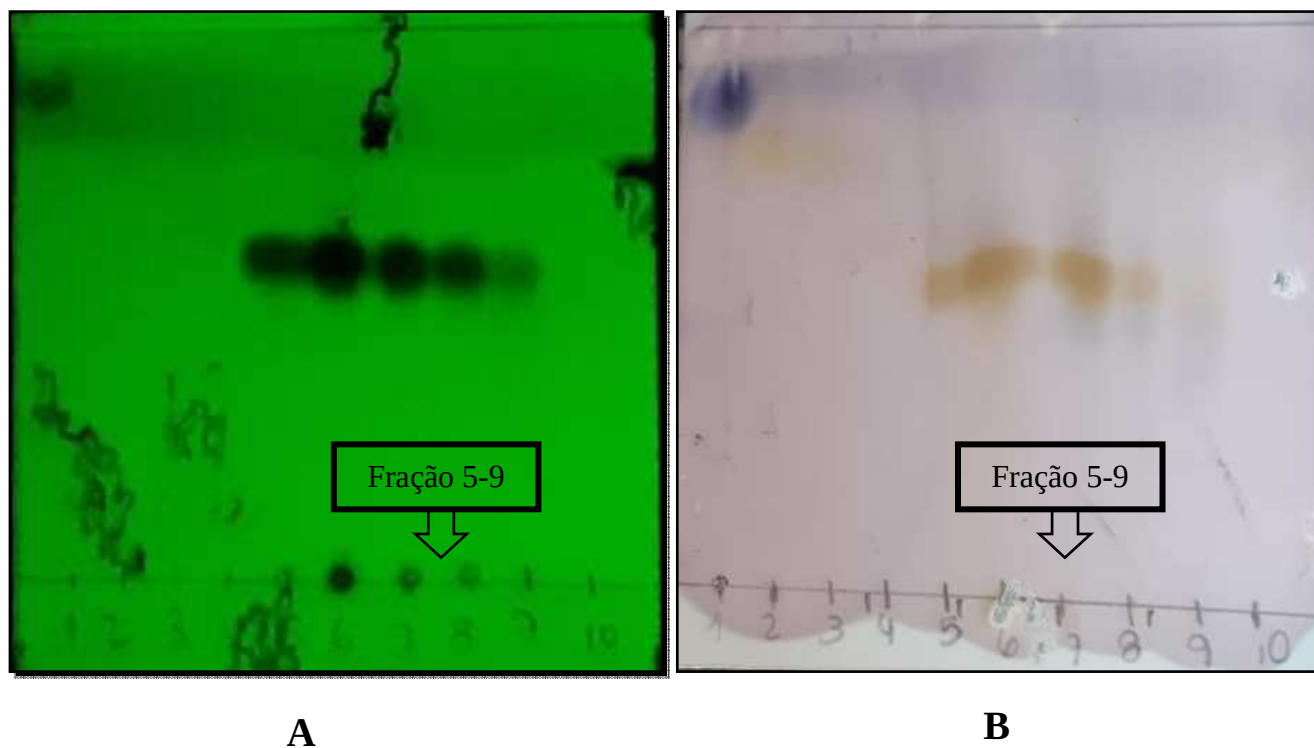


Figura 5- Cromatografia em camada delgada com o sistema de solventes diclorometano (DCM)/acetato de etila (AcOEt) 8:2 – v/v, revelada com luz UV 254 (a) e anisaldeído sulfúrico (b) mostrando as frações separadas (frações 5-9).

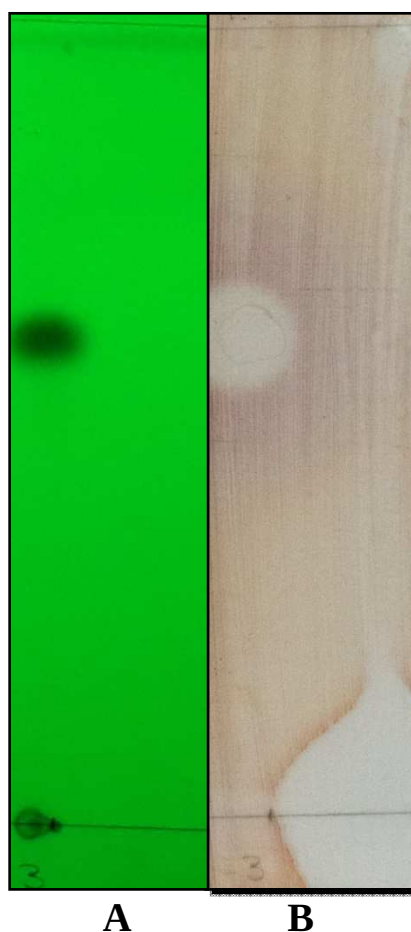


Figura 6 - Cromatografia em camada delgada com o sistema de solventes diclorometano (DCM)/acetato de etila (AcOEt) 8:2 – v/v, revelada com luz UV 254 (a) e ensaio de bioautografia pelo método do agar-overlay (b). Mostrando as frações separadas (frações 5-9).

As fases DCM e AcOEt foram submetidas à análises de espectro de massas com LC/EM (microTOF-Q, da Bruker Daltonics). Na fase DCM observou-se um pico majoritário de 155.0332 m/z, com tempo de retenção em +/- 1.8 minutos no modo positivo (M+H), sugerindo a fórmula molecular $C_7H_7O_4$ (Figura 7). Na fase AcOEt observou-se um pico majoritário de 155.0315 m/z com tempo de retenção em +/- 1.8 minutos também no modo positivo (M+H), sugerindo a fórmula molecular $C_7H_7O_4$ (Figura 8).

