LÍLIA MACEDO FIROOZMAND

**MICRORGANISMOS DO SOLO E DE MANGUEZAIS:
FONTE DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2008

LÍLIA MACEDO FIROOZMAND

**MICROORGANISMOS DO SOLO E DE MANGUEZAIS:
FONTE DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Olívia de Souza

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Firoozmand, Lilia Macedo.

Microrganismos do solo e de manguezais: fonte de produtos antimicrobianos / Lilia Macedo Firoozmand. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Ana Olívia de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Atividade antimicrobiana de produtos naturais.

Versão do título para o inglês: Microorganisms from the soil and from the mangrove swamps: source of antimicrobial products.

Descritores: 1. Microrganismos 2. Ação antimicrobiana 3. Fungos 4. *Trypanosoma cruzi* 5. *Leishmania* 6. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv I. Souza, Ana Olívia de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0100/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Lilia Macedo Firoozmand.

Título da Dissertação: Microrganismos do solo e de manguezais: fonte de produtos antimicrobianos.

Orientador(a): Ana Olívia de Souza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais,

*Farhad Firoozmand e Izaura Macedo Firoozmand,
que me fizeram aprender à servir, perseverar e
amar. Minha admiração por vocês é pelo exemplo
de vida e de virtudes espirituais que nenhuma
palavra poderia descrever a força que há ao ver os
atributos de Deus refletidos em seus corações.*

Dedico com amor e carinho

Ao meu noivo,

*Lincoln Augusto Taddeo por tanto
companheirismo, incentivo e amizade. Seu amor
não foi somente capaz de entender o que falava,
mas de compreender o que não conseguia dizer.*

Dedico com amor

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer à **Deus**, O Mais Generoso, O Onisciente, O Todo-Misericordioso.

À Profa. Dra. **Ana Olívia de Souza** pela orientação, disponibilidade e dedicação na condução desse trabalho. Agradeço pelo carinho recebido e pela contribuição na minha vida profissional. Um agradecimento especial sobre tudo pelos anos que estive sob sua orientação.

Aos meus pais, **Farhad Firoozmand** e **Izaura Macedo Firoozmand** minha profunda gratidão pela educação espiritual (Fé Bahá'í) e profissional. Agradeço por me ensinarem a confiar em Deus acima de tudo e aceitar que mesmo nas dificuldades devemos sempre amar e perdoar.

Ao meu noivo **Lincoln Augusto Taddeo** que compreendeu e respeitou a importância da realização deste trabalho, acompanhando os momentos de dificuldades e de alegrias. Muito Obrigada!

À minha querida amiga, **Neusa de Oliveira Franco**, que me acolheu em sua residência na cidade de São Paulo, sendo muito prestativa e com um enorme coração. Você com certeza será muito recompensada e abençoada por Deus. Obrigada pela amizade e confiança!

Às minhas queridas irmãs, **Leily** e **Leila**, pelo incentivo e constante torcida para o meu êxito profissional e minha felicidade.

Ao amigo **Acácio** que fazia o meu transporte diário, um tanto quanto longo desde o Jaçanã até o Butantã e aos amigos do fretado que ganhei durante esse período.

Ao Laboratório de Micologia do **Instituto Adolfo Luz** por gentilmente fornecer os isolados clínicos de fungos patogênicos utilizados nesta pesquisa.

Ao Dr. **Itamar Soares Melo** por gentilmente ceder os microrganismos do solo e de manguezais utilizados nesta pesquisa, pelo apoio durante o processo de definição e execução deste projeto, bem como pelas valiosas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Um agradecimento especial também ao **João Luiz da Silva** que realizou as coletas de microrganismos nos mangues e pelo auxílio prestado.

À Dra. **Marilene Cavalheiro** e **Rosa Léo** pela colaboração e auxílio para a execução dos ensaios de atividade Leishmanicida no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, no Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ.

À Dra. **Solange Lisboa** e **Kelly Salomão** pela colaboração e ao aprendizado que recebi com a realização dos ensaios de atividade Tripanossomicida no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ.

Ao Prof. Dr. **Célio Lopes** e o Dr. **Fabio Galetti** pela colaboração e auxílio para a execução dos ensaios de atividade antimicobactericida.

À Dra. **Maria Inez de Moura Sarquis** pela atenção e oportunidade de estágio no Laboratório de Coleção de Fungos, Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ.

Ao Dr. **Daniel Carvalho Pimenta** pela valiosíssima ajuda e pela sua constante gentileza e disponibilidade para ajudar nos ensaios de purificação. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. **Luiz Alberto Beraldo de Moraes** pela colaboração e auxílio para a execução das espectrometrias de massas dos extratos orgânicos.

À querida amiga **Rosely** pelo excelente trabalho e contribuição com as microscopias eletrônicas de varredura. Obrigada por seu trabalho e sua ajuda!

Aos professores, Prof. Dr. **Dácio Matheus** e Prof. Dr. **Carlos Taborda** que com suas valiosas contribuições enriqueceram este trabalho durante a avaliação do Exame Geral de Qualificação.

Agradeço aos meus colegas de laboratório **Ana Paula, Anderson, Gilberto, Gustavo, Mário e Meire** pela amizade e companheirismo.

Ao Dr. **Ivo Lebrun** que me acolheu no Laboratório de Bioquímica e Biofísica e a todos os **colegas e funcionários do Laboratório** que estiveram presentes e me apoiaram, de alguma forma, durante o curso de Mestrado.

À Universidade de São Paulo - USP, na pessoa da coordenadora do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Prof. Dra. **Ana Clara Guerrini Schenberg** pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À todos os **docentes** do curso de mestrado por contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico e por seus valiosos ensinamentos.

À **Maria José de Jesus Carvalho** e à **Eva Aparecida da Silva Oliveira** pelo auxílio na revisão das normas e apresentação deste trabalho.

Dedico também um agradecimento à banca examinadora desta Dissertação.

E finalmente agradeço às instituições financiadoras desta pesquisa: CNPQ e FAPESP.

“O mérito do homem está em serviço e virtude e não na ostentação de afluência e riqueza”

“Devemos agora nobremente decidir nos levantar e segurar firmemente todos aqueles instrumentos que promovam a paz e o bem-estar e a felicidade, o conhecimento, a cultura e a indústria, a dignidade, o valor e a posição da inteira raça humana.”

Escrituras Bahá'ís

RESUMO

FIROOZMAND, L.M. Microrganismos do solo e de manguezais: fonte de produtos antimicrobianos. 87 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As infecções fúngicas sistêmicas são responsáveis por alta morbidade e mortalidade principalmente em pacientes imunocomprometidos. O tratamento com os antifúngicos disponíveis é prolongado e desencadeia diversos efeitos colaterais justificando a procura de novos agentes antifúngicos. Doenças endêmicas no Brasil, como a Tuberculose, Leishmaniose e Doença de Chagas também precisam de novos fármacos para aumentar as possibilidades de cura dessas doenças. A biodiversidade de microrganismos encontrados nos ecossistemas proporciona excelentes perspectivas para a descoberta de moléculas farmacologicamente ativas. Neste estudo, microrganismos coletados do solo e de manguezais da costa brasileira foram avaliados quanto à ação antifúngica, antimicobacteriana, leishmanicida e tripanossomicida. Actinobactérias do solo e fungos de manguezais totalizando 83 isolados foram testados por ensaios de antagonismo em relação aos fungos: *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. Vinte e três isolados inibiram o crescimento dos patógenos (formaram halos de inibição do crescimento ≥ 2 mm) e foram cultivados em meio de cultura Batata Dextrose por 7 dias. A partir do sobrenadante da cultura dos isolados, 23 extratos orgânicos foram obtidos e avaliados quanto à ação antimicrobiana através da determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs). Cinco extratos apresentaram CIMs iguais ou inferiores a 400 $\mu\text{g/mL}$ sobre os fungos patogênicos e dois apresentaram expressiva ação contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Para a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* e *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, os extratos não foram efetivos. Os cinco isolados produtores dos extratos com promissora ação antimicrobiana são fungos de manguezais e foram identificados taxonomicamente com relação ao gênero. A purificação dos cinco extratos mais efetivos por cromatografia líquida de alta eficiência para o isolamento do princípio ativo não foi concluída, mas os dados dos cromatogramas

e de espectrometria de massas indicam que os extratos são constituídos por poucas moléculas. Os resultados indicam que os fungos de manguezais apresentam melhor ação antimicrobiana do que as actinobactérias testadas e demonstram boas perspectivas na investigação de novos agentes antimicrobianos.

Palavras-chaves: Microrganismos; Ação antimicrobiana; Metabólitos; Antifúngicos; Fungos; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania*; *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv .

ABSTRACT

FIROOZMAND, L.M. Microorganisms from the soil and from the mangrove swamps: source of antimicrobial products. 87 f. 2008. Master Thesis (Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo. 2008.

Systemic fungal infections are responsible for high morbidity and mortality especially in immune-sensitive patients. The treatment with the available antifungal substances is long and causes various collateral effects, which justifies the search for new antifungal agents. In Brazil, endemic diseases, such as Tuberculosis, Leishmaniasis and Chagas Disease, also need new drugs to increase the possibilities of their cure. The biodiversity of microorganisms found in the ecosystems provide excellent perspectives for the discovery of pharmacologically active molecules. In this study, microorganisms extracted from the soil and from the mangrove swamps of the Brazilian coast were analyzed with respect to their antifungal, antimycobacterial, leishmanicidal and trypanocidal actions. Eighty-three actinobacteria from the soil and fungi from the mangrove swamps were isolated and tested antagonistically in relation to the fungi *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. Twenty-three of them inhibited the growth of the pathogens (producing circles ≥ 2 mm of inhibition to growth) and were cultivated in a culture medium of Potato Dextrose for seven days. From the supernatant of the culture of the microorganisms, twenty-three organic extracts were obtained and analyzed taking in consideration their antimicrobial action through the determination of their minimum inhibitory concentrations (MICs). Five extracts presented MICs equal or less than 400 μ g/mL over the pathogenic fungi and two presented significant action against the trypomastigote of *Trypanosoma cruzi*. For the promastigote of *Leishmania amazonensis* and of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, the extracts were not effective. The five isolated producers of the extracts with promising antimicrobial action were fungi from the mangrove swamps and were taxonomically identified as to their genus. The purification of these five more effective extracts using high efficiency liquid chromatography for the separation of the active ingredient was not concluded but the chromatography data of the mass spectrometry indicate that the

extracts are made of a small number of molecules. The results indicate that fungi from mangrove swamps present better microbial action than the actinobacteria tested and present promising perspectives for the research of new antimicrobial agents.

Key words: microorganisms; antimicrobial action; Metabolite; antifungal drugs; fungi; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania*; *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Área de manguezais de países da América do Sul.....	24
Figura 2 - Representação esquemática das etapas empregadas na produção de extratos orgânicos a partir da cultura de isolados de actinobactérias do solo e de fungos de manguezais e detecção de suas ações antifúngica, leishmanicida, tripanossomicida e antimicobacteriana.....	40
Figura 3 - Ilustração do teste de antagonismo do ANT II 55 <i>versus</i> A) <i>A. fumigatus</i> e B) <i>T. rubrum</i> . C) ANTII 55 cultivado em meio de cultura BDA .	55
Figura 4 - Ilustração do teste de antagonismo do ANT II 59 <i>versus</i> A) <i>T. rubrum</i> e B) ANTII 59 cultivado em meio de cultura BDA.....	56
Figura 5 - Ação tripanossomicida dos extratos MGE-182 e MGE-201 sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , após tratamento por 24 horas à 37 °C.....	62
Figura 6 - Avaliação da citotoxicidade através da redução do sal tretazólio (MTT), incorporação do vermelho neutro (VN) e determinação do conteúdo de DNA em macrófagos J774 expostos aos extratos orgânicos de A) A-1-8 e B) L-2-2. O resultado expressa a média $\pm$ erro padrão para três ensaios independentes.....	64
Figura 7 - Avaliação da citotoxicidade através da redução do sal tretazólio (MTT), incorporação do vermelho neutro (VN) e determinação do conteúdo de DNA em macrófagos J774 expostos aos extratos orgânicos de A) MGE-201, B) MGE-182 e C) MGE-202. O resultado expressa a média $\pm$ erro padrão para três ensaios independentes.....	65
Figura 8 - Perfil cromatográfico dos extratos orgânicos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 submetidos à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência.....	67
Figura 9 - Ilustração do Teste de antagonismo para as frações A) A-1-8-F1 e B) L-2-2-F1 <i>versus</i> <i>A. fumigatus</i> e <i>T. rubrum</i> . C) <i>A. fumigatus</i> e <i>T. rubrum</i> cultivados em meio BDA	69
Figura 10 - Espectrometria de massas do extrato A-1-8	70
Figura 11 - Espectrometria de massas do extrato L-2-2.....	71

Figura 12- Espectrometria de massas do extrato MGE-182.....	71
Figura 13- Espectrometria de massas do extrato MGE-201.....	72
Figura 14- Espectrometria de massas do extrato MGE-202.....	72
Figura 15- Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como A-1-8 e caracterizado como pertencente ao gênero <i>Penicillium spp.</i> Ampliações de A) 1.750x e de B) 2.000x	74
Figura 16- Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como L-2-2 e caracterizado como pertencente ao gênero <i>Clonostachys spp.</i> Ampliações de A) 1.150x e de B) 2.000x	75
Figura 17- Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como MGE-182 e caracterizado como pertencente ao gênero <i>Aspergillus spp.</i> Ampliações de A) 100x e de B) 400x.....	76
Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como MGE-201 e caracterizado como pertencente ao gênero <i>Aspergillus spp.</i> Ampliações de A) 50x e de B) 1.000x.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições para cultura de <i>C. albicans</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>C. neoformans</i>	39
Tabela 2- Microrganismos utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana	41
Tabela 3- Atividade antifúngica de actinobactérias <i>versus</i> <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>T. rubrum</i> e <i>A. fumigatus</i> pelo ensaio de antagonismo.....	53
Tabela 4- Atividade antifúngica de fungos de manguezais <i>versus</i> <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>T. rubrum</i> e <i>A. fumigatus</i> pelo ensaio de antagonismo.....	54
Tabela 5- Microrganismos selecionados para cultura e produção de extratos orgânicos em 150 mL de meio de cultura BD.....	57
Tabela 6- Ação anfifúngica sobre <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>T. rubrum</i> e <i>A. fumigatus</i> . CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para extratos orgânicos produzidos por fungos de manguezais	58
Tabela 7- Ação fungicida sobre <i>C. albicans</i> e <i>T. rubrum</i> . CIMs e CF _s ($\mu\text{g/mL}$) para extratos orgânicos produzidos por fungos de manguezais	59
Tabela 8- Ação antimicobacteriana sobre <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294. Valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para extratos brutos produzidos por actinobactérias e fungos de manguezais	61
Tabela 9- Ação tripanossomicida sobre a forma tripomastigota de <i>T. Cruzi</i> . Valores de IC ₅₀ /24 horas ($\mu\text{g/mL}$) para extratos orgânicos produzidos por actinobactérias e fungos de manguezais	62
Tabela 10- Citotoxicidade dos extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 em cultura de macrófagos J774 (IC ₅₀) e valores do índice de seletividade (IS).....	66
Tabela 11- Atividade antifúngica das frações obtidas dos extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202. Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência e ação antifúngica por ensaio de antagonismo.	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ACTINOBACTÉRIAS E FUNGOS	21
2.2	IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS NOS ECOSSISTEMAS	22
2.2.1	Solos agrícolas e o Manguezal	23
2.3	IMPORTÂNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE MICRORGANISMOS	25
2.4	INFECÇÕES FÚNGICAS E TRATAMENTO	27
2.5	TUBERCULOSE E TRATAMENTO	34
2.6	LEISHMANIOSE E TRATAMENTO	35
2.7	DOENÇA DE CHAGAS E TRATAMENTO	37
3	OBJETIVOS GERAIS	38
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	CULTURA DOS FUNGOS PATOGÊNICOS	39
4.2	ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO SOLO E DE MANGUEZAIS	39
4.3	TESTE DE ANTAGONISMO	41
4.4	PRODUÇÃO DE EXTRATOS ORGÂNICOS	43
4.5	DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA	44
4.6	DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICOBACTERIANA	45
4.7	DETERMINAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA	46
4.8	DETERMINAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOSSOMICIDA	47
4.9	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	48
4.9.1	Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT)	48
4.9.2	Incorporação do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] Vermelho Neutro (VN)	49
4.9.3	Quantificação do conteúdo de Ácidos Nucléicos (DNA)	49
4.10	PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)- FRACIONAMENTO	50
4.11	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FRAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)	50
4.12	ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MICRORGANISMOS- MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA	51

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 TESTE DE ANTAGONISMO: PATÓGENOS X MICRORGANISMOS EM TESTE ...	52
5.2 EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS A PARTIR DA CULTURA DE MICRORGANISMOS.....	56
5.3 AÇÃO ANTIFÚNGICA	58
5.3.1 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas	58
5.3.2 Determinação das Concentrações fungicidas	59
5.4 AÇÃO ANTIMICOBACTERIANA, LEISHMANICIDA E TRIPANOSSOMICIDA	60
5.4.1 Ação antimicobacteriana	60
5.4.2 Atividade Leishmanicida	61
5.4.3 Ação tripanossomicida	62
5.5 CITOTOXICIDADE	63
5.6 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)- FRACIONAMENTO	67
5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FRAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)	69
5.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MICRORGANISMOS-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	72
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	79

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos desempenham importante função na manutenção e equilíbrio dos ecossistemas e estima-se que uma pequena porcentagem em torno de 1 e 4% do total de espécies de bactérias e fungos sejam descritas, respectivamente (CANHOS et. al., 1999).