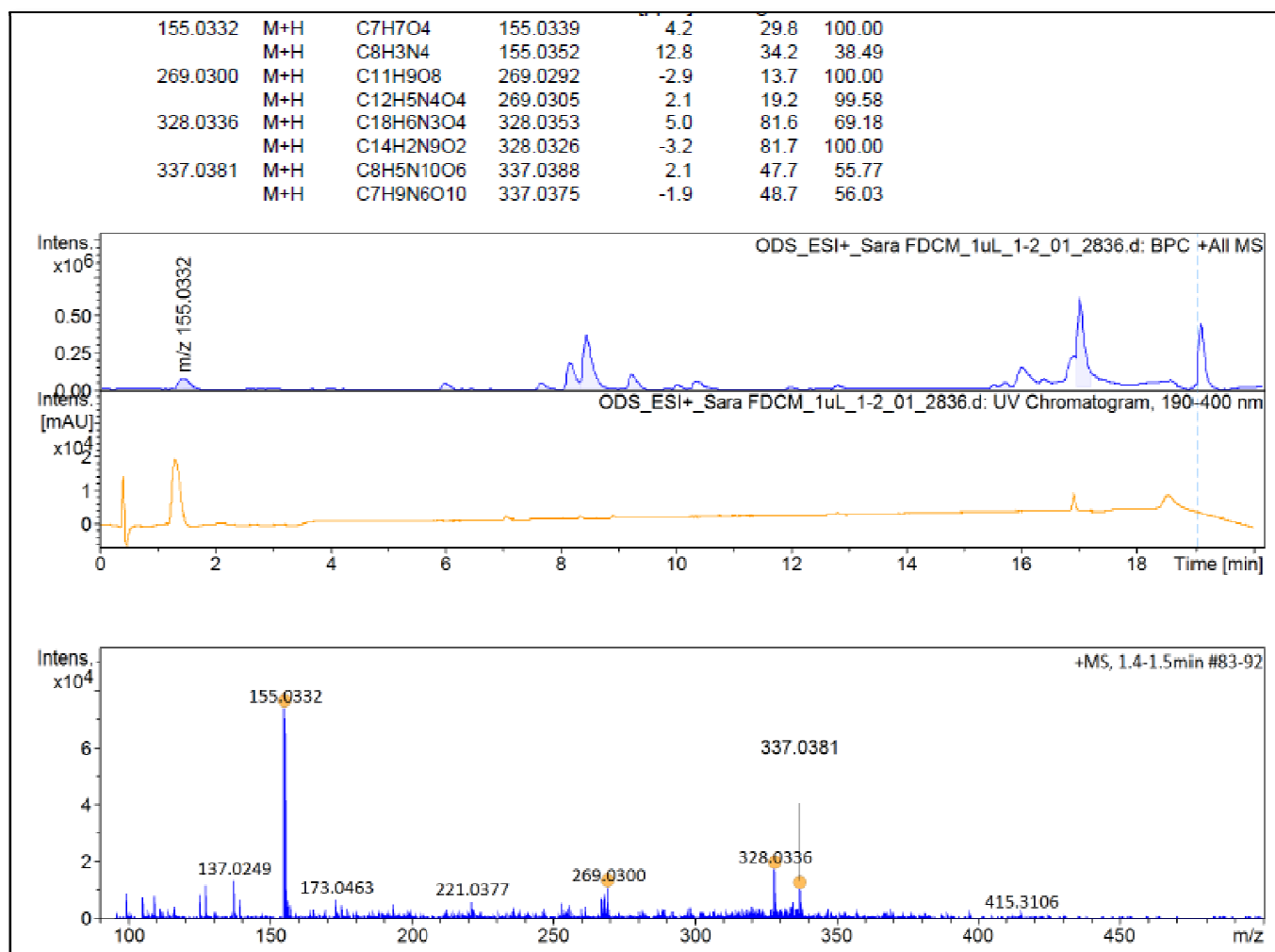


Figura 7- Espectro de massas (ESI+) obtida da fração 5-7 (Fase DCM) do concentrado de cultura do *Paecilomyces*H59.