O Brasil apresenta ampla biodiversidade com ecossistemas ainda inexplorados e áreas virgens que constituem ricas fontes de novos produtos a serem descobertos principalmente a partir de microrganismos.

O potencial biotecnológico dos microrganismos decorre em parte da variedade de espécies e das moléculas resultantes do metabolismo primário e secundário. Muitos dos produtos atualmente em uso para terapia humana, animal ou uso na agricultura são produzidos por fermentação microbiana ou são derivados de modificações químicas de um produto microbiano (antibióticos, antitumorais, antifúngicos, imunossuppressores, inibidores enzimáticos, antiparasitários, herbicidas, inseticidas e promotores de crescimento). Estima-se que 13% dos medicamentos existentes sejam obtidos a partir de microrganismos.

Doenças de Chagas e Tuberculose causaram 4.931 e 4.722 óbitos no Brasil no ano de 2003, respectivamente e pesquisas que contribuam para o desenvolvimento de novos fármacos são necessárias e relevantes para a terapia dessas infecções (SANTO, 2007). De acordo com dados do Sistema Único de Saúde (SUS), no período de 1999 a 2003, foram registrados cerca de 33.872 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) por ano no Brasil (GERRA et al., 2006). A LTA e a Doença de Chagas ainda representam um sério desafio, como por exemplo, o grande número de reservatórios potenciais e o vetor circulando em ambientes domiciliar, peridomiciliar e silvestre dificultam o controle da doença. Adicionalmente, a Tuberculose considerada uma doença controlada, voltou a ser uma preocupação para a Saúde Pública devido à desistência do paciente ao tratamento longo e de micobactérias resistentes aos medicamentos comercialmente disponíveis.

Infecções fúngicas invasivas e superficiais são causadas por diferentes espécies de fungos e nos últimos anos a incidência tem aumentado drasticamente, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os fármacos disponíveis têm custo relativamente alto, o que dificulta o acesso da população mais carente.

Considerando que as doenças mencionadas são infecciosas e que há negligência no controle da transmissão por parte da população ou das autoridades na área de saúde, o desenvolvimento de vacinas ou de uma quimioterapia mais eficaz constituem uma das soluções para o controle dessas infecções.

O solo e o manguezal são ecossistemas com ampla biodiversidade de microrganismos e este estudo teve como proposta a avaliação da ação antifúngica, leishmanicida, tripanossomicida e antimicobacteriana de produtos obtidos a partir da cultura de microrganismos isolados desses ambientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE ACTINOBACTÉRIAS E FUNGOS

Actinobactéria é um filo de bactérias Gram-positivas caracterizadas por organização filamentosa, muitas vezes ramificada e com cadeias de esporos semelhantes a conídios. Ao contrário dos fungos, são organismos procariontes e predominantemente aeróbios.

As actinobactérias são encontradas no solo, onde desempenham relevante papel biológico. São organismos litotróficos que produzem energia a partir de compostos inorgânicos, como o hidrogênio, compostos reduzidos de ferro e enxofre. Contribuem significativamente para a química da biosfera, atuando nos ciclos biogeoquímicos e processos de lixiviação de rochas e formação de solos. Possuem aspectos morfológicos e ciclo celular diferenciado dos demais organismos Gram-positivos. Exemplos comuns são os organismos dos gêneros, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Mycobacterium*. Neste filo estão inseridos ainda os organismos microaerófilos e anaeróbios obrigatórios e formadores de ácido propiônico, alocados nos gêneros *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Butyrivibrio* (CANHOS et al., 1989).

Actinobactérias em geral, e estreptomicetos em particular, têm sido reconhecidos como agentes de controle biológico, principalmente por serem capazes de interagir com as plantas superiores ou mesmo com outras populações microbianas, mediante a produção de antibióticos (PEREIRA et al., 1999a, 1999b).

Fungos são organismos eucariontes e pertencentes ao Reino Fungi. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e a nutrição é obtida por absorção. São saprofíticos, parasitas facultativos ou biotróficos. Os unicelulares ou leveduras ocorrem como células isoladas que se reproduzem por brotamento e os fungos filamentosos, bolores e cogumelos, são constituídos por longos túbulos ramificados denominados hifas que formam um emaranhado denominado micélio. No interior das hifas aloja-se a massa citoplasmática e os micélios crescem pelo alongamento apical das hifas e formam estruturas especializadas para reprodução assexuada e sexuada.

Os fungos são microrganismos heterotróficos predominantemente aeróbios obrigatórios. São capazes de produzirem enzimas como lipases, invertases,

lactases, proteinases, entre outras, que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável através de mecanismos de transporte ativo e passivo. Alguns substratos podem induzir a formação de enzimas degradativas, existem fungos que hidrolisam substâncias orgânicas, como quitina, osso, couro, inclusive materiais plásticos.

Os fungos, como todos os seres vivos, necessitam de água para o seu desenvolvimento. Alguns são halofílicos, incapazes de se desenvolverem em meios sem cloreto de sódio e freqüentemente demandam altos teores desse sal. Muitas espécies podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos, como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, preferencialmente, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. O ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são necessários em pequenas quantidades. No entanto, alguns fungos demandam fatores de crescimento, que não conseguem sintetizar, em especial, vitaminas, como tiamina, biotina, riboflavina e ácido pantotênico (PRIEST e CAMPBELL, 1996).

2.2 IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS NOS ECOSISTEMAS

Os principais grupos de microrganismos são constituídos por bactérias, arqueas, fungos, protozoários, parasitas intracelulares (vírus) e invertebrados microscópicos (nematóides e ácaros) (MADIGAN et al., 2004).

Estes apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção dos ecossistemas. Atuam como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (SCHIMEL, 1995; MYERS, 1996).

No equilíbrio de ecossistemas, os microrganismos atuam como intermediários entre a biogeosfera e os constituintes atmosféricos gasosos. Bactérias capazes de degradar herbicidas, pesticidas, inseticidas, óleos e esgotos poluidores estão presentes e participam da reciclagem de compostos químicos na biosfera, incluindo a degradação de poluentes industriais. Bactérias inseticidas também representam alternativas aos inseticidas químicos que poluem o meio ambiente, plantas e animais (GARCIA, 1995).

A infecção natural de plantas por microrganismos é favorecida pelo clima úmido. De acordo com a região onde colonizam a planta, os microrganismos podem ser classificados como endofíticos ou epifíticos. Bactérias ou fungos epifíticos são

aqueles que habitam sob outro ser vivo, na superfície dos órgãos e tecidos vegetais e os endofíticos aqueles que estão em associação íntima com plantas hospedeiras, colonizando os tecidos vegetais sem causar danos aparentes a seus hospedeiros.

Vantajosamente, os endofíticos apresentam algumas aplicações como:

- a) produzem antibióticos e outros metabólicos secundários de interesse farmacológico;
- b) funcionam como bioindicadores de vitalidade (HELANDER e RANTIO-LEHTIMAKI, 1990);
- c) atuam como agentes de controle biológico de pragas e doenças;
- d) são usados como bioerbicidas;
- e) são aplicados na biorremediação de solos contaminados com poluentes e
- f) são usados como vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras.

2.2.1 Solos Agrícolas e Manguezal

As actinobactérias estão presentes nos solos agrícolas e no solo adjacente às raízes das plantas (rizosfera). O desenvolvimento das plantas pode ser influenciado pelas actinobactérias que também conferem proteção às raízes contra patógenos e contribuem para possíveis benefícios na produtividade (GAVA et al., 2002).

O manguezal é um ecossistema típico de áreas estuarinas tropicais e subtropicais, é regido por um sistema de variação de marés, que inunda duas vezes ao dia, misturando a água marinha com a doce, proveniente do continente. A vegetação presente é halófita e desenvolve-se sobre um solo geralmente lamacento e pobre em oxigênio, o qual forma um complexo Florestal Tropical Pluvial, caracterizando uma vegetação com influência fluviomarinha, informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1991).

Os manguezais apresentam salinidade entre 5 e 30%, podendo chegar até 90%, abrangem aproximadamente 60 a 70% da costa tropical e subtropical do planeta e ocupam uma área de 181.000 Km² (SPALDING et al., 1997). Na América do Sul atingem em torno de dois milhões de hectares, distribuídos principalmente entre o Brasil, Colômbia, Bolívia, Venezuela, Equador e Suriname, conforme descrito pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Área de manguezais de países da América do Sul
Fonte: Adaptado da FAO, 2007.

O Brasil tem a terceira maior extensão de área de manguezal do mundo e essa ocorre ao longo do litoral, desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 13.400 Km². Em manguezais tropicais, bactérias e fungos constituem 91% da biomassa microbiana total, visto que algas e protozoários representam somente 7 e 2%, respectivamente (ALONGI et al., 1993).

Embora os manguezais sejam ricos em matéria orgânica, os mesmos são deficientes em nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo. Apesar desse fato, os manguezais são altamente produtivos com relação a aspectos bioquímicos e a atividade microbiana é responsável por transformações de nutrientes dentro do ecossistema (ALONGI et al., 1993; HOLGUIN et al., 1999).

No ecossistema manguezal, ocorre uma interdependência entre micro e macrorganismos, onde estes últimos dependem das bactérias para a reciclagem de nutrientes, e estas se beneficiam através da absorção de fontes de carbono oferecidas principalmente pela vegetação. Além das bactérias, os manguezais são constituídos por centenas de espécies de fungos, cuja função na reciclagem de nutrientes desse ecossistema ainda não está completamente definida. Muitas novas espécies de fungos e bactérias já foram isoladas de manguezais da Índia, Mar Vermelho, Indonésia, Estados Unidos, Austrália, e outros países (HOLGUIN et al., 2001).

A diversidade de espécies de árvores nos manguezais da América do Sul é pequena, e somente dez espécies são nativas. No Brasil, as espécies encontradas são *Avicennia germinans*, *A. schaueriana*, *Conocarpus erectus*, *Laguncularia racemosa*, *Rhizophora harrisonii*, *R. mangle* e *R. racemosa* (FAO, 2007).

2.3 IMPORTÂNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE MICRORGANISMOS

Metabólitos microbianos secundários representam uma grande fonte de compostos com estruturas inéditas e potenciais atividades biológicas. No Brasil há imensa biodiversidade e conseqüentemente a microbiota é pouco estudada (AZEVEDO, 1998).

Na agricultura, os fungos têm grande utilidade no controle de pragas e outra importante aplicação ocorre na descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos, atividade relacionada à capacidade de degradação de substâncias tóxicas (BONONI e GRANDI, 1998).

Alguns basidiomicetos são utilizados na alimentação humana, fornecendo proteínas, vitaminas e baixas quantidades de gorduras (BONONI e GRANDI, 1998). No Brasil, os cogumelos de interesse comercial são *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *A. blazei*, *A. brasiliensis* e *A. sylvaticus* (URBEN e URIARTT, 2002; DIDUKH et al., 2003).

Zigomicetos também produzem compostos de interesse para a indústria e podem ser citados como exemplos: *Mucor piriformis* (ácido cítrico), *M. racemosus* (amilases e glicerina), *Mucor spp.* (etanol, gliceraldeído, ácidos láctico, fumárico, succínico, málico, oxálico), *Rhizopus arrhizus* (ácido láctico, cortisona, hidroxiprogesterona), *R. stolonifer* (ácidos fumárico e láctico), *R. oryzae* (ácidos láctico, fumárico e amilases), *R. delemar* (lipases, biotina – vitaminas H e B8), e *R. japonicus* (biotina) *Rhizopus spp.* (pectinases), *Blakeslea trispora*, *Choanephora cucurbitarum* (β -caroteno), *Cunninghamella blakesleeana* (cortisol e ácido fumárico), *Helicostylum piriforme*, *Mortierella renispora* (proteases), *Rhizomucor meihei* e *R. pusillus* (renina) (TRUFEM, 1998).

Basidiomicetos também produzem substâncias com propriedades medicinais e alguns exemplos são: *A. blazei* (ação antitumoral), *Flammulina velutipes* (redução dos níveis de colesterol), *Grifola frondosa* (redução do colesterol, ação antitumoral, redução da pressão sanguínea, antidiabético), *Tremella spp.* (efeitos tônicos),

Tricholoma lobayense e *Trametes versicolor* (ação antitumoral), *Volvariella spp.* (efeitos cardiotônicos) e *Ganoderma lucidum* (estimulante do sistema imunológico, efeitos cardiotônicos, ação anticancerígena e efeito hipoglicêmico) (KUO et al., 2002; NOVAES, 2004).

A descoberta da **Penicilina** despertou grande interesse no isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por fungos e com atividade antibiótica. O fungo *Penicillium notatum* é um exemplo de ascomiceto, responsável pela produção industrial da penicilina, o primeiro antibiótico descoberto em 1929, seguido pela **Cefalosporina** e pela **Griseofulvina**. Outro exemplo importante é a produção das **Ciclosporinas**, metabólitos com efeitos imunossupressores, utilizados em pacientes submetidos a transplantes. O fungo *Claviceps purpurea* produz a **Ergotamina**, utilizada na medicina contra insônia, tem alto poder vasoconstrictor e de contração muscular. Espécies de *Aspergillus*, de *Penicillium* e de *Cladosporium* originam **Cortisona**, **Hidrocortisona**, **Progesterona**, **Testosterona** e **Estradiol** (BONONI e GRANDI, 1999). *A. terreus* produz **Mevinolin** que tem a propriedade de reduzir o colesterol e é comercializado para tratamento de hipertensão arterial (SHIAO e DON, 1987). *Petromyces alliaceus* produz **Aspercilin**, utilizado no tratamento de distúrbios gástricos.

Existe grande número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (PANDEY, 1998; VERPOORTE, 1998). Em 1998, Shu listou os produtos naturais mais promissores do ponto de vista da indústria farmacêutica e cerca de 90% foram isolados de microrganismos do solo. Entretanto, até 1998 apenas cerca de 10% da biodiversidade mundial haviam sido estudados e 140 mil metabólitos intermediários, oriundos, sobretudo de plantas superiores e de microrganismos haviam sido isolados e caracterizados, mas não avaliados biologicamente (VERPOORTE, 1998).

Em 2002, Schulz et al. demonstraram que 51% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos ainda eram desconhecidas. Newman et al. (2003) demonstraram detalhadamente a importância de produtos naturais e de estruturas derivadas e/ou relacionadas para o tratamento de doenças humanas.

Fenical (2006) relatou que mais de 30 moléculas de origem marinha e com ação antitumoral estavam em desenvolvimento em fase pré-clínica ou clínica, além

de outras em estudo para o tratamento de dor aguda, mal de Alzheimer, malária e outras doenças infecciosas.

Associações entre plantas e microrganismos, especialmente, fungos e bactérias endofíticas e da rizosfera, representa uma ampla fonte de produtos naturais conforme estudo publicado por Gunatilaka (2006), e que descreve 230 metabólitos isolados e caracterizados com relação às atividades biológicas.

Estudos relatam que fungos endofíticos de plantas de manguezais são importantes fontes de metabólitos farmacologicamente ativos (LIN et. al., 2002; JIN et. al., 2004; XU et. al., 2004). Os fungos *Fusarium spp* ZZ51 e o *Diaporthe spp* foram coletados em áreas de manguezais da China e quatro compostos com atividade antimicrobiana e antitumoral foram obtidos (LIN et al., 2005; NI et al., 2008).

Dentre as actinobactérias, espécies de estreptomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces* são responsáveis pela produção de mais de oitenta antibióticos, como por exemplo, a **estreptomicina** sintetizada por *S. griseus*, a **clorotetraciclina**, sintetizada por *S. aureofaciens* e a **terramicina**, sintetizada por *S. rimosus* (QUINN et al., 2005). A *Salinospora spp.* é um outro importante gênero recentemente estudado que produz diversas moléculas como a **salinosporamide A** que apresenta propriedade antitumoral e é sintetizada pela bactéria *S. tropica* (FENICAL, 2006). O gênero de actinobactéria *Micromonospora* produz alcalóides manzaminas que estão em testes pré-clínicos como potentes agentes antimaláricos (RAO et al., 2004) e a *Micromonospora sp.* M39 isolada da rizosfera de manguezal produz substâncias com ação antifúngica (ISMET et al., 2004).

2.4 INFECÇÕES FÚNGICAS E TRATAMENTO

Esse tópico apresenta uma classificação geral dos diferentes tipos de infecções causadas por fungos e as descreve de forma sucinta somente para contextualizar o tema. Infecções como candidemia, criptococcose, aspergilose e dermatofitoses foram descritas com maior ênfase por serem causadas por patógenos empregados nos testes aplicados nesse estudo. O tratamento disponível para as infecções fúngicas também foi relatado com destaque para as classes de drogas com seus respectivos representantes.

As infecções fúngicas sistêmicas são causadas por fungos e nos últimos anos, foram responsáveis por alta morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Infecções oportunistas são freqüentes nesses pacientes e a população de risco inclui principalmente pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pacientes transplantados, pacientes submetidos a cirurgias invasivas (catéteres, nutrição parenteral), pacientes com malignidades hematológicas, queimaduras e recém-nascidos (WARNOCK, 2007).

Quadros infecciosos localizados ou disseminados podem ser desencadeados por ação de leveduras frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro. De modo contrário, fungos filamentosos normalmente, não fazem parte da microbiota animal e, portanto o homem não é um reservatório importante para esse grupo de fungos. As portas de entrada no hospedeiro são as vias aéreas superiores ou quebra na barreira epidérmica após traumatismos. Muitas espécies de fungos são patogênicas para o homem e em condições favoráveis como umidade, calor excessivo e debilidade do sistema imunológico, se reproduzem e podem desencadear infecções (FLEMING et al., 2002; WALSH et al., 2004). De acordo com os tecidos e órgãos afetados as micoses são classificadas em: (a) **superficiais**, (b) **cutâneas**, (c) **subcutâneas**, (d) **sistêmicas** ou **profundas**.

Nas **micoses superficiais** os fungos localizam-se nas camadas mais superficiais da pele, ao redor de pêlos e/ou cabelos e unhas. São originadas por microrganismos da microbiota normal ou adquiridas do meio ambiente. *Tinea nigra* (*Phaeoannelomyces werneckii* e *Stenella araguata*), *piedras negra* (*Piedraia hortae*), *piedras branca* (*Trichosporon spp.*) e *pitiríase versicolor* (*Malassezia furfur*) são as principais infecções superficiais (GOMPERTZ et. al., 2004a).

Micoses cutâneas ou **dermatomicoses** causadas por dermatófitos localizam-se na pele, pêlo ou unhas e aquelas causadas por *Cândida spp.* ocorrem na pele, unhas e mucosas em maior extensão. *Microsporum spp.*, *Trichophyton spp.* e *Epidermophytum spp.* são os principais agentes etiológicos. As micoses superficiais são também conhecidas como *Tineas* que recebem o nome dependendo da localização, por exemplo do couro cabeludo (*Tinea capitis*), dos pés (*Tinea pedis*), das mãos (*Tinea manun*), das unhas (*Tinea unguium*), da barba (*Tinea barbae*) e do corpo (*Tinea corporis*). São extremamente pruriginosas e em imunodeprimidos podem atingir tecidos subcutâneos (GOMPERTZ et. al., 2004b).

Os fungos responsáveis **pelas micoses subcutâneas** localizadas na pele e nos tecidos subcutâneos crescem no solo ou em vegetação em decomposição e infectam o tecido subcutâneo através da pele traumatizada. O *Sporothrix schenckii* é o patógeno da **esporotricose**, infecção subcutânea e em humanos, é associada ao contato com gatos infectados por *S. schenckii* e contaminação através de lesões na pele. **Cromoblastomicose, feo-hifomicose, eumicetomas e doença de Jorge Lobo (lobomicose)** são também exemplos de micoses subcutâneas (GOMPERTZ et. al., 2004c).

Nas **micoses sistêmicas** ou **profundas**, os fungos podem infectar a pele e órgãos internos e vísceras, como pulmões, intestinos, ossos ou sistema nervoso. A infecção ocorre através da instalação de fungos encontrados principalmente no solo e dissemina-se através da circulação sanguínea e linfática. Os principais patógenos dessas infecções são *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* responsáveis pelas **coccidioidomicose, paracoccidioidomicose, histoplasmose e blastomicose**, respectivamente (SPINELLO et al., 2008; RESTREPO et al., 2008; HAGE et al., 2008; BLADSHER, 2008).

A epidemia do HIV é um dos principais fatores que contribuíram para o significativo aumento das infecções fúngicas invasivas. Em países desenvolvidos, antes do uso difundido da Terapia Anti-retroviral Altamente Ativa (HAART), cerca de 80% dos portadores do HIV desenvolviam candidíase mucosa, enquanto outros desenvolviam criptococose, pneumocitose e outras infecções fúngicas letais, como a penicilose. Nesses países, a difusão da HAART reduziu de forma notável as infecções fúngicas oportunistas associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Em contraste, nos países em desenvolvimento, a incidência dessas doenças é grande e está em crescimento (WARNOCK, 2007).

A frequência e a diversidade de infecções fúngicas graves estão aumentando e uma revisão publicada recentemente descreve um seletivo grupo de patógenos raros e emergentes como fungos hialinos, leveduriformes e dematiaceos responsáveis por diversas doenças clínicas (VARKEY e PERFECT, 2008). Embora as espécies de *Candida* e *Aspergillus* sejam predominantes em infecções fúngicas invasivas em pessoas imunocomprometidas, infecções causadas por fungos filamentosos hialinos e dermatofíticos estão sendo relatados com maior frequência (FLEMING et al., 2002; WALSH et al., 2004).

- Candidíase

Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por infecções fúngicas superficiais em indivíduos imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos (WARNOCK, 2007).

C. albicans é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém, as espécies *não-albicans* têm aumentado em número e importância nas candidíases vaginal e sistêmica (REX et al., 2000).

Candidíases da Orofaringe é a infecção oportunista mais comum em 80 a 95% dos pacientes portadores do HIV, quando a contagem dos linfócitos T-CD4 está abaixo de 200 células/mm³. No Brasil, o sorotipo A para *C. albicans* é predominante, particularmente em pacientes com AIDS e HIV-infectados enquanto que na Europa e nos EUA, segundo alguns estudos, o sorotipo B parece prevalecer (SANT'ANA et al., 2002).

No Brasil, 145 episódios de infecção sistêmica causada por *C. albicans* e espécies *não-albicans* foram detectados num período de 22 meses em seis hospitais de assistência médica de nível terciário. Entretanto, a infecção urinária por *Candida*, tem sido documentada por relatos de casos isolados e por estudos recentes que priorizaram condições predisponentes específicas (FEBRÉ et. al., 1999; OLIVEIRA et al., 2001). Colombo et al. (2006) relataram uma alta incidência de candidemia registrada em 11 centros médicos no Brasil, com 712 casos em 21 meses (2,49 casos por 1.000 admissões), sendo *C. albicans* a espécie predominante. Embora os casos desta infecção sejam raramente documentados para pacientes não hospitalizados, a sua ocorrência e a prevalência de crianças na sua casuística em hospitais brasileiros é maior do que nos Estados Unidos e Europa (WISPLINGHOFF et al., 2004).

- Criptococose

A Criptococose é uma infecção oportunista comum em pacientes com AIDS e/ou imunocomprometidos (WARNOCK, 2007).

Cryptococcus neoformans (teleomorfo, *Filobasidiella neoformans*) é o principal responsável pela meningoencefalite causada por fungos em pacientes imunocomprometidos. É um basidiomiceto, que se apresenta na forma tecidual como

levedura encapsulada. Em pacientes imunocomprometidos a maioria das infecções são causadas por *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) ou var. *neoformans* (sorotipo D), e em menor proporção por *C. gattii* (sorotipos B e C) (JARVIS e HARRISON, 2008). O *Cryptococcus* pode infectar ou se difundir por todo o órgão e causar infecções localizadas na pele, olhos, miocárdio, ossos, articulações, pulmões, e glândula da próstata ou trato urinário (SEATON et al., 1997; SOBEL et al., 1999).

Em um estudo realizado no período de 1995 a 2005 com o perfil clínico-epidemiológico de 123 casos de criptococose diagnosticados no Estado de Mato Grosso do Sul/ Brasil foi demonstrado que 84,9% dos casos tinham associação com HIV, 4,9% tinham outra condição predisponente e 10,6% eram pacientes imunocompetentes. O envolvimento do sistema nervoso central ocorreu em 83,7% dos pacientes, sendo *C. neoformans* a espécie identificada predominantemente e em menor proporção *C. gattii* (LINDENBER et al., 2008).

- Aspergilose

Infecções causadas por espécies de *Aspergillus* são denominadas aspergiloses. As manifestações clínicas são variáveis e o pulmão é o órgão mais atingido. O acometimento de indivíduos com o sistema imunológico imunocomprometido caracteriza-se por reações de hipersensibilidade no sistema respiratório e comprometimento saprofítico de cavidades pulmonares (caverna). A capacidade de invasão do *Aspergillus* em tecidos e órgãos associa-se usualmente, com imunossupressão de várias etiologias (WALSH, 2008).

O *A. fumigatus* pode colonizar cavidades pulmonares pré-existentes, como por exemplo, as decorrentes de seqüelas de tuberculose pulmonar e neste caso, forma-se o Aspergiloma ou Micetoma (WALSH, 2008). *A. fumigatus* é o principal responsável por causar aspergilose e levar à morte pacientes com leucemia e transplantados de medula óssea. Nos últimos anos, a aspergilose foi a infecção fúngica sistêmica com segundo índice de mortalidade dentre pacientes imunocomprometidos. Este índice também é freqüente em pacientes que fazem uso por longo prazo de esteróides e de drogas imunossupressoras, antibióticos de grande espectro e quimioterapia (MARIUSHI et al., 1999, WALSH, 2008).

Em hospitais, a aspergilose representa uma significativa ameaça para pacientes imunocomprometidos, sendo numerosos os casos de aspergilose invasiva

descritos. Uma análise realizada utilizando dados de 53 estudos (publicados na base de dados Pubmed) envolvendo 458 pacientes mostrou que 77,7% dos pacientes apresentaram infecção primária por *Aspergillus* spp. no trato respiratório inferior, sendo *A. fumigatus* a espécie predominante em 43,5% dos casos (VONBERG e GASTMEIER, 2006).

- Dermatofitoses

Nas últimas décadas, há uma tendência mundial de predomínio do *Trychophyton rubrum* como agente das dermatofitoses, principalmente quando localizadas no pé, unha e corpo. Essa ocorrência também é verificada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil e varia de região para região e com o decorrer do tempo. Fatores como variações climáticas, aspectos socioeconômicos, modo de vida, presença de animais domésticos e idade influenciam a distribuição da biota dermatofítica.

Um estudo realizado no período de 1996 a 1998 na cidade de São Paulo demonstrou que o dermatófito isolado com maior frequência foi o *T. rubrum* (65,5%), seguido por *Microsporum canis* (13,7%), *T. tonsurans* (10,6%), *T. mentagrophytes* (7,3%), *Epidermophyton floccosum* (1,7%) e *M. gypseum* (1,3%) (RUIZ e ZAITZ-ESMENJAUD, 2001).

A onicomicose trata-se de uma infecção que acomete as unhas e no século XIX apresentava maior frequência em crianças com *tinea capitis*, possivelmente devido à transmissão da infecção fúngica do couro cabeludo para as unhas dos dedos das mãos. A presença de *tinea capitis* e *tinea pedis* são constatadas concomitantes (ARENAS e RUIZ-ESMENJAUD, 2004).

- Tratamento das infecções fúngicas

As classes de fármacos atualmente disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas são: antibióticos polienos; derivados de azóis; alilaminas e tiocarbamatos; morfollinas; análogos de nucleosídeo e equinocandinas (GEOGOPAPADAKOU e WALSH, 1996; KAUFFMAN e CARVER, 2008; ZONIOS e BENNETT, 2008).

Os polienos, **anfotericina B (AMB)** e **Nistatina** atuam por ligação a ergosterol na bicamada da membrana (ODDS et al., 2003) causando redução da função da barreira formando um canal através do qual componentes da célula, especialmente íon potássio, podem passar. Ocorre destruição do gradiente de próton na membrana e morte do microorganismo

A **AMB** (produzida por *Streptomyces nodosus*) é uma droga fungicida, mas tóxica e permanece como uma das melhores alternativas para tratamento de micoses sistêmicas graves causadas por *Blastomyces spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Histoplasma spp.* (GUPTA et al., 2002). Em geral, os efeitos colaterais crônicos resultam da nefrotoxicidade e a toxicidade está associada à ligação ao colesterol na membrana celular de mamíferos.

Nistatina é estruturalmente relacionada à **AMB**. Devido à toxicidade o uso é limitado para infecções tópicas mas também empregado em casos de candidíase e criptococose (NASTI et al., 2006).

Os antifúngicos azóis são constituídos por imidazóis e triazóis e têm como mecanismo de ação a inibição da biossíntese de ergosterol. Os imidazóis (**Cetoconazol**, **Miconazol**, **Clotrimazol**) tem uso predominantemente tópico e os triazóis (**Fluconazol**, **Itraconazol**, **Voriconazol** e **Posaconazol**) são preferencialmente administrados para tratamento de infecções sistêmicas. Estes antifúngicos podem causar elevações assintomáticas de enzimas envolvidas na função hepática, bem como raros casos de hepatite. O cetoconazol é o mais tóxico e pode inibir a síntese de testosterona e de cortisol (GUPTA et al., 2002). **Voriconazol** e **Posaconazol** foram desenvolvidos para superar a limitada eficácia do fluconazol sobre *Aspergillus* e para melhorar a absorção, tolerabilidade e perfil de interação do itraconazol. Voriconazol é estruturalmente similar ao fluconazol e posaconazol ao itraconazol (ZONIOS e BENNETT, 2008).