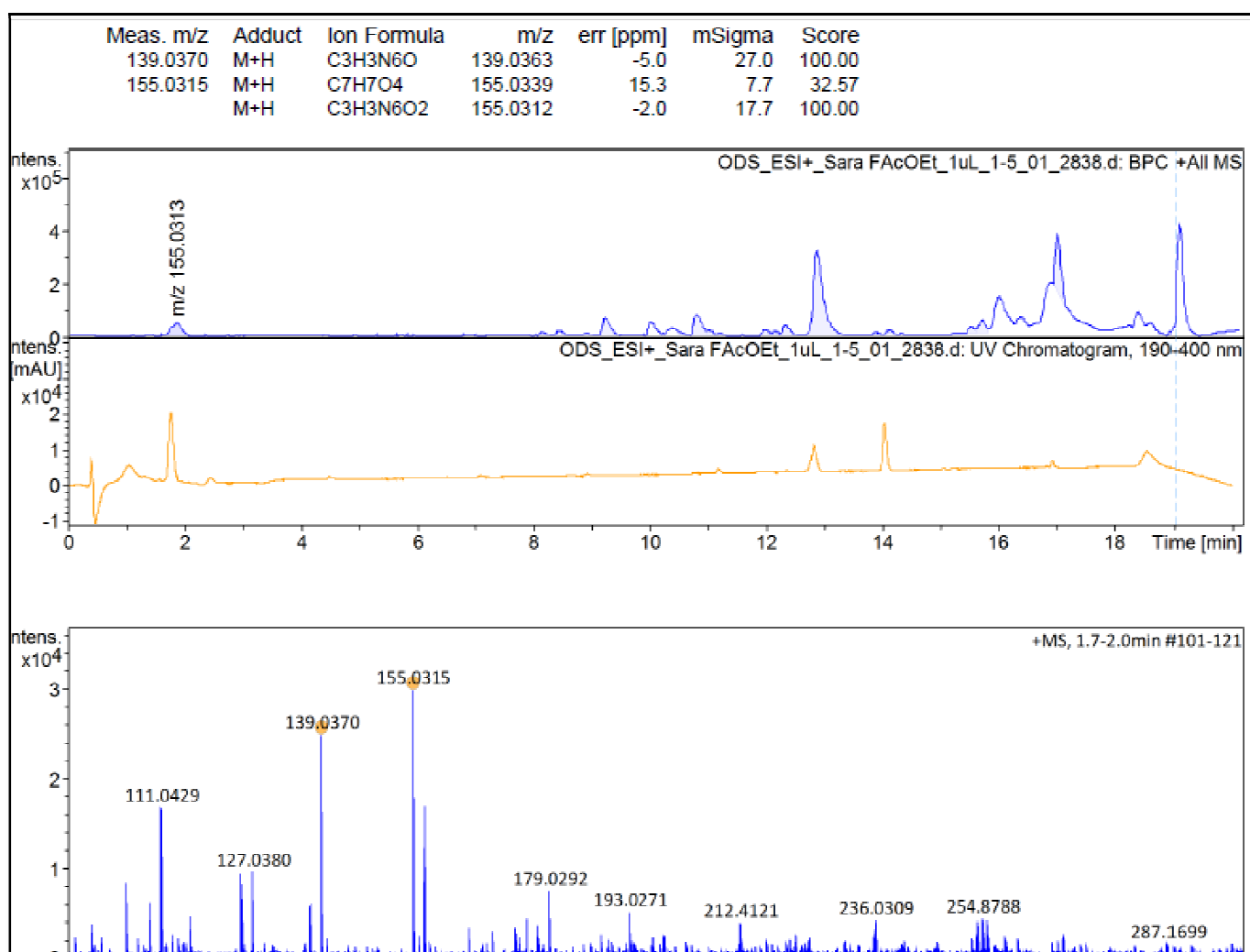


Figura 8 - Espectro de massas (ESI+) obtida da fração 5-7 (Fase AcOEt) do concentrado de cultura do *Paecilomyces* H59.

As frações (5-9) da fase DCM do sistema diclorometano/acetato de etila (8:2 – v/v) foram submetidas à análise de RMN de ^1H (Figura 9 e 10) incluindo os experimentos bidimensionais HSQC E HMBC, sendo que este último encontra-se em processo de análise, para posterior elucidação da substância antimicrobiana.

Os espectros de RMN de ^1H demonstraram similaridade nos deslocamentos de sinais de hidrogênio quando comparados com Lima, 2016. As análises dos espectros bidimensionais de HSQC E HMBC permitirão a confirmação molecular da substância presente com atividade antimicrobiana (Figura 11).

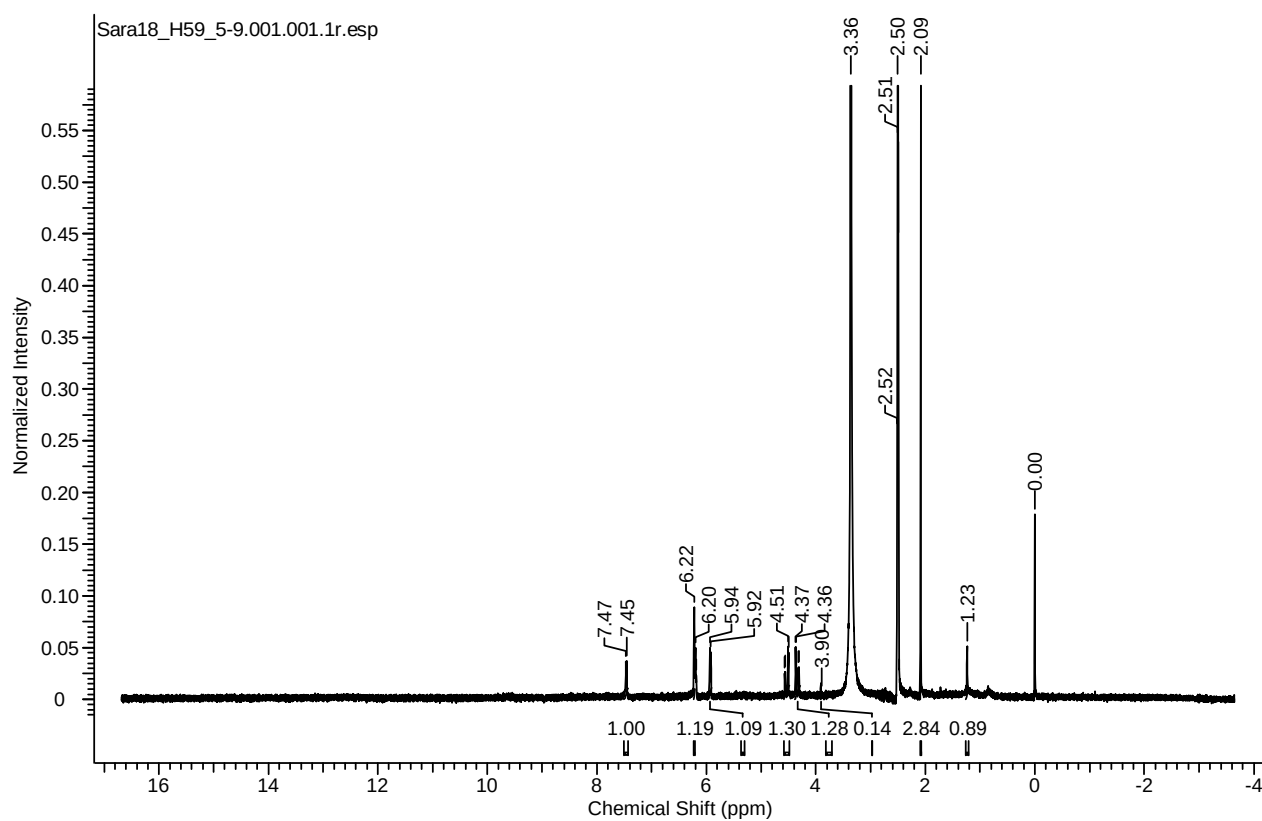


Figura 9 - Espectro de RMN ^1H obtido da análise da fase DCM (frações 5-9) solubilizadas em DMSO- d_6 suplementado com TMS como padrão interno (300 MHz).