A **flucitosina** (5-fluorocitosina) é um derivado fluorado da citosina, utilizada principalmente em combinação com a **AMB** no tratamento da candidíase e criptococose. Trata-se de um análogo de pirimidina (fluorpiridina) e no citoplasma, **5-fluorocitosina** é convertida em **5-fluoruracila** por uma desaminase e este composto inibe a timidilato sintase de maneira irreversível (ODDS et al., 2003).

Alilaminas, como **Naftinas** e **Terbinafinas**, e o tiocarbamato, **Tolnaftato**, são inibidores da biossíntese de ergosterol. Apresentam baixo efeito em espécies de *Candida* provavelmente devido à incapacidade de permearem a membrana

plasmática. A **terbinafina** tem efeito fungicida ou fungistático em *Candida* e ação fungicida em dermatófitos. A **naftina** e **Tiocarbamato** são antifúngicos tópicos utilizados no tratamento de infecções por dermatófito. Embora raramente relatada, pode ocorrer desenvolvimento de resistência a alilaminas ou tiocarbamatos (BALKIS et al., 2002; ODDS et al., 2003).

A **Griseofulvina** produzida pelos fungos *P. griseofulvum* e *P. janczewskii* é um composto utilizado no tratamento de dermatofitoses e deve ser administrado por longo período de tempo. Interage com microtúbulos envolvidos na formação do fuso mitótico dos fungos, pode inibir a síntese de RNA e DNA. O efeito colateral mais comum é a cefaléia e os menos freqüentes incluem distúrbios gastrointestinais, sonolência e hepatotoxicidade (ODDS et al., 2003).

As **equinocandinas** constituem uma nova classe de drogas antifúngicas e dentre os compostos destacam-se a **caspofungina**, **micafungina**, e **anidulafungina** que são aprovadas para uso em humanos. Estas drogas apresentam baixa toxicidade, excelente tolerabilidade e ação contra espécies de *Aspergillus* e *Candida*, incluindo as espécies Fluconazol resistentes. Todas as equinocandinas atuam por inibição competitiva da β -1-3 glucano-sintetase, importante enzima envolvida na síntese de um polissacarídeo vital para a formação da parede celular de fungos. Como células de mamíferos não possuem parede celular, as equinocandinas apresentam especificidade pelo alvo de ação (DE LA TORRE e REBOLI, 2007; KAUFFAMAN e CARVER, 2008).

2.5 TUBERCULOSE E TRATAMENTO

O *Mycobacterium tuberculosis* foi descrito por Robert Koch em 1882 e essa micobactéria é o agente etiológico da tuberculose. Desde 1993, a organização Mundial de Saúde (OMS) a declarou como uma infecção de emergência global e implementou vários programas para seu controle. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo. Cepas resistentes à quimioterapia é um grande problema que dificulta o tratamento dos pacientes (DOVER et al., 2008).

A tuberculose é uma doença infecciosa e granulomatosa e em pacientes imunocomprometidos pode ser letal, o bacilo pode infectar o pulmão, bem como a pele, ossos, rins, meninges e nódulos linfáticos. A vacina BCG (Bacilo Calmette-

Guérin), uma vacina viva baseada em *M. bovis* atenuada foi introduzida para uso humano em 1921. Embora seja amplamente utilizada, sua eficácia permanece controversa. Tem sido demonstrado, por meio de estudos clínicos, que o nível de proteção alcançado em diferentes populações varia de 0 a 75% e, além disso, a utilização de uma importante ferramenta de diagnóstico, o teste de hipersensibilidade cutânea, é dificultado em indivíduos que foram vacinados com BCG. No que concerne à segurança do BCG existe uma preocupação crescente com o uso de organismos vivos em indivíduos imunocomprometidos, fato especialmente agravante no caso da co-infecção tuberculose-HIV que tem se tornado cada vez mais freqüente (FRENCH et.al., 2008).

O tratamento quimioterápico (seis meses) constitui-se como o mais eficaz no combate à tuberculose, podendo curar até 85% dos casos. Os principais fármacos empregados são Rifampicina, Isoniazida, Estreptomicina, Pirazinamida e Etambutol, conforme *World Health Organization* (WHO, 1999). Entretanto nos últimos anos o número de casos de tuberculose recrudescceu em todo mundo, por razão da pandemia de AIDS e ao aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas. O surgimento de cepas resistentes é preocupante, pois existem poucas drogas efetivas contra a micobacteria, o que pode tornar a doença sem tratamento. Cepas de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina e à isoniazida têm surgido tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (ROSSETTI et al., 2002). Portanto, é de grande interesse para a saúde pública o investimento em pesquisas para desenvolvimento de medicamentos antituberculose e que sejam mais eficientes e menos tóxicos.

2.6 LEISHMANIOSE E TRATAMENTO

Leishmania é um gênero de protozoários flagelados, heteroxenos, dimórficos, pertencente à família Trypanosomatidae (ROSS, 1903). As leishmanioses são doenças endêmicas amplamente dispersas pelo mundo e ocorrem em 90 países. A incidência é de 2 milhões de casos/ano e a prevalência global é estimada em 12 milhões de casos. No período de 1999 a 2003 cerca de 33.872 casos de leishmaniose tegumentar americana foram registrados no Brasil (GUERRA et al., 2006).

A leishmaniasis apresenta-se na forma promastigota no hospedeiro invertebrado, os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) ou em culturas axênicas e na forma amastigota nos tecidos dos hospedeiros vertebrados ou em culturas de células do sistema fagocítico mononuclear. A transmissão do protozoário ocorre pela picada da fêmea de insetos hematófagos do gênero *Phlebotomus* (vetores no Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (vetores no Novo Mundo) infectados (GRIMALDI et al., 1987).

Na leishmaniose tegumentar (LT) ocorre um espectro de formas clínicas distintas, decorrentes de lesões na pele e mucosas do nariz, boca, faringe e laringe. Diversas espécies de leishmânias estão associadas com a LT, como as do complexo *L. major* (Velho Mundo) e as dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis* (Novo Mundo). A *L. amazonensis* provoca lesões cutâneas simples e em baixa porcentagem de indivíduos infectados há evolução para a leishmaniose cutânea difusa (REIS e GENARO, 2005).

Até o momento não há vacina eficaz e o tratamento para a doença ainda é inadequado demandando o uso diário de altas doses de quimioterápicos com diversas reações de toxicidade e o aparecimento de formas resistentes de *Leishmania*. O tratamento de primeira escolha para LTA humana é o antimonial pentavalente (antimoniato de N-metil-glucamina) encontrado comercialmente com o nome de Glucantime. Embora este tratamento seja na maioria das vezes efetivo e indicado, algumas desvantagens devem ser consideradas, como: a) os efeitos colaterais, b) longa duração do tratamento e c) a contra-indicação para pacientes cardiopatas, nefropatas, idosos e grávidas. Casos de resistência a este composto também têm sido recentemente publicados. Quando não ocorre resposta terapêutica satisfatória com o antimonial ou no impedimento de sua prescrição, a AMB é droga de segunda escolha, porém apresenta alta toxicidade, baixa tolerância e muitos efeitos colaterais. Na literatura há descrição de uma ampla diversidade de extratos brutos naturais ou metabólitos secundários ativos contra espécies de *Leishmania*, no entanto novas drogas ainda não foram descritas (MACHADO et al., 2007).

2.7 DOENÇA DE CHAGAS E TRATAMENTO

Foi descrito por Carlos Chagas (1909) como *Trypanosoma cruzi* o protozoário flagelado, pertencente à família Trypanossomatidae e agente etiológico da doença de Chagas, cujo número de óbitos provocados pela doença atingiu 4.931 no Brasil no ano de 2003 (SANTO, 2007).

A transmissão do protozoário é feita através do inseto *Triatoma infestans* (Hemíptera: Reduviidae), popularmente conhecido como barbeiro, chupão ou fincão, que se alimenta geralmente a noite do sangue humano. O local da entrada do parasita é geralmente marcado por uma lesão de pele denominada chagoma de inoculação. No caso da contaminação pela conjuntiva ocular, esta lesão é denominada sinal de Romaña. Estudos mostraram que *T. cruzi* desenvolve-se principalmente em células fagocíticas mononucleares e em células musculares cardíacas e esqueléticas. Após um período de incubação, que pode variar de 7 a 10 dias inicia-se a fase aguda da doença e a maioria dos casos agudos não tratados evolui para a forma crônica indeterminada. Dos pacientes na fase crônica sintomática, 25% tem danos cardíacos progressivos como insuficiência cardíaca, distúrbios de ritmo e condução e aumento do coração, podendo ocorrer morte súbita. (LANA e TAFURI, 2005).

O tratamento clínico da doença está restrito ao uso de benznidazol (Rochagan®, Roche, N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) que é recomendado para o tratamento de infecção aguda, congênita e no estágio inicial da forma indeterminada da doença normalmente frequente em crianças e adolescentes. O tratamento pode eliminar o parasita e impedir a progressão da doença para a forma cardíaca e suas complicações. Este composto, entretanto, apresenta elevado grau de toxicidade e em alguns casos o tratamento é temporariamente suspenso ou mesmo abandonado (ANDRADE et al., 1996). A prescrição do tratamento na fase crônica é controversa devido a dificuldades em monitorar sua eficiência terapêutica (CANÇADO, 2002). As indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de quimioterápicos contra esta doença, por serem esses programas muito caros, especulativos e longos, não sendo assim justificáveis.

3 OBJETIVOS GERAIS

Este estudo teve como objetivo principal a obtenção de substâncias com ação antifúngica, antimicobacteriana, leishmanicida e/ou tripanossomicida a partir de isolados de actinobactérias do solo e de fungos de manguezais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) detecção da atividade antifúngica através de teste de antagonismo: isolados de actinobactérias do solo e fungos de manguezais testados frente aos patógenos *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*;
- b) obtenção de extratos orgânicos a partir da cultura dos isolados de actinobactérias do solo e de fungos de manguezais;
- c) detecção da atividade antifúngica dos extratos orgânicos sobre espécies de *T. rubrum*, *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans*:
 - determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM_s)
 - determinação das concentrações fungicidas (CF_s);
- d) determinação da ação tripanossomicida, leishmanicida e antimicobacteriana:
 - determinação do IC₅₀, concentração dos extratos orgânicos capaz de lisar 50% dos parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*
 - determinação das CIM_s sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- e) avaliação da citotoxicidade (IC₅₀) dos extratos que apresentarem CIM ≤ 400 µg/mL sobre as espécies de *T. rubrum*, *C. albicans*, *A. fumigatus* e/ou *C. neoformans*;
- f) fracionamento dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e caracterização físico-química por espectrometria de massas;
- g) identificação taxonômica dos isolados com promissora ação antimicrobiana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA DOS FUNGOS PATOGÊNICOS

Os fungos patogênicos empregados neste estudo referem-se a isolados clínicos de pacientes e nos foram cedidos pelo Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz/SP. Após re-identificação e confirmação de cada espécie, esses fungos foram depositados na Coleção de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro e receberam os seguintes códigos: *Candida albicans* IOC 4525, *Aspergillus fumigatus* IOC 4526, *Trichophyton rubrum* IOC 4527 e *Cryptococcus neoformans* IOC 4528.

Estes fungos foram manipulados em cabine de biossegurança classe II, modelo 400 (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil) e cultivados de acordo com as condições adequadas para o crescimento de cada patógeno e recomendações do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002a,2002b) (Tabela 1).

Tabela 1- Condições para cultura de *C. albicans*, *T. rubrum*, *A.fumigatus* e *C. neoformans*

Espécie	Meio de cultura	Tempo (d)	Temperatura (°C)
<i>C. albicans</i>	BDA	1-3	35
<i>T. rubrum</i>	BDA	<10	28-32
<i>A. fumigatus</i>	BDA	< 7	35
<i>C. neoformans</i>	BDA	< 7	35

BDA= Batata dextrose ágar, d= dia

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO SOLO E DE MANGUEZAIS

Actinobactérias de solos agrícolas de cultura de milho e/ou algodão e isolados de fungos de manguezais da região de Aracajú/SE e Cananéia/SP foram coletados em áreas previamente demarcadas.

Os microrganismos epifíticos foram isolados da superfície dos tecidos vegetais (folhas, raízes e caules) pela técnica de lavagem com água e os endofíticos foram isolados através da técnica de desinfecção superficial seguida de maceração

(GOMES et al., 2005). Microrganismos do solo foram isolados conforme procedimento também descrito por Gomes et al. (2005).

Os Microrganismos do solo e de manguezais empregados neste estudo foram codificados e classificados morfológicamente após o isolamento e cedidos pelo Laboratório de Microbiologia, Embrapa Meio Ambiente/Campinas. A Figura 2 representa a trajetória das etapas empregadas desde a coleta de isolados de actinobactérias do solo e fungos de manguezais até a avaliação da ação antifúngica, leishmanicida, tripanossomicida e antimicobacteriana dos extratos orgânicos e de suas frações obtidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Figura 2 - Representação esquemática das etapas empregadas na produção de extratos orgânicos a partir da cultura de isolados de actinobactérias do solo e de fungos de manguezais e detecção de suas ações antifúngica, leishmanicida, tripanossomicida e antimicobacteriana.

Neste estudo foram empregados 32 isolados de actinobactérias de solos agrícolas de cultura de milho e/ou algodão e 51 isolados de fungos de manguezais pertencentes a três gêneros de árvores na vegetação dos manguezais, (i) *Avicennia* (mangue preto), (ii) *Laguncularia* (mangue branco) e (iii) *Rhizophora* (mangue

vermelho) e de sua rizosfera. Dos isolados, 45 são epifíticos e 5 são endofíticos (Tabela 2).

Tabela 2 - Microrganismos utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana

Microrganismos	Códigos	Hospedeiro
32	ACN 06, ACN 08, ACN 11, ACN 14, ACN 18, ACN 19, ACN 26, ACN 41, ACN 44, ACN 49, ACN 56, ACN 58, ANTII 01, ANTII 03, ANTII 09, ANTII 15, ANTII 27, ANTII 31, ANTII 32, ANTII 33, ANTII 34, ANTII 36, ANTII 37, ANTII 40, ANTII 42, ANTII 50, ANTII 53, ANTII 55, ANTII 59, 0200R2, 0200R4, 0200R5	Solos agrícolas de milho e algodão
7	A-1-1, A-1-2, A-1-3, A-1-5, A-1-8, A-1-9, A-1-10	Epifítico de folha de <i>Avicennia</i>
13	L-1-1, L-1-3, L-1-6, L-1-8, L-2-2, L-2-5, L-2-6, L-2-7, L-3-1, L-3-10, L-3-4, L-3-5, L-3-6	Epifítico de folha de <i>Laguncularia</i>
1	MGE-178	Rizosfera de <i>Rizophora</i>
1	MGE-182,	Endofítico do caule de <i>Rizophora</i>
4	MGE-179, MGE-196, MGE-201, MGE-202	Endofítico de folha de <i>Rizophora</i>
25	R-1-1, R-1-3, R-1-4, R-1-7, R-1-9, R-2-11, R-2-14, R-2-15, R-2-17, R-2-18, R-2-3, R-2-4, R-2-5, R-2-6, R-2-8, R-2-9, R-3-10, R-3-11, R-3-12, R-3-2, R-3-4, R-3-5, R-3-6, R-3-7, R-3-8	Epifítico de folha de <i>Rizophora</i>

No laboratório, inicialmente os microrganismos foram preservados em água. Para tanto, um pequeno fragmento da cultura do microrganismo (± 3 mm) em meio contendo ágar foi removido e armazenado em frascos tipo penicilina contendo 5 mL de água destilada estéril e mantidos em temperatura ambiente.

4.3 TESTE DE ANTAGONISMO

Para a avaliação da ação antifúngica através do teste de antagonismo foram empregados os microrganismos listados na Tabela 2, sendo 32 isolados de actinobactérias e 51 isolados de fungos de manguezais.

Os microrganismos originalmente cultivados em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) (Himedia, Mumbai, MA, India) foram repicados para placas de Petri de 90 mm contendo também meio de cultura BDA e incubados a 28-30 °C. Após o crescimento, 4-5 colônias foram ressuspensas em meio de cultura RPMI (Himedia, Mumbai, MA, India) ou solução salina para uso no teste do antagonismo contra os fungos patogênicos (PILEGGI, 2005).

Colônias de *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* e *A. fumigatus* cultivados em meio de cultura BDA foram transferidas para tubo de ensaio de 15 mL (polipropileno/ tipo Falcon) contendo 5 mL de solução salina. A suspensão foi homogeneizada e 100 µL foram aplicados por toda a superfície de uma placa de Petri de 90 mm contendo meio de cultura BDA. A placa foi mantida em repouso por aproximadamente 2 horas até total “secagem” da suspensão do patógeno. Em seguida, 25 µL da suspensão dos microrganismos testes (actinobactérias e/ou fungos de manguezais) foram aplicados em um ponto marcado da placa. As placas foram mantidas em estufa por 96 horas a 30-32°C e, após esse período, o tamanho do halo de inibição formado entre a borda das colônias do fungo patogênico e a borda dos microrganismos em teste foi determinado (PILEGGI, 2005). Os halos formados foram classificados em 3 dimensões: inferiores a 2 mm (+), de 2 a 5 mm (++) e superiores a 5 mm (+++).

Para os isolados de fungos de manguezais, um segundo ensaio de antagonismo também foi realizado. Um fragmento de cultura dos isolados crescidos em meio BDA (± 3 mm) foi removido e transferido para um tubo de ensaio. Cerca de 2 mL de Acetato de Etila (AE) ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram adicionados ao tubo e a mistura foi triturada com auxílio de uma espátula. Em seguida, 25 µL da fase orgânica foram transferidos para um disco de papel e após a evaporação do solvente, o disco foi colocado em uma placa de petri contendo BDA e o fungo patogênico previamente inoculado. As placas foram mantidas em estufa por 96 horas a 30-32°C e, após esse período, o tamanho do halo de inibição formado entre a borda das colônias do fungo patogênico e a borda dos discos de papel contendo o extrato orgânico dos microrganismos em teste foi determinado. A detecção de ação antagônica foi comprovada através da inibição ou não do crescimento do patógeno no local de sobreposição do extrato em AE.

4.4 PRODUÇÃO DE EXTRATOS ORGÂNICOS

Microrganismos testes previamente selecionados a partir do teste de antagonismo foram cultivados em meio de cultura BDA e um pré-inóculo de cada amostra foi preparado a partir de colônias ressuspensas em 2 mL de meio de cultura RPMI 1640.

O pré-inóculo foi mantido por 24-48 horas em estufa a 32 °C e após este período o mesmo foi ressuspenso em 150 mL de meio de cultura líquido Batata Dextrose (BD) (Himedia, Mumbai, MA, India) em erlenmeyer de 500 mL. A cultura foi mantida sob agitação em “Shaker” modelo MA-420 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) a 120-140 rpm por 7 dias, a 28 °C. Após esse período a suspensão da cultura foi centrifugada por 30 minutos a 7.000 rpm em centrífuga Sorvall, modelo RC2-B, rotor GS-3- GS3 (Du Pont Sorvall Products, Newton, Connecticut, USA) e a partir do sobrenadante procedeu-se o processo de extração com solventes orgânicos. A biomassa foi descontaminada em autoclave à 121 °C por 30 minutos.

Os sobrenadantes foram submetidos à extração com 30 mL de diclorometano (DCM) (CH_2Cl_2) (Synth, Diadema, S.P., Brasil), acetato de etila (AE) ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) (Synth, Diadema, SP, Brasil) e hexano (HEX) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) (Synth, Diadema, SP, Brasil). Os solventes foram evaporados em rotaevaporador modelo R-200/R-205 (Buchi, Essen, DEU, Alemanha) sob pressão reduzida e os extratos orgânicos brutos obtidos para cada isolado de microrganismo foram combinados.

A combinação dos extratos provenientes da extração com DCM, AE e HEX foi feita gradualmente. O extrato em DCM contido em balão de fundo redondo foi submetido à evaporação em rotaevaporador. Após secagem do DCM, o extrato em acetato de etila foi transferido para o mesmo balão e o solvente evaporado. Na seqüência, ao mesmo balão foi adicionado o extrato em hexano e este também evaporado. O extrato bruto final obtido (combinado) foi mantido em dessecador e protegido da luz. Os extratos orgânicos foram combinados de modo a reduzir o número de amostras a serem testadas no ensaio de determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM_s). A massa final de extrato para cada amostra foi quantificada e posteriormente usada nos ensaios para avaliação da ação antifúngica através da determinação das CIMs, sobre espécies clínicas de *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* e *A. fumigatus*.

4.5 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA

A avaliação da ação antifúngica foi realizada através dos ensaios de determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM_s) e concentrações fungicidas (CF_s) dos extratos orgânicos sobre espécies de *T. rubrum*, *C. albicans*, *A. fumigatus* e *C. neoformans*.

Para uso nos ensaios de CIM_s o preparo das suspensões dos patógenos foi efetuado com base no Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002a, 2002b). Colônias dos fungos (5-10) foram transferidas para tubo de ensaio de 15 mL contendo 5 mL de solução salina e a suspensão foi homogeneizada por agitação. O número de Unidades Formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL), foi determinado por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 530 nm (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) e comparação a curvas padrões de crescimento previamente estabelecida para cada espécie de patógeno. As concentrações das suspensões dos patógenos foram ajustadas em meio de cultura RPMI 1640 de forma a se obter $0,5-2,5 \times 10^3$ e $0,4-5,0 \times 10^4$ UFC/mL para leveduras (*C. albicans* e *C. neoformans*) e fungos filamentosos (*T. rubrum* e *A. fumigatus*) respectivamente (CLSI, 2002a, 2002b).

- Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas - Microdiluição em placas

Os extratos orgânicos dos microrganismos previamente selecionados pelo teste de antagonismo (halos ≥ 2 mm) foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, SP, Brasil), filtrados em membrana estéril de 0,22 μ m (membrana de celulose regenerada) e em seguida diluídos em meio de cultura RPMI 1640 (com glutamina, vermelho de fenol e MOPS 0,165 Mol/L (Calbiochem, Ghent, Belgica)) a 4.000 μ g/mL.

Em uma placa de 96 cavidades, 100 μ L dos extratos orgânicos foram serialmente diluídos em meio de cultura RPMI 1640 nas concentrações de 31,2 a 2.000 μ g/mL. A cada cavidade da placa foram adicionados 100 μ L da suspensão de *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* ou *A. fumigatus* em meio de cultura RPMI

1640 e a placa foi incubada em temperatura e tempo adequados ao patógeno (Tabela 3) (CLSI, 2002). A concentração de DMSO em cada extrato foi inferior a 2%.

O controle positivo foi uma suspensão de patógenos livre de antibióticos e o controle negativo, uma suspensão de patógenos contendo Anfotericina B em concentrações inferiores a 16 µg/mL. Para indicação da presença ou ausência de crescimento fúngico, 24 horas antes do término do experimento, adicionou-se em cada cavidade da placa, 25 µL do corante Rezazurin a 0,02% (PALOMINO et al., 2002). Nos ensaios com *C. albicans*, o corante foi adicionado logo após a adição da levedura (tempo 0 horas).

A leitura das CIM_s foi efetuada por observação macroscópica da cor do Rezazurin. Este tem cor azul e sua alteração para rosa indica a presença de crescimento do patógeno, enquanto a permanência da cor azul indica ausência de crescimento. As CIMs foram definidas como a menor concentração dos extratos em teste capaz de impedir a alteração da cor azul para rosa. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos pela média das CIMs obtidas para cada ensaio.

- Determinação da Concentração fungicida (CF)

A partir do resultado do ensaio de CIM procedeu-se a avaliação da ação fungicida dos extratos que apresentaram CIM ≤ 400 µg/mL. Para tanto, 50 µl das suspensões presentes nas cavidades da microplaca e correspondentes a CIM e duas concentrações acima desse valor foram inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 30-32°C e observadas até 96 horas após o inóculo para detecção da presença ou ausência de crescimento do patógeno.

4.6 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICOBACTERIANA

O *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 foi cultivado em meio de cultura sólido Lowenstein-Jensen (LJ) (Becton Dickinson, Quilaban, Portugal) a 37 °C por aproximadamente 25 dias e em seguida foi subcultivado em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco, Detroid, MI) por 7 dias. Uma suspensão foi preparada em

solução salina e a concentração foi ajustada de forma a se obter 4×10^5 micobacterias/mL (comparação a uma curva padrão) a serem usadas no ensaio de CIM.

As CIM_s foram obtidas através da técnica da microdiluição em placa, utilizando como revelador o corante Rezazurin (COLLINS e FRANZBLAU, 1997; PALOMINO et al., 2002; DE SOUZA et al., 2005). Os extratos orgânicos dos microrganismos previamente selecionados pelo teste de antagonismo (A-1-8, ACN 08, ACN 26, ACN 41, ACN 49, ANTII 15, ANTII 27, ANTII 31, ANTII 33, ANTII 34, ANTII 36, ANTII 40, 0200R2, 0200R5, L-2-2, MGE-182, MGE-196, MGE-201, MGE-202, R-2-3, R-2-14 e R-3-10), foram dissolvidos em DMSO, filtrados em membrana estéril de 0,22 µm e em seguida diluídos em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 nas concentrações de 2.000 µg/mL. Em uma microplaca de 96 cavidades os extratos em teste foram serialmente diluídos nas concentrações de 0,5 a 1.000 µg/mL em meio de cultura Middlebrook 7H9 e 100 µL da suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv foram adicionados a cada cavidade. A concentração final dos extratos no ensaio foi de 0,25 a 500 µg/mL e a concentração de DMSO para cada extrato foi inferior a 2%. O controle positivo foi uma suspensão de micobactérias livre de antibióticos e o controle negativo, uma suspensão tratada com Rifampicina nas concentrações de 0,015 a 25 µmol/L.

As placas foram incubadas a 37 °C por 6 dias e em seguida 25 µL do corante Rezazurin a 0,02% foram adicionados às cavidades da placa. As placas foram então re-incubadas a 37 °C e após 24 horas foi realizada a leitura macroscópica para determinação das CIMs, definidas como a menor concentração dos extratos capaz de impedir a alteração da cor azul para rosa. Os ensaios foram realizados três vezes e em experimentos independentes e os resultados expressos pela média das CIMs obtidas por leitura visual. A presença das cores azul e rosa indica a ausência e presença de crescimento microbacteriano, respectivamente.

4.7 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA

A determinação da ação leishmanicida foi realizada para os extratos produzidos pelos isolados de actinobactérias e fungos de manguezais A-1-8, ACN 49, L-2-2, MGE-182, MGE-201, MGE-202 e R-2-3. Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/ BR/77/ LTB0016) em meio de cultura Schneider de

Drosófila (Sigma, Chemical Co, ST Louis, MO, USA) foram incubadas a 20 °C em microplacas de 96 cavidades ($5,0 \times 10^6$ células/mL) juntamente com os extratos nas concentrações de 31,25 a 1.000 µg/mL. Como controles foram utilizados Isotionato de Pentamidina, meio de cultura RPMI 1640 e DMSO a 1%. A porcentagem de parasitas mortos foi calculada em relação ao grupo controle tratado somente com meio de cultura. O resultado expressa a concentração do extrato versus a porcentagem de lise dos parasitas e o valor de IC_{50} corresponde à concentração do extrato que lisa 50% dos parasitas. Os ensaios foram feitos em triplicata em pelo menos dois experimentos independentes de acordo com o procedimento descrito por Williams et al. (2003).

4.8 DETERMINAÇÃO DA AÇÃO TRIPANOSSOMICIDA

A determinação da ação tripanossomicida foi realizada para os extratos de isolados de actinobactérias e fungos de manguezais A-1-8, ACN 49, L-2-2, MGE-182, MGE-201, MGE-202 e R-2-3. A ação tripanossomicida dos extratos foi avaliada sobre a forma tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi* através da lise celular *in vitro*.

Os extratos foram dissolvidos em DMSO na concentração de 100 mg/mL e serialmente diluídos em microplacas de 96 cavidades em meio de cultura *Dulbecco's modified eagle's médium* (DMEM) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), a 37 °C nas concentrações de 2 a 1.000 µg/mL. A seguir, a cada cavidade da placa foram acrescentados 100 µL de uma suspensão de tripomastigotas de *T. cruzi*, para uma concentração parasitária final de $5,0 \times 10^6$ parasitas/mL. Como controles, parasitas foram incubados em meio de cultura DMEM livre de drogas ou contendo a droga padrão, o benznidazol (IC_{50} 12,89 uM $\pm$ 1,12 uMol/L ou 2,06 µg/mL).

A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e em seguida os parasitas foram contados utilizando-se câmara de Neubauer para verificação da atividade lítica. A porcentagem dos parasitas mortos foi calculada em relação ao controle. O resultado foi expresso pela concentração do extrato versus a porcentagem de lise dos parasitas e o valor de IC_{50} que corresponde à concentração do extrato que lisa 50% dos parasitas foi calculado. Foram realizados de 3-4 experimentos

independentes, de acordo com o procedimento previamente descrito (DE CASTRO et al., 1987; DE CASTRO et al., 1993, 1994).

4.9 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade em cultura de macrófagos J774 foi determinada para os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202. Os extratos foram dissolvidos em DMSO, filtrados em membrana estéril de 0,22 µm e diluídos em meio de cultura RPMI 1640 nas concentrações de 25 a 600 µg/mL.

Uma suspensão de macrófagos J774 cultivados a 37 °C em meio de cultura RPMI 1640 foi preparada e distribuída em placas de 96 cavidades na concentração de $2,0 \times 10^6$ células/mL (100 µL/cavidade). As placas foram incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 12 horas e em seguida o meio de cultura foi substituído por outro contendo os extratos em teste. Cavidades controles receberam somente meio RPMI 1640 com DMSO a 2%. As placas foram novamente incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ e decorridas 24 horas de tratamento das células procedeu-se os ensaios de: Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), da incorporação do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] vermelho Neutro (VN) e da quantificação do conteúdo de ácidos nucléicos (DNA).

4.9.1 Redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT)

O teste de redução do MTT foi realizado de acordo com o método descrito por Denizot e Lang (1986). Após 24 horas de tratamento das células, o meio de cultura contendo os extratos em teste foi substituído por 100 µL de meio RPMI (sem vermelho de fenol e sem Soro Fetal Bovino (SFB) contendo MTT (0,5 mg/mL) em cada cavidade. As placas foram incubadas por 4 horas, à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ e em seguida o sobrenadante foi removido e 100 µL de etanol foi adicionado a cada cavidade para solubilizar o formazan produzido. As placas foram agitadas por 20 minutos em um agitador de placas e as absorbâncias das soluções determinadas a 570 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, MN, USA). Foram construídos gráficos de porcentagem da viabilidade celular de acordo com a capacidade de redução do corante MTT pelas células versus concentração dos

extratos utilizados, obtendo-se, por interpolação, o valor de IC_{50} para cada amostra. Células não tratadas receberam somente RPMI 1640 e foram consideradas como 100% viáveis (controle).