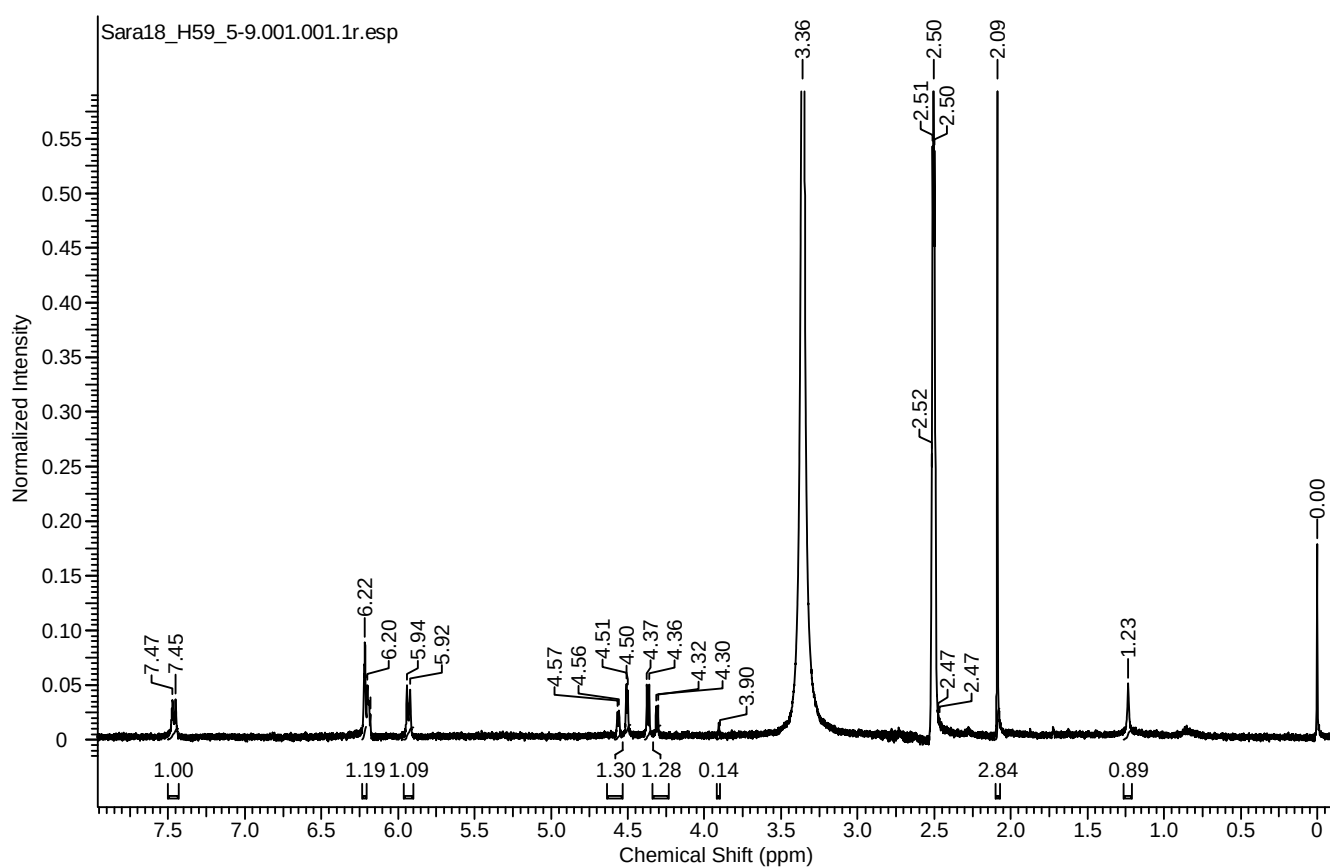


Figura 10. Ampliação do espectro de RMN ^1H obtido da análise da fase DCM (frações 5-9) solubilizadas em DMSO- d_6 suplementado com TMS como padrão interno (300 MHz).

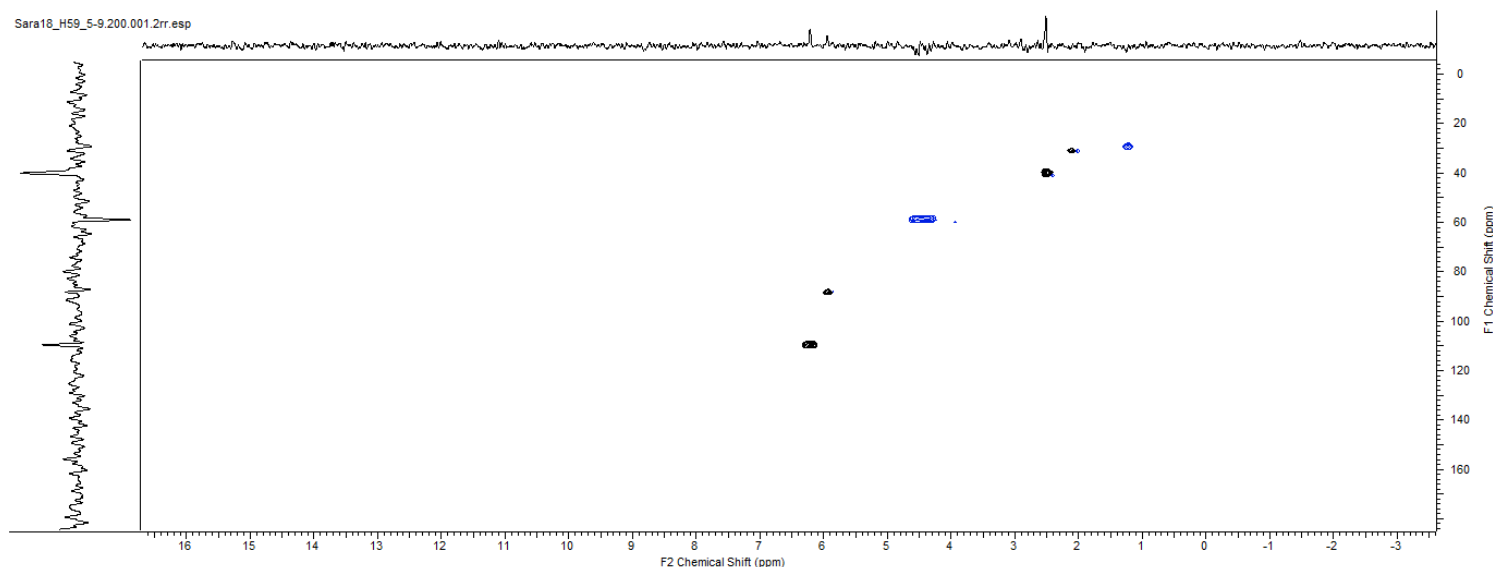
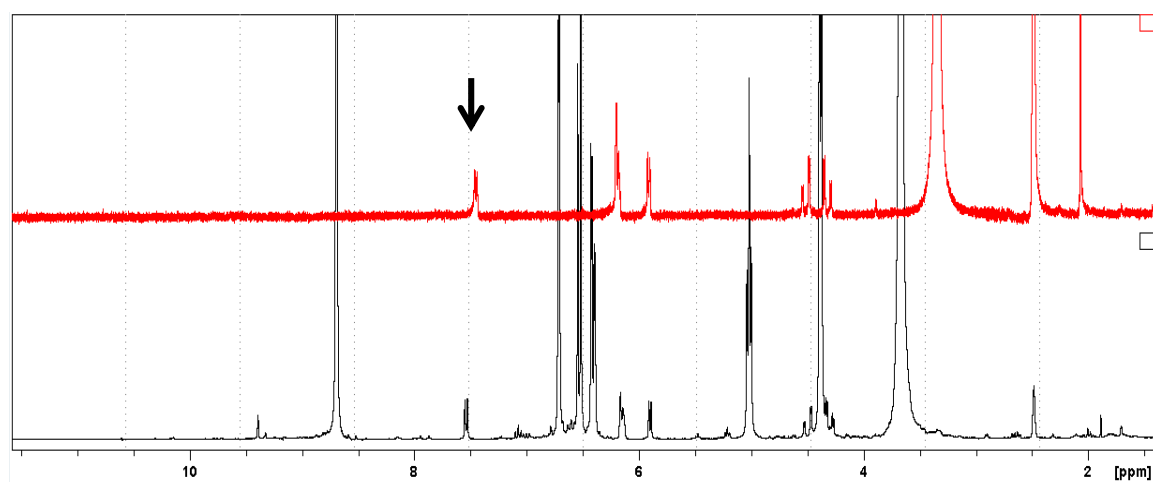