4.9.2 Incorporação do corante hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina] Vermelho Neutro (VN)

O teste de incorporação do corante VN foi realizado de acordo com o método de Borenfreund e Puerner (1985). Após 24 horas de tratamento, o meio de cultura contendo os extratos em teste foi trocado por meio RPMI 1640 (sem vermelho de fenol e sem SFB) contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de VN e as células foram incubadas novamente por 4 horas, à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 . Após incubação, o meio com VN foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS- Ca^{++} para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomos. A cada cavidade foram adicionados 100 μL de solução aquosa contendo 1% de ácido acético glacial e 50% de etanol para fixar as células e extrair o VN incorporado nos lisossomos. As placas foram agitadas por 20 minutos e as absorbâncias das soluções determinadas a 540 nm em espectrofotômetro. Foram construídos gráficos que expressam a captação do corante por células tratadas com relação à células não tratadas (controle) versus concentração das amostras utilizadas, obtendo-se, por interpolação, o valor de IC_{50} para cada amostra.

4.9.3 Quantificação do conteúdo de Ácidos Nucléicos (DNA)

O número de células nas cavidades (controles e tratadas) foi estimado através da quantificação do conteúdo de ácidos nucleicos conforme Cingi et al. (1991). Após 24 horas de tratamento o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS- Ca^{++} e duas vezes com etanol (todas as soluções geladas), secas ao ar e lisadas com NaOH 0,5 Mol/L (100 μL /cavidade, 1 hora à 37 °C). A absorbância do lisado foi determinada a 260 nm em espectrofotômetro para quantificação do conteúdo de ácidos nucleicos. Foram construídos gráficos de proliferação de células tratadas com relação a células não tratadas (controle) versus concentração das amostras utilizadas, obtendo-se, por interpolação, o valor de IC_{50} para cada amostra.

4.10 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) - FRACIONAMENTO

Os extratos orgânicos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 previamente dissolvidos em DMSO foram submetidos à purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O equipamento Shimadzu 10A e uma coluna de fase reversa Sephasil (C18 5 μ , 4.6mm x 250 mm, Pharmacia Biotech) foram empregados.

A fração líquida extraída foi conduzida na coluna a 30 °C, em um sistema de dois solventes: (A) ácido trifluoroacético (TFA)/H₂O (1:1000) e (B) TFA/acetonitrila (ACN)/H₂O (1:900:100). A coluna foi eluída a um fluxo de 1,0 mL/minuto com um gradiente de 10–80% do solvente B por 25 minutos, depois isocrático a 10% por 5 minutos. A fração líquida eluída foi monitorada por detecção das absorvâncias a 214 e 254 nm. De acordo com o perfil cromatográfico de cada amostra, frações foram individualmente coletadas em tubos (15 mL/ tipo Falcon) e em seguida liofilizadas em liofilizador. As frações totalmente secas foram removidas dos tubos cuidadosamente com 200 μ L de solução salina e submetida ao ensaio de avaliação da atividade antifúngica.

O procedimento adotado para o ensaio foi semelhante ao teste de antagonismo descrito no item 4.3, porém com a diferença de que as suspensões dos fungos patogênicos utilizadas continham 0,5-2,5 x 10³ e 0,4-5,0 x 10⁴ UFC/mL para leveduras (*C. albicans* e *C. neoformans*) e fungos filamentosos (*T. rubrum* e *A. fumigatus*), respectivamente, ou seja, as mesmas empregadas nos ensaios de CIM. Após aplicar 25 μ L de cada fração em pontos delimitados nas placas de cultura contendo patógenos, as mesmas foram incubadas a 30-32 °C e observadas até 96 horas após o inóculo, para detecção da presença ou ausência de crescimento do patógeno na região onde a fração foi adicionada na placa.

4.11 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FRAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

As análises por espectrometria de massa foram realizadas através da infusão contínua de amostra empregando uma bomba de seringa. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas QToF II (Micromass, Manchester, UK)

operando com interface electrospray em modo positivo e negativo. As temperaturas da fonte e do gás de desolvatação foram 100 e 200 °C, respectivamente. Os espectros de EM, tanto em modo positivo quanto modo negativo, foram obtidos em condições experimentais idênticas, para *capillary* 3200 kV e voltagem do cone 25 V. A faixa de varredura para os espectros de EM foi de 100-2000 m/z. Para os espectros EM/EM foi feita uma varredura da energia de colisão entre 10-45 eV tendo argônio como gás de colisão.

4.12 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MICRORGANISMOS - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a caracterização morfológica dos microrganismos por microscopia eletrônica de varredura (MEV), fragmentos dos isolados de fungos de manguezais A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 crescidos em meio de cultura BDA foram pré-fixados em solução de Karnovsky modificada (Glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 Mol/L, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001 Mol/L) seguido de lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,05 Mol/L e pós-fixados em OsO₄ a 1% (Tamponado em tampão cacodilato 0,05 Mol/L, pH 7,2) por 1 hora. Após sucessivas lavagens as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (15, 30, 50, 75, 95, 100%) por 15 minutos cada. A última etapa foi repetida 3 vezes. Após as desidratações com acetona, as amostras foram secas ao ponto crítico em equipamento Balzers de Secagem. A metalização foi feita em Sputter EMITEC por 4 minutos sob corrente de 25 miliamperes e as amostras foram guardadas em dessecador para posterior análise por MEV.

A observação das amostras foi feita em Microscópio Eletrônico Digital de Varredura Gemini modelo LEO 982 com filamento de Emissão de Campo (LEO ELEKTRONENMIKROSKOPE GmbH, Oberkochen, Alemanha/ em cooperação com a Zeiss-Leica Zeiss-Leica) no laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente. A magnitude das ampliações e voltagem de aceleração utilizadas estão dispostas na legenda de cada micrografia apresentada (KARNOVSKY, 1965).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de actinobactérias e fungos de manguezais utilizados neste estudo como fontes de novos compostos bioativos foram previamente selecionados por apresentarem ação antifúngica em fitopatógenos em ensaios preliminares realizados na Embrapa/Jaguariúna. O critério de pré-seleção dos microrganismos foi adotado para se reduzir o número de amostras a serem testadas e também aumentar a probabilidade de amostras mais efetivas.

Neste estudo, além da ação antifúngica, alguns extratos também foram testados quanto à ação antimicobacteriana, leishmanicida e tripanossomicida.

5.1 TESTE DE ANTAGONISMO: PATÓGENOS X MICRORGANISMOS EM TESTE

O teste de antagonismo trata-se de um método de difusão em ágar e se baseia na determinação do tamanho do halo formado entre o microrganismo patógeno e a substância ou microrganismo em teste. A colônia do fungo patogênico pode ficar envolvida por uma zona clara (halo de inibição), indicando a inibição do seu crescimento por ação fungicida e/ou fungistática. Este ensaio é útil para se fazer uma triagem preliminar de substâncias ou microrganismos produtores de metabólitos secundários a serem estudados. O patógeno para o qual se pretende encontrar um antibiótico é confrontado com a substância ou microrganismo em estudo e aqueles que induzirem maior inibição de crescimento podem ser selecionados para a continuidade do estudo como a produção de metabólitos secundários.

Pelo teste de antagonismo, isolados de actinobactérias e de fungos de manguezais foram testados contra os fungos *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* e *T. rubrum*. Dentre as actinobactérias testadas, 8 isolados apresentaram halos de inibição variando de 2 a 5 mm (ACN 08, ACN 26, ACN 41, ANTII 15, ANTII 36, ANTII 53, ANTII 59, 0200R2) e 8 isolados induziram halos superiores a 5 mm (ACN 49, ANTII 27, ANTII 31, ANTII 33, ANTII 34, ANTII 40, ANTII 55, 0200R5). Para 14 isolados os halos foram inferiores a 2 mm (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antifúngica de actinobactérias versus *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* e *A. fumigatus* pelo ensaio de antagonismo.

Código	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>A. fumigatus</i>
ACN 06	+	+	+	-
ACN 08	+	-	++	-
ACN 14	-	-	+	-
ACN 18	-	-	+	-
ACN 19	-	+	-	+
ACN 11	-	-	+	+
ACN 26	-	+	++	-
ACN 41	-	-	++	-
ACN 44	-	-	+	-
ACN 49	-	-	+++	-
ANTII 01	-	-	+	-
ANTII 03	-	-	+	+
ANTII 09	-	-	+	-
ANTII 15	-	-	+	++
ANTII 27	-	-	+++	+
ANTII 31	-	+++	++	-
ANTII 32	-	+	+	-
ANTII 33	-	+++	++	+
ANTII 34	-	+++	++	++
ANTII 36	-	+	++	+
ANTII 37	-	+	+	+
ANTII 40	+	+++	++	++
ANTII 42	-	+	+	-
ANTII 50	-	-	+	+
ANTII 53	-	-	++	-
ANTII 55	+	-	+++	++
ANTII 59	-	+	++	++
0200R2	-	+	+	++
0200R4	-	-	+	-
0200R5	-	+	+++	+

(-) ausência de halos de inibição; (+) indução de halos inferiores a 2 mm;
(++) indução de halos de 2 a 5 mm; (+++) indução de halos superiores a 5 mm.

A Tabela 3 mostra que dentre os 32 isolados de actinobactérias testados, 30 apresentaram halos de inibição e dois (ACN 56, ACN 58) não foram efetivos sobre espécies dos fungos avaliados. *C. albicans* parece ser a espécie menos susceptível a ação das actinobactérias e somente quatro isolados (ACN 06, ACN 08, ANTII 40, ANTII 55) induziram halos inferiores a 2 mm. Para o *C. neoformans*, os isolados ANTII 31, ANTII 33, ANTII 34 e ANTII 40 foram os mais efetivos e induziram halos superiores a 5 mm. Em relação ao dermatófito *T. rubrum*, os isolados de actinobactérias ACN 49, ANTII 27, ANTII 55 e 0200R5 foram os mais efetivos e induziram halos superiores a 5 mm. Para o fungo filamentoso *A. fumigatus*, as actinobactérias em geral apresentaram baixa ação antifúngica, sendo que seis

(ANTII 15, ANTII 34, ANTII 40, ANTII 55, ANTII 59 e 0200R2) induziram halos de 2 a 5 mm e para 9 isolados os halos foram inferiores a 2 mm.

Dos 51 isolados de fungos de manguezais, 13 não foram efetivos sobre as espécies de fungos patogênicos e 30 apresentaram halos de inibição inferiores a 2 mm e os 8 isolados mais efetivos (A-1-10, MGE-182, MGE-196, MGE-201, MGE-202, R-2-3, R-2-5 e R-2-14) apresentaram halos de 2 a 5 mm (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade antifúngica de fungos de manguezais versus *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* e *A. fumigatus* pelo ensaio de antagonismo.

Código	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>A. fumigatus</i>
A-1-1	-	+	+	+
A-1-2	-	-	+	-
A-1-3	-	-	+	-
A-1-5	-	-	-	+
A-1-8	-	-	+	+
A-1-10	++	+	+	+
L-1-1	-	+	-	+
L-1-3	-	+	+	+
L-1-6	-	-	+	-
L-1-8	-	+	+	-
L-2-2	-	-	+	+
L-2-5	-	-	+	+
L-2-6	-	+	+	+
L-2-7	-	+	+	+
L-3-1	+	-	+	+
L-3-5	-	-	+	+
L-3-6	-	-	+	+
MGE-178	-	+	+	-
MGE-179	-	-	+	+
MGE-182	-	++	+	++
MGE-196	-	-	++	++
MGE-201	-	++	+	+
MGE-202	-	-	++	-
R-1-4	-	-	+	-
R-1-7	-	+	+	+
R-1-9	-	+	+	+
R-2-14	-	-	++	-
R-2-17	-	+	-	-
R-2-18	-	+	-	-
R-2-3	-	-	++	-
R-2-5	++	-	+	-
R-2-6	+	-	-	-
R-2-8	-	-	+	-
R-2-9	-	-	+	-
R-3-10	+	-	+	-
R-3-11	-	-	+	+
R-3-2	-	-	-	+
R-3-6	-	-	+	-

(-) ausência de halos de inibição; (+) indução de halos inferiores a 2 mm;
(++) indução de halos de 2 a 5 mm; (+++) indução de halos superiores a 5 mm.

Semelhante ao ocorrido para actinobactérias, *C. albicans* foi pouco susceptível à ação dos fungos de manguezais e somente dois isolados (A-1-10 e R-2-5) foram capazes de formar halos de 2 a 5 mm e inibir o crescimento da levedura. Os isolados L-3-1, R-2-6 e R-3-10 apresentaram halos inferiores a 2 mm.

No segundo ensaio de antagonismo para os fungos de manguezais, no qual se utilizou os discos de papel contendo os extratos obtidos em acetato de etila, os extratos dos isolados MGE-201 e MGE-202 foram os mais efetivos e induziram halos superiores a 5 mm para *A. fumigatus* e *T. rubrum*, respectivamente. Os extratos dos isolados A-1-8, L-2-2 e R-3-10 apresentaram halos de 2 mm para *T. rubrum*.

A Figura 3 ilustra o ensaio do antagonismo para o isolado de actinobactéria codificado como ANTII 55 *versus* *A. fumigatus* (Figura 3A) e *T. rubrum* (Figura 3B). Nas figuras 3A e 3B pode-se observar que houve a formação de um halo transparente ao redor do inóculo ANTII 55 indicando inibição do crescimento dos patógenos. A Figura 3C refere-se ao isolado ANTII 55 cultivado em meio de cultura BDA.

Figura 3 - Ilustração do teste de antagonismo do ANT II 55 em meio BDA *versus* A) *A. fumigatus* e B) *T. rubrum*. C) ANTII 55 cultivado em meio de cultura BDA.

A Figura 4 representa o ensaio de antagonismo para o isolado ANTII 59 frente ao *T. rubrum* (Figura 4A) e a figura 4B refere-se à cultura do isolado ANTII 59 cultivado em meio de cultura BDA.

Figura 4- Ilustração do teste de antagonismo do ANTII 59 em meio BDA *versus* A) *T. rubrum* e B) ANTII 59 cultivado em meio de cultura BDA.

Para os fungos MGE-182 e MGE-201 na observação dos halos de inibição foi constatada a presença de bordas delineadas e amarelas delimitando os espaços entre os patógenos *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* e *A. fumigatus*.

O ensaio de antagonismo é qualitativo e os resultados obtidos permitiram a seleção dos microrganismos testados (actinobactérias e fungos de manguezais) capazes de inibir o crescimento dos fungos patogênicos avaliados no estudo e aqueles efetivos foram selecionados para a produção de extratos orgânicos a serem empregados nos ensaios quantitativos.

5.2 EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS A PARTIR DA CULTURA DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos que demonstraram melhores ações antifúngicas nos ensaios de antagonismo (halos ≥ 2 mm) foram selecionados para cultura em laboratório e produção de metabólitos secundários. Estes microrganismos estão listados na Tabela 5, sendo 14 isolados de actinobactérias e 9 de fungos de manguezais, perfazendo um total de 23. Estes isolados foram cultivados em meio BD por 7 dias a 28-30 °C e 180 rpm, e posteriormente, a suspensão da cultura foi processada para obtenção dos extratos orgânicos como descrito na parte experimental.

O período de 7 dias é suficiente para a produção de metabólitos secundários e foi selecionado de acordo como descrito na literatura (TIAN et al., 2004). Para confirmar esse dado, inicialmente, cultivamos o isolado de actinobactéria ACN 08 durante 4, 7 e 10 dias e após o processo de extração com diclorometano, observamos que em 7 dias a produção de extrato bruto apresentava melhor rendimento e este período foi adotado para a cultura de todos os microrganismos testes empregados nesse estudo.

A Tabela 5 apresenta a massa dos extratos orgânicos obtidos a partir dos sobrenadantes das culturas em 150 mL de meio BD e extração com diclorometano, acetato de etila e hexano. A massa obtida é resultante da combinação dos extratos conforme explicado no item 4.4. Os isolados de ACN 41, ANTII 34, ANTII 40 e MGE-196, produziram menor quantidade de extrato bruto e os isolados ACN 08, ANTII 15 e 0200R2 produziram extratos com maior rendimento.