Figura 11-Espectro bidimensional de gHSQC(J1)da análise da fase DCM (frações 5-9) solubilizadas em DMSO- d_6 suplementado com TMS como padrão interno.



- H59 Fracão 5-9**
- H59 Fracão 5-7 (Lima, 2016)**

Figura 12.RMN fase DCM (frações 5-9) solubilizadas em DMSO- d_6 suplementado com TMS como padrão interno, comparada com a fração 5-7 de(LIMA, 2016).

4 Teste de citotoxicidade *in vitro* da substância isolada de *Paecilomyces* H59

De acordo com os resultados obtidos, a amostra de *Paecilomyces* H59 não apresentou citotoxicidade elevada na linhagem testada.

Tabela 7- Valores de viabilidade celular das substâncias na linhagem MRC-5, após 24 horas de exposição. Os dados estão representados como CI_{50} (intervalo de confiança de 95%).

AMOSTRAS	$CI_{50}\mu\text{g/mL}$ (Intervalo de Confiança)*
<i>Paecilomyces</i> H59	5.520 (5.178 – 5.886)*
Doxorrubicina	0.20 (0.1662 – 0.4345)*

5 Discussão

O presente estudo investigou a produção de antimicrobianos frente à MRSA pelo isolado H59. As análises taxonômicas demonstraram que o isolado H59 pertence ao gênero *Paecilomyces*. Bioprocessos definiram a influência de seus parâmetros na produção dos antimicrobianos. Por fim, a estrutura da substância ativa foi elucidada e a sua citotoxicidade foi avaliada. A substância produzida por *Paecilomyces* H59 possui potencial para ser proposta como novo agente antimicrobiano com atividade frente MRSA, portanto, o presente estudo possui grande importância acadêmica.

O isolado H59 foi obtido por Lima (2013) como endofítico de *Himatanthus sucuuba*. Lima (2013) realizou o sequenciamento da região ITS do DNAr desse isolado e o identificou como pertencente ao gênero *Paecilomyces*. No presente trabalho, as caracterizações taxonômicas (micro e macromorfológicas) confirmaram que o isolado H59 pertence ao gênero *Paecilomyces*.

O gênero *Paecilomyces* possui importância biotecnológica. Na Tabela 7 pode-se observar algumas das principais substâncias produzidas por esse gênero.

Tabela 8: Substâncias produzidas por *Paecilomyces* sp.

Autor	Espécie	Substância	Alvo
Lang <i>et al</i> , 2005	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Paecilosetina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Cladosporium resinae</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Silva <i>et al</i> , 2013	<i>Paecilomyces variotii</i>	6'-binafta-a-piranona (Viriditoxina)	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase
Talontsi <i>et al</i> , 2012	<i>Paecilomyces</i> sp. (CAFT156)	Paeciloside A	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>
Teles <i>et al</i> , 2012	<i>Paecilomyces lilacinus</i> co-cultura com <i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
Hirota, 1990	<i>Paecilomyces</i> sp.	Paecilospirona	
Zhang <i>et al</i> , 2015	<i>Paecilomyces variotii</i> (EN-291)	Varioxepina A	<i>Micrococcus luteus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>

O primeiro trabalho a destacar o isolado H59 como produtor de antimicrobianos foi desenvolvido por Lima (2016). Esse autor realizou a bioprospecção de antimicrobianos produzidos por fungos do solo Amazônico com ação frente a cepas de bactérias patogênicas. O isolado H59 destacou-se produzindo substâncias com atividade frente às bactérias *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ATCC 43300 (MRSA).

As condições de bioprocessos influem na produção de antimicrobianos por fungos (PAPAGIANNI, 2004). No presente trabalho foram investigadas as influências

nutricionais (fonte de carbono, fonte de nitrogênio) e influências de bioprocesso (pH, tamanho de inóculo e agitação) na produção de antimicrobianos por esse isolado. Os fatores ajustados para a maior produção dos antimicrobianos foram: a) uso da glicose como fonte de carbono; b) qualquer fonte de nitrogênio testada; c) pH 5, d) inóculo 1×10^5 e ausência de agitação orbital. Esses fatores são dificilmente correlacionados com a literatura devido aos poucos trabalhos de investigação de fatores de bioprocessos realizados com a espécie e até mesmo o gênero em relação à produção de antimicrobianos.

As substâncias ativas do isolado *Paecilomyces* H59 demonstraram solubilidade em solventes orgânicos de média polaridade e as cromatografias preparativas permitiram isolar uma fração contendo uma substância antimicrobiana frente à MRSA. Na análise da espectrometria de massas com ionização por *Eletronspray* (ESI-EM) das duas frações DCM e AcOEt (frações 5-9 obtidas com o sistema diclorometano/acetato de etila (20:80 – v/v) foi realizado comparações dos espectros e encontrados em ambas as frações picos majoritários e semelhantes com a massa de 155 m/z fórmula molecular $C_7H_7O_4$, sugere-se que seja esse o responsável pela atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA).

Lima(2016) encontrou atividade antimicrobiana frente a bactérias *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), produzidas também pelo fungo *Paecilomyces* H59, onde o mesmo realizou análise dos espectros de RMN de 1H , ^{13}C e os mapas de contorno (COSY, HMBC e HSQC), juntamente com os dados de espectrometria de massas com ionização por *Eletronspray* (ESI-EM) sugerindo que, a substância majoritária da fração ativa 5-7 da fase AcOEt caracterizada pelo íon molecular 244 m/z , fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_4$ denominada 2,8-dioxatriciclo[8.2.2.2^{4,7}]hexadeca-1(12),4,6,10,13,15-hexaene-6,12-diol (figura X).

Para a determinação das substâncias antimicrobianas presentes e comparação quanto à similaridade em cada uma das fases (DCM e AcOEt) frente a substância apresentada por Lima, 2016, estas foram enviadas para a caracterização estrutural por RMN no aparelho Bruker Fourier 300, na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais – LTQPN do INPA.

O presente estudo apresentou algumas limitações: a) não foram realizadas as análises taxonômicas necessárias para a identificação da espécie; b) os fatores de bioprocessos foram avaliados somente de forma univariada; c) a substância química não teve a sua estrutura elucidada por RMN. Novas perspectivas de estudo agora devem investigar incluindo a elucidação da estrutura química da molécula alvo, sua toxicidade in vivo e mecanismo de ação.

Com este estudo, conclui-se que o fungo do gênero *Paecilomyces* H59, possui um potencial na produção de substâncias antimicrobianas frente à bactéria resistência MRSA, visto a grave ameaça à saúde pública mundial causada por esse microrganismo. 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.

5 Referencias

HIROTA, A.et al. Structure of Paecilospirone, a New Antibiotic from *Paecilomyces*. **Agricultural and Biological Chemistry**, 55(4), 1187–1188, 1991.

LANG, G.et al. (2005). Paecilosetin, a New Bioactive Fungal Metabolite from a New Zealand Isolate of *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Natural Products**, 68(5), p. 810–811, 2005.

TALONTSI, F. M. et al.. Paeciloside A, a new antimicrobial and cytotoxic polyketide from *Paecilomyces* sp. strain CAFT156. **Planta Med.** v. 78, p. 1020–1023, 2012.

SILVA M. R. O. et al. Viriditoxin, an antibacterial substance produced by mangrove endophytic fungus *Paecilomyces variotii*. Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education. Méndez-Vilas A: Formatex Research Center; Badajoz: p. 1406–1411, 2013.

TELES, A. P. C.; ATALIBA, G. S.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of *Paecilomyces lilacinus* antimicrobial metabolite production by co-culturing with *Salmonella typhimurium*. **Natural Product Research**, 27(17), p. 1598–1601, 2013.

WERTHEIM H. F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect Dis** 5:p. 751–762, 2005.

COATES R, MORAN J, HORSBURGH MJ. 2014. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. **Future Microbiol**, v. 9, p. 75–91, 2014.

STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R.. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. **Clin Infect Dis** 58(Suppl 1):S10 –S19, 2014.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelial processes. **Biotechnol. Adv.**, v. 22, p. 189-259, 2004.

FUDA, C., FISHER, J. MOBASHERY, S., β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**. V. 62, n. 22, p. 2617-1633, 2005.

BURKE J. Infection control: a problem for patient safety. **N Engl J Med.**, v. 348 (7), p. 651–656, 2003.

COHEN, E. C. et al. Cohort Study Care of Children Isolated for Infection Control: A Prospective Observational. **Pediatrics**, 122:411-5, 2008.

RIDDELL, R.W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, 42, 265-270, 1950.

VALGAS C.et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Braz. J. Microbial**.v.38, p. 369-380, 2007.

LIMA, M. R.; Bioprospecção de Antimicrobianos Produzidos por Fungos do Solo Amazônico com Ação Frente a Bactérias Multiresistentes.2016. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).**Universidade Federal do Amazonas**, Manaus.

LIMA , M. A., Potencial de Substâncias Coloridas Produzidas por Fungos Endofíticos Amazônicos para o Diagnóstico Baciloscópico da Tuberculose. 2013. 109f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde”). **Universidade Federal do Amazonas**, Manaus.

SAXENA, G.; FARMER, S.; TOWERS, G.H.N.; HANCOCK, R. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant-extracts using a thin-layer chromatography agar overlay technique. *Phytochemical Analysis*, v.6, n.3, p.125-127, 1995.

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

ZHANG, P.et al. Oxepine-Containing Diketopiperazine Alkaloids from the Algal-Derived Endophytic Fungus *Paecilomyces variotii* EN-291. **Helvetica Chimica Acta**, 98(6), 800–804, 2015.

6 CONCLUSÃO

Com este estudo, conclui-se que o fungo do gênero *Paecilomyces* H59 possui um potencial na produção de substâncias antimicrobianas frente à bactéria resistência MRSA, visto a grave ameaça à saúde pública mundial causada por esse microrganismo. 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. REFERENCIASBIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Informes sobre regulação de medicamentos e sistema de controle de infecção hospitalar. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.38, nº. 1, 2004.

AHMED, S. A.; GOGAL, J. R. R. M.; WALSH, J. E.; **Journal ImmunolMethods**. 170,p. 211.1994.

ALLEN, H. K. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 251-259, 2010.

AN ANTIBIOTIC COMEBACK.**Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 3, p. 165-165, 2014.

BARNETT, H.L. e Hunter, B.B. HUNTER, Barry B. **The American Phytopathological Society, Illustrated Genera of Imperfect Fungi**.Fourth Edition, 1998.

BARRETT, J. Can Biotech Deliver New Antibiotics?.**Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 498-503 2005.

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.

BU”LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**.London:Academic Press, p. 561, 1987.

BURKE J. Infection control: a problem for patient safety. **N Engl J Med**. 348 (7), p. 651–656, 2003.