Tabela 5- Microrganismos selecionados para cultura e produção de extratos orgânicos em 150 mL de meio de cultura BD.

	Microrganismos	Massa do extrato orgânico (mg)
Actinobactérias	ACN 08	100
	ACN 41	1,5
	ACN 49	18,1
	ANTII 15	116,1
	ANTII 27	144
	ANTII 31	37,2
	ANTII 33	58
	ANTII 34	1,4
	ANTII 36	23,8
	ANTII 40	1,3
	ANTII 55	3,9
	ANTII 59	13,3
	0200R2	170,1
	0200R5	13,3
Fungos de manguezais	A-1-8	12,3
	L-2-2	15,2
	MGE-182	12,6
	MGE-196	4
	MGE-201	23,1
	MGE-202	9,5
	R-2-3	13,5
	R-2-14	20,9
	R-3-10	37,7

5.3 AÇÃO ANTIFÚNGICA

5.3.1 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas

Um dos métodos quantitativos para se avaliar a atividade antimicrobiana de um composto pode ser a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é aquela capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Esse método permite avaliar a atividade de amostras de diferentes origens (compostos sintéticos, extratos obtidos de plantas e/ou microrganismos) frente a diversos patógenos e foi empregada em nosso estudo nos testes de ação antifúngica e antimicobacteriana.

Os 23 extratos orgânicos produzidos pelos microrganismos listados na Tabela 5 (ACN 08, ACN 41, ACN 49, ANTII 15, ANTII 27, ANTII 31, ANTII 33, ANTII 34, ANTII 36, ANTII 40, ANT II 55, ANTII 59, 0200R2, 0200R5, A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-196, MGE-201, MGE-202, R-2-3, R-2-14 e R-3-10) foram avaliados quanto a ação antifúngica pelo ensaio de determinação da CIM em microplaca (Tabela 6).

Tabela 6 - Ação antifúngica sobre *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* e *A. fumigatus*. CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para extratos orgânicos produzidos por fungos de manguezais.

	Extratos	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>A. fumigatus</i>
Actinobactérias	ACN 08	1.000	1.000	500	1.000
	ACN 41	500	500	500	1.000
	ACN 49	500	1.000	1.000	1.000
	ANTII 15	1.000	1.000	1.000	1.000
	ANTII 27	1.000	1.000	1.000	1.000
	ANTII 31	1.000	500	1.000	1.000
	ANTII 33	1.000	1.000	1.000	1.000
	ANTII 34	1.000	1.000	1.000	1.000
	ANTII 36	1.000	1.000	1.000	1.000
	ANTII 40	1.000	ND	ND	1.000
	ANTII 55	500	500	1.000	1.000
	ANTII 59	ND	1.000	ND	1.000
	0200R2	1.000	1.000	500	1.000
	0200R5	1.000	1.000	1.000	1.000
Fungos de manguezais	A-1-8	250	400	800	1.000
	L-2-2	125	500	1.000	1.000
	MGE-182	350	800	500	1.000
	MGE-196	500	1.000	ND	1.000
	MGE-201	800	750	250	1.000
	MGE-202	250	500	250	800
	R-2-3	1.000	1.000	750	1.000
	R-2-14	1.000	1.000	750	ND
	R-3-10	1.000	1.000	1.000	1.000
	AMB	0,125	0,125	0,125	0,250

ND = Não determinado, AMB = Anfotericina B

Entre os extratos mais efetivos destacam cinco, aqueles que apresentaram CIMs ≤ 350 $\mu\text{g/mL}$ sobre *C. albicans* foram A-1-8, L-2-2, MGE-182 e MGE-202. Sobre o *C. neoformans*, o extrato A-1-8 apresentou CIM de 400 $\mu\text{g/mL}$. Para o dermatófito *T. rubrum* os extratos MGE-201 e MGE-202 apresentaram CIMs iguais a 250 $\mu\text{g/mL}$. *A. fumigatus* foi a espécie menos susceptível aos extratos testados, sendo que para apenas um extrato (MGE-202) o valor da CIM foi inferior a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6).

Os resultados indicam que *C. albicans* foi a espécie mais susceptível e *A. fumigatus* a mais resistente a ação dos extratos produzidos por actinobactérias e fungos de manguezais. Para os demais extratos, a ação antifúngica sobre os patógenos não foi efetiva e os valores de CIMs foram próximos a 1.000 $\mu\text{g/mL}$. A Anfotericina B (AMB) foi usada como controle e teve valores de CIMs de acordo com o esperado e em torno de 0,125 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.2 Determinação das Concentrações fungicidas

As concentrações fungicidas (CF_s) foram determinadas para os extratos que apresentaram CIMs ≤ 400 $\mu\text{g/mL}$ e portanto apenas para 5 extratos obtidos de 5 isolados de fungos de manguezais (A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202) conforme demonstrado na Tabela 6. A Tabela 7 mostra que os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182 e MGE-202 apresentaram $\text{CF}_s \leq 500$ $\mu\text{g/mL}$ sobre *C. albicans*, enquanto que para as amostras testadas sobre *T. rubrum* as CFs foram de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 7).

Tabela 7 – Ação fungicida sobre *C. albicans* e *T. rubrum*. CIM_s e CF_s ($\mu\text{g/mL}$) para extratos orgânicos produzidos por fungos de manguezais.

Extratos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CF ($\mu\text{g/mL}$)	Patógeno
A-1-8	250	500 $\mu\text{g/ mL}$	<i>C. albicans</i>
A-1-8	400	ND	<i>C. neoformans</i>
L-2-2	125	250 $\mu\text{g/ mL}$	<i>C. albicans</i>
MGE-182	350	500 $\mu\text{g/ mL}$	<i>C. albicans</i>
MGE-201	250	1000 $\mu\text{g/ ML}$	<i>T. rubrum</i>
MGE-202	250	250 $\mu\text{g/ mL}$	<i>C. albicans</i>
MGE-202	250	1000 $\mu\text{g/ ML}$	<i>T. rubrum</i>

ND = Não determinado, CIM= Concentração Inibitória Mínima; CF = Concentração Fungicida

5.4 AÇÃO ANTIMICOBACTERIANA, LEISHMANICIDA E TRIPANOSSOMICIDA

Para os ensaios em *M. tuberculosis* H37RV, *T. cruzi* e *L. amazonensis* somente foram testados os extratos que apresentaram prévia ação antifúngica. Embora o mecanismo de ação de antimicrobianos sobre os diferentes patógenos deste estudo não seja necessariamente o mesmo, esse critério de seleção dos extratos foi adotado para se reduzir o número de amostras a serem testadas.

Sabe-se que a biossíntese de ergosterol está presente no metabolismo de fungos, protozoários e micobactérias (COLE et al., 1998) e representa um interessante alvo para a descoberta de novas drogas. A literatura descreve diversos compostos efetivos *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*, *Leishmania*, *M. tuberculosis* e *T. rubrum* (URBINA et al., 1997; DE SOUZA et al., 2001, 2002, 2004) e dessa forma, alguns extratos foram avaliados frente a esses diferentes patógenos.

5.4.1 Ação antimicobacteriana

Determinação de Concentrações Inibitórias Mínimas

Os extratos orgânicos que apresentaram atividade antifúngica pelo menos sobre uma espécie de fungo patogênico foram também avaliados quanto à ação antimicobacteriana sobre o *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Os extratos ACN 08, ACN 26, ACN 41, ACN 49, ANTII 15, ANTII 27, ANTII 31, ANTII 33, ANTII 34, ANTII 36, ANTII 40, 0200R2, 0200R5, A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-196, MGE-201, MGE-202, R-2-3, R-2-14 e R-3-10 foram selecionados considerando os resultados obtidos pelos ensaios de antagonismo.

A Tabela 8 mostra que apenas o extrato ANTII 40 foi efetivo sobre a micobactéria e apresentou CIM igual a 125 µg/mL. Para os demais extratos, os valores de CIM_s foram superiores a maior concentração testada de 250 ou 500 µg/mL.

Tabela 8 - Ação antimicobacteriana sobre *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Valores de CIMs ($\mu\text{g/mL}$) para extratos orgânicos produzidos por actinobactérias e fungos de manguezais.

Extratos		CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Actinobactérias	ACN 8	>500
	ACN 26	>500
	ACN 41	> 250
	ACN 49,	> 250
	ANTI 34	>500
	ANTII 15	>500
	ANTII 27	> 250
	ANTII 31	> 250
	ANTII 33	>500
	ANTII 36	>500
	ANTII 40	125
	0200R2	>500
	0200R5	> 250
Fungos de manguezais	A-1-8	> 250
	L-2-2	> 250
	MGE182	> 250
	MGE196	> 250
	MGE201	> 250
	MGE202	> 250
	R-2-14	> 250
	R-2-3	> 250
	R-3-10	> 250
	Rifampicina	0,048

5.4.2 Atividade Leishmanicida

Os extratos A-1-8, ACN 49, L-2-2, MGE-182, MGE-201, MGE-202 e R-2-3 apresentaram ação antifúngica e foram também avaliados quanto à ação leishmanicida sobre a forma promastigota de *L. Amazonensis* (MHOM/ BR/ 77/ LTB0016). Esses extratos não foram capazes de inibir o crescimento dos parasitas que continuaram viáveis até a mais alta concentração testadas de 1.000 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.3 Ação tripanossomicida

Os extratos A-1-8, ACN 49, L-2-2, MGE-182, MGE-201, MGE-202 e R-2-3 também foram testados sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Os extratos ACN 49, A-1-8, L-2-2, MGE-202 e R-2-3 não foram efetivos e para a lise de 50% dos parasitas (IC_{50}) foram necessárias concentrações superiores a 455,6 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 9). Os extratos MGE-182 e MGE-201 apresentaram expressiva ação tripanossomicida e nas concentrações de 6,8 e 3,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, lisaram 50% das células (IC_{50}) (Figura 5). Estes resultados foram muito próximos ao obtido pelo Benznidazol que foi a droga usada como controle.

Tabela 9 - Ação tripanossomicida sobre a forma tripomastigota de *T. Cruzii*. Valores de IC_{50} / 24 horas ($\mu\text{g/mL}$) para extratos orgânicos produzidos por actinobactérias e fungos de manguezais.

Extratos orgânicos		IC_{50} / 24 horas ($\mu\text{g/mL}$)
Actinobactérias	ACN 49	$1.786,9 \pm 438,5$
	A-1-8	$455,6 \pm 26,6$
	L-2-2	$1.556,3 \pm 124,1$
	MGE-182	$6,8 \pm 0,4$
Fungos de manguezais	MGE-201	$3,2 \pm 0,5$
	MGE-202	$1.488,1 \pm 191,5$
	R-2-3	> 2.000
Benznidazol		$2,06 \pm 1,12$

Figura 5- Ação tripanossomicida dos extratos MGE-182 e MGE-201 sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*, após tratamento por 24 horas à 37 °C.

5.5 CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade permitem avaliar a toxicidade de amostras (candidatas a fármacos) em cultura de células utilizando-se como parâmetro a viabilidade celular, que pode ser mensurada usando três diferentes ensaios: incorporação do corante vermelho neutro (VN), redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico (MTT) e quantificação do conteúdo de ácidos nucléicos.

A avaliação da citotoxicidade foi efetuada para os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 que apresentaram ação antifúngica com CIMs $\leq$ a 400 $\mu\text{g/mL}$ e foi realizada utilizando-se macrófagos J774. Com esse estudo foi possível verificar os efeitos tóxicos específicos em diferentes organelas ou funções celulares, utilizando-se as três técnicas acima mencionadas (Figuras 6 e 7).

O princípio do ensaio de redução do MTT consiste na absorção do sal de tetrazólio MTT pelas células e redução no interior da mitocôndria através da ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. O produto formado chamado Formazan se acumula dentro da célula em quantidade proporcional ao número de células viáveis e pode ser quantificado através da solubilização com solução alcoólica (MOSMANN, 1983; DENIZOT e LANG, 1986).

O corante VN é solúvel em água e pode ser incorporado através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomas, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do VN, dessa forma este ensaio consiste em avaliar a função dos lisossomas (RIDDELL et al., 1986).

Para a determinação do conteúdo total de DNA foi avaliada a capacidade proliferativa das células.

Pelo emprego do ensaio de VN e conteúdo de DNA para todos os extratos testados, pode-se observar que o aumento da concentração dos extratos causou uma pequena diminuição na captação do corante VN e no conteúdo de DNA. Porém não foi possível calcular o valor de IC_{50} para nenhum dos extratos testados, porque o valor de IC_{50} seria maior do que a maior concentração testada.

Figura 6 - Avaliação da citotoxicidade através da redução do sal tretazólio (MTT), incorporação do vermelho neutro (VN) e determinação do conteúdo de DNA em macrófagos J774 expostos aos extratos orgânicos de A) A-1-8 e B) L-2-2. O resultado expressa a média $\pm$ erro padrão para três ensaios independentes.

Figura 7- Avaliação da citotoxicidade através da redução do sal tretazólio (MTT), incorporação do vermelho neutro (VN) e determinação do conteúdo de DNA em macrófagos J774 expostos aos extratos orgânicos de A) MGE-201, B) MGE-182 e C) MGE-202. O resultado expressa a média $\pm$ erro padrão para três ensaios independentes.

Pode-se observar pelo ensaio do MTT que os extratos foram tóxicos para as células. Os valores de IC_{50} foram obtidos por interpolação dos dados da curva e a citotoxicidade pode ser classificada da seguinte forma: MGE-201 > MGE-182 > L-2-2 > MGE-202 > A-1-8 (Tabela 10). O extrato A-1-8 foi menos citotóxico e o seu valor de IC_{50} embora não definido, por extrapolação dos dados da curva deve ser superior a 600 $\mu\text{g/mL}$. Para os 5 extratos mais efetivos sobre alguma espécie de fungo patogênico foi calculado o índice de seletividade (IS) ($IS=IC_{50}/CIM$), considerando o valor de IC_{50} e da CIM e os dados estão expressos na tabela 10.

Tabela 10 - Citotoxicidade dos extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 em cultura de macrófagos J774 (IC_{50}) e valores do índice de seletividade (IS).

Extratos	IC_{50} MTT*	<i>T. rubrum</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. neoformans</i>	
		CIM	IS	CIM	IS	CIM	IS
A-1-8	> 600	> 400	$\leq 1,5$	250	>2,4	400	> 1,5
L-2-2	137	> 400	$\leq 0,34$	125	1,0	1000	0,137
MGE-182	85,3	> 400	$\leq 0,2$	350	0,24	1000	0,085
MGE-201	25	250	0,1	>400	$\leq 0,06$	1000	0,025
MGE-202	176	250	0,7	250	0,7	1000	0,176

* IC_{50} calculado pelo ensaio do MTT; CIM= Concentração Inibitória Mínima; IS= índice de seletividade ($IS=IC_{50}/CIM$).

O IS indica a especificidade de determinada droga pelo seu alvo ou pelas células do hospedeiro mamífero e os seus valores para os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 foram relativamente baixos com relação à ação antifúngica e indicam baixa seletividade pelo patógeno. Para uma droga ser considerada como potencial candidato a fármaco, o seu IS deve ser superior a 10 e este índice é aplicado como critério de seleção ou exclusão de determinada droga na continuidade dos ensaios em triagens de droga (DE SOUZA et al., 2004). Nesse estudo, para os extratos com melhor ação antifúngica e, portanto, selecionados para a continuidade dos ensaios, este critério não foi usado porque os resultados referem-se a extratos brutos. Após o processo de purificação dos extratos por cromatografia líquida e isolamento da molécula efetiva, a ação citotóxica pode ser reduzida e neste caso pode-se obter maior seletividade da droga pelo patógeno.