BUSTOS-MARTÍNEZ JA; HAMDAN-PARTIDA A; GUTIÉRREZ- -CÁRDENAS M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. **Rev Biomed.**, v. 17, p. 287-305, 2006.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. *The fungi*. **London: Academic Press**, p. 460, 1997.

CELESTINO, J. R. Bioprospecção de Fungos de Amostras de Solo Amazônico com Potencial para a Produção de Pigmentos. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). **Universidade Federal do Amazonas**, Manaus, 2013

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Community-associated MRSA. **Information from the U.S. Centers for Disease Control and Prevention**, 2003.

CHATTERJEE, S; MAITY, S; CHATTOPADHYAY, P; SARKAR, A; LASKAR, S; KUMAR SEN, S. Characterization of red pigment from *Monascus* in submerged culture red pigment from *Monascus Purpureus*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 12, p. 2102-2108, 2009.

CHAMBERS, H.F., SANDE, M.A. – Os aminoglicosídeos. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., eds. - **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed., New York: McGraw-Hill, p.812-825, 1996

CHENG, Y. et al. Farinosones A-C, Neurotrophic Alkaloidal Metabolites from the Entomogenous Deuteromycete *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, n. 11, p. 1854-58, 2004.

CHEN, H. J.; HUNG, W. C.; TSENG, S. P.; TSAI, J. C., HSUEH, P. R. & TENG, L. J. (2011). Fusidic acid resistance determinants in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**. 54, p. 4985– 4991, 2011.

COATES, *et al.* The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 895-910 2002.

COHEN EC, AUSTIN J, WEINSTEIN M, MATLOW A, REDELMEIER DA. Cohort Study Care of Children Isolated for Infection Control: **A Prospective Observational. Pediatrics**, 122, p. 411-5, 2008.

DE LENCASTRE H, OLIVEIRA D, TOMASZ A. Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus*: A Paradigm of Adaptive Power. **Curr Opin Microbiol**, v. 10 (5): 428-35, 2007.

DEL' ALAMO, L. et al. An outbreak of catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Hosp Infect.** v65, p. 226-30, 2007.

ELAZHARI, M. et al. Characterization of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* 80 isolates in the community of Casablanca (Morocco). **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 2, p. 96–100, 2012.

FARBER, B.F., MOELLERING, R.C. Retrospective study of the toxicity of the preparations of vancomycin from 1974 to 1981. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.23, n.1. p.139- 141, 1983.

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.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

FISHER, J.F. et al. Bacterial resistance to betalactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. **Chemical Reviews**, v.105, p. 395-424, 2005.

FOLORUNSO, A.B., ADEYEMI-DORO, F.A., LYON, D.J., CHENG, A.F. Living with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 7-years experience with endemic MRSA in

a university hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago, v.18, n.7, p.765–767, 2000.

FORESTIER, E. et al. MRSA Bacteremia: recente epidemiological and therapeutical trends (in French). **Revista de Medicina Interna**.v. 28 n. 11; p. 746-755, 2007.

FUDA, C., FISHER; J. MOBASHERY, S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**.v 62, n° 22, p. 2617-1633, 2005.

GARCÍA-REY, C.The role of the pharmaceutical industry. Why aren't new antibiotics being marketed? **El papel de la industria farmacéutica. por qué no se comercializan nuevos antibióticos?**.v. 28, n. SUPPL. 4, p. 45-49, 2010.

GARNER. J. S. et al. CDC - Definitions for Nosocomial Infections, 1988. **Am J Infect Control**. 16(3), p. 128-40, 1988.

GLOECKNER, H. et al.Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, p. 131–138, 2001.

HAJJAJ, H; FRANCOIS, J; GOMA, G; BLANC, P. Effect of amino acids on red pigments and citrinin production in *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 3, p. 156-159, 2012.

HARBARTH S, HARRIS AD, CARMELI Y, SAMORE MH. Parallel analysis of individual and aggregated data on antibiotic exposure and resistance in gram-negative bacilli.**Clin Infect Dis**. v. 1;33(9), p. 1462-1468, 2001.

HARDY CD, COZZARELLI NR. Alteration of Escherichia coli topoisomerase IV to novobiocin resistance.**Antimicrob Agents Chemother**.47(3), p. 941-947, 2003.

ISHIYAMA, D. et al. Novel Selective Inhibitors for Human Topoisomerase I, BM2419 - 1 and -2 Derived from Saintopin. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 51, n. 12, p. 1069-1074, 1998.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. suppl 5, p. S397-S428, 2011.

LIU, J. et al. Antibacterial Polyketides from the Jellyfish-Derived Fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 8, p. 1826 - 1829, 2011.

NOLLER HF. Structure of ribosomal RNA. **Annu Rev Biochem.** v. 53, p. 119-62, 1984.

HAO, H. et al. Focal adhesion Kinase as Potential target for cancer therapy (Review). **Oncol Rep**, v. 22, n.5, p. 973-9, Nov 2009.

HAWKEY, P.M. **The origins and molecular basis of antibiotic resistance**. **BMJ**. 317, p. 657-660, 1988

HAWKEY, P.M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p. 29–35, 2003.

HENRY S. FRAIMOW, CONSTANTINE TSIGRELIS. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: Mechanisms, Epidemiology, and Management of Specific Resistant Pathogens. **Critical Care Clinics**, v. 27, p. 163-205, 2011.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA Y.; YUZAMA H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Med Microbiol**. Stuttgart, v.292, n.2, p. 67-74(8), 2002.

HOGBERG, 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.

HOUGHTON, P.J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in thnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391–400, 2007.

JANKNEGT R. et a. Antibiotic use in Dutch hospitals 1991-1996. **J Antimicrob Chemother**v. 45(2), p. 251-256, 2000.

KAPLAN, W. *et al.***Priority Medicines for Europe and the World 2013 Update**. 9 Jul 2013. 2013.

KAYE, D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifampin, and aminoglycosides. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.18, p. 669-689, 2004.

KELLER, N. P.; TURNER, G.;BENNETT., J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nat Rev Microbiol**.v. 3(12), p. 937-947, 2005.

KOCH AL. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. **Clin Microbiol Rev**.v. 16(4), p. 673-687, 2003.

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

KONEMAN, E.W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: **Medsa**, p. 551-588, 2008.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Essentials of Medicinal Chemistry. Nova York: **Wiley-Interscience Publication**, p. 1204, 1988.

KRESSE, H.; BELSEY, M.; ROVINI, H. The antibacterial drugs market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 19-20 2007.

LIMA, M. R.; Bioprospecção de Antimicrobianos Produzidos por Fungos do Solo Amazônico com Ação Frente a Bactérias Multiresistentes.94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).**Universidade Federal do Amazonas**, Manaus, 2016.

LIS, J. T.; FRICK, G.; ALBERTSSON, P. A. Fractionation of nucleic acids in aqueous polymer two-phase systems. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 1701- 1717, 1961.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fraction of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**.v. 2, p. 383-389,1975.

LIVERMORE, D.M. Evolution of b-lactamase inhibitors. **Intesive Care Med**. 20: S10-S13, 1994.

LIVERMORE, D. M. Discovery research: The scientific challenge of finding new antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1941–1944, 2011.

MAINARDI JL, MOREL V, FOURGEAUD M, CREMNITER J, BLANOT D, LEGRAND R, *et al.*, Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. **J Biol Chem** v.277(39), p. 35801-7, 2002.

MARCOLETA et al.—Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*l. **BMC Microbiology**, v. 190, p. 1-11, 2011.

MIYAKE, T; KONO, I; NOZAKI, N; SAMMOTO, H. Analysis of pigment compositions in various *Monascus* cultures. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 2, p. 194-197, 2008.

NAKAZ., Y. TAKEDA & SUEMATSU, J. AGRIC. Basionym. *Paecilomyces mandshuricus* (Saito) Thom var. saturates. **Chem. Soc. Japan** 10: 102. 1934.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of Secondary Metabolites – **Fungi**. 2. ed.

NORDBERG, P.; MONNET, D. L.; CARS, O. Priority Medicines for Europe and the World "A Public Health Approach to Innovation" Background Paper 6.1 Antimicrobial resistance. **World Health Organization – WHO**, Abr. 2013. 2013.

NOLLER HF. Structure of ribosomal RNA. **Annu Rev Biochem**, v. 53, p. 119-162, 1984.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE [OMS]. **International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP)**. Disponível em: < <http://www.who.int/ictrp/en/> >. Acesso em: 08 Fev. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE [OMS]. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Genebra: Abr., p.257, 2014.

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *invitro*. **International Journal of Oncology**, v. 3, p. 473- 476, 1993.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelial processes. **Biotechnol. Adv.**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PAYNE, D. J. et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 1, p. 29-40, 2007.

PERITI, P.; MAZZEI, T. New criteria for selecting the proper antimicrobial chemotherapy for severe sepsis and septic shock. **Int J Antimicrob Agents**, v.12(2), p. 97-105, 1999.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, correlatos e Cosméticos. 3ª ed., ED. **Athneu**, São Paulo, p. 780, 2010

PISAREVA, E; KUJUMDZIEVA, A. Influence of carbon and nitrogen sources on growth and pigment production by *Monascus Pilosus* C1 strain. **Biotechnology & Biotechnoogical Equipment**, special edition/on line, p. 501-506, 2010.

RAUSCH, O. High content cellular screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 316–320, 2006.

RICE, L. B. Do we really need new anti-infective drugs? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 5, p. 459-463, 2003.

ROSSI, F; ANDREAZZI, D. B..Cocos Gram-Positivos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. e *Streptococcus pneumoniae* e os principais mecanismos de resistência. In: ROSSI, Flávia; ANDREAZZI, Denise B.. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. São Paulo: **Atheneu**, p. 27-43, 2005.

RUBINOVITCH, B., PITTET, D. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic hospital: what have we learned? **J Hosp Infec**, New York, v.1, n.47, p.9-18, 2001.

RUIZ, B; *et al.* Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

RYBAK, M. J.; LAPLANTE, K. L. Community Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Review. **Pharmacother**, v. 25, p. 74-85, 2005.

SACHS AB, SARNOW P, HENTZE MW.Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes.**Cell**, v. 13;89(6), p. 831-838, 1997.

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies in Mycology**, v. 6, p. 1–119, 1974.

SANTOS et al.*Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, p. 413-423, 2007.

SINGH, G. S. Beta-lactams in the new millennium. Part-II: cepheids, oxacepheids, penams and sulbactam. **Mini Rev Med Chem**, v. .4(1):93-109, 2004.

STRAUS, S.K.; HANCOCK, R.E. Mode of action of the new antibiotic for Grampositive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1758, p.1215-23, 2006.

TANG, Y. et al. Acetylation is indispensable for p53 activation. **Cell, Maryland Heights**, v. 133, n. 4, p. 612-626, 2008.

TELES, A. P. C. et al. Modulation of *Paecilomyces lilacinus* antimicrobial metabolite production by co-culturing with *Salmonella typhimurium*. **Natural Product Research**, 27(17), 1598–1601, 2013.

TANG, S. S.; APISARNTHANARAK, A.; HSUC, L. Y. Mechanisms of lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community and health care associated multidrug-resistant bacteria. **Adv. Drug Deliv Rev.**, v. 78, p. 3 - 13, 2014.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. **Ed. Atheneu**, 1216p, 2002.

TENSON, T.; MANKIN, A. Antibiotics and the ribosome. **Molecular Microbiology**, v. 59, p. 1664-77, 2006.

TILLOTSON, G. S. GAIN Act legislation: is it enough? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 823-824 2012.

VELMURUGAN, P. et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262-268, 2010a.

YAO J, MOELLER R. Antibacterial Agents. In: Murray PR, Baron E, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9 th ed. Washington: **ASM PRESS**, p. 1077-113, 2007.

WAGA, S.; STILLMAN, B. The DNA replication fork in eukaryotic cells. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 721-751, 1998.

WANG, B. et al. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1141–1151, 2011.

WALSH, C.; TIMOTHY, A. W. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. **Journal of Antibiotics**, 2013.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 1990.

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.

WRIGHT, G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.175-86, 2007.

YANG, M.J. et al. First total synthesis of paecilodepsipeptide A. **Chinese Chemical Letters**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 527-530, 2009.

YAMASHITA, Y. et al. Saintopin, a new antitumor antibiotic with topoisomerase ii dependent DNA cleavage activity, from *Paecilomyces*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 43, n. 10, p. 1344-1346, 1990.