5.6 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) - FRACIONAMENTO

Os extratos com melhor ação antifúngica foram selecionados para continuidade dos ensaios e foram submetidos à purificação por cromatografia líquida para isolamento da fração ou molécula efetiva. O perfil cromatográfico das amostras A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 pode ser visualizado na Figura 8. O extrato A-1-8 apresentou picos entre 15 e 22 minutos de retenção. Os extratos L-2-2, MGE-182 e MGE-201 apresentaram um pico elevado na região próxima a 26 minutos de retenção. Os extratos L-2-2 e MGE-202 têm picos em comum entre 22 e 23 minutos de retenção.

Figura 8 - Perfil cromatográfico dos extratos orgânicos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 submetidos à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência.

No processo de purificação e tentativa de isolamento do possível princípio ativo, os extratos foram fracionados de acordo com os picos apresentados. Para os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 foram coletados exatamente 10, 9, 8, 10 e 8 frações, respectivamente para cada extrato. As frações foram classificadas como A-1-8-F1 a A-1-8-F-10; L-2-2-F1 a L-2-2-F9; MGE-182-F1 a MGE-182-F8; MGE-201-F1 a MGE-201-F10 e MGE-202-F1 a MGE-202-F8. Após secagem por liofilização, as frações coletadas foram ressuspensas em solução salina e testadas através do ensaio de antagonismo para detecção daquelas bioativas. As frações foram testadas sobre *T. rubrum*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* e *C. albicans* e aquelas que apresentaram atividade antifúngica estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Atividade antifúngica das frações obtidas dos extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202. Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência e ação antifúngica por ensaio de antagonismo.

Frações	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>A. fumigatus</i>
A-1-8-F1	-	-	+	+
A-1-8-F3	+	-	-	-
A-1-8-F6	-	+	-	-
L-2-2-F1	+	+	+	-
L-2-2-F2	-	+	-	-
L-2-2-F5	-	+	-	-
MGE-182-F1	-	+	+	-
MGE-182-F2	-	+	-	-
MGE-182-F4	+	-	-	-
MGE-182-F8	-	+	-	-

(-) ausência de halos de inibição; (+) presença de halos de inibição

A Figura 9 ilustra os halos produzidos pela Fração A-1-8-F1 frente ao *A. fumigatus* e pela fração L-2-2-F1 frente ao *T. rubrum*.

Figura 9 – Ilustração do Teste de antagonismo para as frações A) A-1-8-F1 e B) L-2-2-F1 versus *A. fumigatus* e *T. rubrum*. C) *A. fumigatus* e *T. rubrum* cultivados em meio BDA.

5.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FRAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

Os extratos brutos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 foram submetidos à análise por espectrometria de massas (EM) e os dados estão

representados nas Figuras 10, 11, 12, 13 e 14. Os extratos brutos deram origem a poucos íons e a relação massa carga (m/z) destes estão abaixo de 1097,7 indicando que os extratos são constituídos por moléculas pequenas e de baixa massa molecular.

Os dados dessa análise ainda não são conclusivos, mas, pode-se observar que os extratos A-1-8 e L-2-2 apresentam semelhanças na constituição e picos com relação m/z de 637,5. O mesmo ocorre para os extratos MGE-182 e MGE-201 com picos de relação m/z de 552,5.

As frações A-1-8-F1, A-1-8-F3, A-1-8-F6, L-2-2-F1, L-2-2-F2, L-2-2-F5, MGE-182-F1, MGE-182-F2, MGE-182-F4 e MGE-182-F8 obtidas por purificação em CLAE e efetivas sobre os fungos patogênicos estão sendo também analisadas por EM e serão posteriormente submetidas a análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e se necessário em seguida serão re-purificadas quantas vezes necessário até que a molécula efetiva seja obtida na forma totalmente pura.

Figura 10 - Espectrometria de massas para o extrato A-1-8

EM (ES 70 eV)

A-1-8 (m/z): 761,6 (M^+); 659,5; 637,5; 574,5; 552,5; 469,6; 441,5; 381,4; 365,5; 319,5; 307,5; 273,4; 232,5.

Figura 11 - Espectrometria de massas para o extrato L-2-2

EM (70 eV)

L-2-2 (m/z): 675,5 (M^+); 659,5; 638,8; 637,8; 637,5; 574,4; 551,7; 381,3; 365,3; 316,6; 307,5; 273,4; 232,4.

Figura 12 - Espectrometria de massas do extrato MGE-182

EM (70 eV)

MGE-182 (m/z): 1081,7 (M^+); 850,6; 836,7; 834,6; 683,7; 639,6; 595,6; 554,5; 553,5; 552,5; 530,4; 507,6; 463,6; 419,5; 375,6; 321,5; 307,5; 305,4; 267,4; 249,5.

Figura 13 - Espectrometria de massas para o extrato MGE-201

EM (ES 70 eV)

MGE-201 (m/z): 1097,7 (M^{+}); 1082,7; 1081,7; 1059,7; 850,6; 836,7; 834,7; 761,5; 734,5; 683,6; 639,6; 593,5; 568,4; 553,5; 552,5; 530,5; 507,6; 463,5; 419,6; 321,4; 307,5; 305,4; 265,5; 246,5.

Figura 14 - Espectrometria de massas para o extrato MGE-202

EM (ES 70 eV)

MGE-202 (m/z): 989,6 (M^{+}); 903,6; 875,5; 832,5; 831,5; 787,5; 743,4; 727,5; 699,5; 683,5; 639,4; 595,4; 551,4; 507,4; 463,3; 462,2; 419,3; 379,2; 360,2; 311,2; 301,2; 259,1; 232,1; 181,1; 179,0; 150,1

5.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS MICRORGANISMOS - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Nos ensaios de avaliação da ação antifúngica, antimicobacteriana, tripanossomicida e leishmanicida, os extratos orgânicos codificados como A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 foram os mais efetivos para a inibição do crescimento dos fungos patogênicos e conseqüentemente os microrganismos produtores desses extratos foram selecionados para caracterização taxonômica.

Os microrganismos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 são fungos isolados de manguezais e foram identificados morfológicamente com relação aos gêneros através da microscopia eletrônica de varredura conforme as características descritas na literatura (SCHROERS, 2001, SAMSON, 2007; SAMSON e ROBERT, 2007).

O A-1-8 foi identificado como pertencente ao gênero *Penicillium spp.* (Figura 16), o L-2-2 pertencente ao gênero *Clonostachys spp.* (Figura 17), o MGE-182 e MGE-201 como pertencentes ao gênero *Aspergillus spp.* (Figuras 18 e 19).

As estruturas observadas nas Figuras 16, 17, 18 e 19 são hifas ramificadas, septadas lisas ou rugosas. Conidióforo com hastes simples, saindo de uma célula-base, com extremidade globosa ou clavada (vesícula) também podem ser detectados. Nas extremidades estão presentes cadeias de esporos: conídios ou filósporos, globosos lisos ou rugosos.

A identificação do microrganismo MGE-202 com relação ao gênero não pode ser concluída somente com a análise das microscopias obtidas por MEV e outras análises serão necessárias

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como A-1-8 e caracterizado como pertencente ao gênero *Penicillium* spp. Ampliações de A) 1.750x e de B) 2.000x.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como L-2-2 e caracterizado como pertencente ao gênero *Clonostachys* spp. Ampliações de A) 1.150x e de B) 2.000x.

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como MGE-182 e caracterizado como pertencente ao gênero *Aspergillus* spp. Ampliações de A) 100x e de B) 400x.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura para o isolado de fungo de manguezal codificado como MGE-201 e caracterizado como pertencente ao gênero *Aspergillus* spp. Ampliações de A) 50x e de B) 1.000x.

6 CONCLUSÕES

1. Dentre os 83 microrganismos isolados de solos agrícolas ou de manguezais, 32 actinobactérias e 51 fungos de manguezais foram avaliados quanto à ação antifúngica pelo ensaio de antagonismo. Destes, 14 actinobactérias e 9 fungos de manguezais apresentaram ação antagônica e foram selecionados para a produção dos extratos orgânicos.
2. Dos 23 extratos orgânicos testados, cinco (A-1-8; L-2-2; MGE-182, MGE-201 e MGE-202) apresentaram $CIM_s \leq$ a 400 $\mu\text{g/mL}$ sobre *C. albicans*, *C. neoformans* e *T. rubrum* e foram submetidos a purificação/fracionamento por CLAE.
3. Dentre as frações obtidas, A-1-8-F1 e L-2-2-F1 foram as mais efetivas sobre *T. rubrum* e *A. fumigatus*, respectivamente.
4. Os microrganismos produtores dos extratos A-1-8; L-2-2; MGE-182 e MGE-201 pertencem aos gêneros *Penicillium spp.*; *Clonostachys spp.*; *Aspergillus spp.* e *Aspergillus spp.*, respectivamente.
5. Os extratos testados não foram efetivos sobre o *M. tuberculosis* H37Hv e sobre a forma promastigota de *L. amazonensis*.
6. Os extratos MGE-182 e MGE-201 apresentaram expressiva ação tripanossomicida com valores de IC_{50} de $6,8 \pm 0,4$ e $3,2 \pm 0,5$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.
7. Os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 apresentaram baixa citotoxicidade em macrófagos J774 pelos ensaios de VN e DNA. Entretanto, pelo ensaio de MTT, com exceção do extrato A-1-8, os outros foram citotóxicos com valores de IC_{50} de 137; 85,3; 25 e 176 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.
8. Os valores dos índices de seletividade (IS) para os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 indicam baixa especificidade dos extratos pelos patógenos.
9. A análise do conjunto de dados da ação antifúngica e tripanossomicida de todos os extratos testados indica que os extratos A-1-8, L-2-2, MGE-182, MGE-201 e MGE-202 são promissores fontes de substâncias com ação antimicrobiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALONGI, D.M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. J. Exp. Mar. Bio. Ecol., v. 171, p. 201–23, 1993.

ANDRADE, A.L., et al. Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet, n. 348, p. 1407-13, 1996.

ARENAS, F.; RUIZ-ESMENJAUD, J. Onychomycosis in childhood: a current perspective with emphasis on the review of treatment. An. Bras. Dermatol., v. 79, n. 2, p. 225-32, 2004.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. Jaguariúna-SP: Embrapa, 1998, p.117-37.

BALKIS, M.M., et al. Mechanisms of fungal resistance: an overview. Drugs, v. 62, p. 1025-40, 2002.

BONONI, V.L.R.; GRANDI, R.A.P. Zigomicetos, basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, 1999, 184 p.

BORENFREUND E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol. Lett., n. 24. p. 119-24, 1985.

BRADSHAW RW JR. Pulmonary blastomycosis. Semin Respir Crit Care Med., v. 29, n. 2, p 174-81. 2008.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. Rev. Inst. Med. Trop. v. 44, n.1, p. 29-37, 2002.

CANHOS, V.P. et al. Diversidade do Domínio Bacteria. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C.E.M. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 1ed. São Paulo: FAPESP, 1000, v.1, p.1-14.

CANHOS, V.P.; SOUZA, S; CANHOS, D.A.L. Catálogo nacional de linhagens. 3 ed. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Toselo, 1989, v.1, 217p.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. "Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.1, p. 159-218, 1909.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CINGI, M.R. et al. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicity: a multicentre approach. Toxicol. In Vitro, v. 5, p. 119-125, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Norma M 38-A. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: Norma aprovada. 2.ed. Pennsylvania/Estados Unidos : Edição Wayne, 2002a, v. 22, n.16, 57 p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica: Norma aprovada. 2.ed. Pennsylvania/Estados Unidos : Edição Wayne, 2002b, v. 22, n. 15, 55 p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Norma M27-A2. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão; norma aprovada. 8.ed. Pennsylvania/Estados Unidos : Edição Wayne, 2003, v. 23, n.8, 58 p.

COLE, S.T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature, v. 393, p. 537-44, 1998.

COLLINS, L.A.; FRANZBLAU, S.G. Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob. Agents Chemother., v.41, n. 5, p.1004-1009. 1997.

COLOMBO, A.L. et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. J. Clin. Microbiol., v. 44, n.8, p. 2816-23. 2006.

DE CASTRO, S.L. et al. Differential effect of amphotericin B on the three evolutive stages of *Trypanosoma cruzi* and on the host cell-parasite interaction. Brazilian J. Med. Biol. Res., v. 26, p. 1219- 29, 1993.

DE CASTRO, S.L.; MEIRELLES, M.N.L.; OLIVEIRA, M.M. *Trypanosoma cruzi*: adrenergic modulation of cAMP role in proliferation and differentiation of amastigotes *in vitro*. Exp. Parasitol., v. 64, p. 368-75, 1987.

DE CASTRO, S.L.; PINTO, M.C.F.R.; PINTO, A.V. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. I. Establishing a structure/activity relationship. Microbiol., v. 78, p. 83-90. 1994.

DE LA TORRE, P.; REBOLI, A.C. Anidulafungina: a new echinocandin for candidal infections. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther., n. 5, p. 45 – 52, 2007.

DE SOUZA, A.O. et al. 2-propen-1-amine derivatives and their synthetic intermediates: activity against pathogenic trypanosomatids. J. Chemother., v.16, n. 6, p. 530-3, 2004.

DE SOUZA, A.O. et al. Antimycobacterial activity of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-x-phenylmethanone derivatives, and their acute toxicity and cytotoxicity. Pharmazie, v.56, n. 11, p. 871-4, 2001.

DE SOUZA, A.O. et al. Cytotoxicity, antitumoral and antimycobacterial activity of tetrazole and oxadiazole derivatives. Pharmazie, v.60, n.5, p.396-7, 2005.

DE SOUZA, A.O. et al. 3-[4'-bromo-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-N, N-dimethyl-3-(2-thienyl)-2-propen-1-amine: synthesis, cytotoxicity, and leishmanicidal, trypanocidal and antimycobacterial activities. J. Antimicrob. Chemother., v.50, n.5, p. 629-37, 2002.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol Methods, v. 89, n. 2, p. 271-77, 1986.

DIDUKH, M.Y.; WASSER, S.P.; NEVO, E. Medicinal value of species of the family agaricaceae cohn (higher basidiomycetes and future perspectives. Int. J. Med. Mushrooms, n.5, p.133-52. 2003.

DOVER, L.G. et al. New drugs and vaccines for drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Expert Rev. Vaccines, v.7, n.4, p. 481-97. 2008.

FEBRÉ N., et al. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care units patients undergoing urinary catheterization. J. Clin. Microbiol., n. 37, p. 1584-6, 1999.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals Past, Present, and Future. Oceanography, v. 19, n. 2, 2006.

FLEMING R, WALSH T, Anaissie E. Emerging and less common fungal pathogens. Infect. Dis. Clin. North Am., v. 16, p. 915–933, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The world's mangroves. Rome: FAO Forestry, 2007. cap.8, 153 p.

FRENCH, C.E. et al. The association between HIV and anti-tuberculosis drug resistance in England and Wales. Eur. Respir. J., v.30. p. 2008.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. (Censo Demográfico, 17).

GARCIA, E.S. Biodiversity, Biotechnology and Health. Cad. Saude Publ., Rio de Janeiro, v.11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GAVA, C.A.T., et al. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. Pesq. Agrop. Bras., v. 37, n. 10, p. 1373-80, 2002.

GEORGOPAPADAKOU, N.H.; WALSH, T.J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. Antimicrob. Agents Chemother., v. 40, p. 279–91, 1996.

GOMES, A.M.A. et al. Isolamento de bactérias para teste de antagonismo. In: MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. Manual de práticas em fitobacteriologia. Recife, 2005. p.119-125.

GOMPERTZ, O.F et al. Micologia Especial e Clínica - Micoses Superficiais. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004a. p. 473-475.

GOMPERTZ, O.F. et al. Micologia Especial e Clínica - Micoses Cutâneas. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004b. p. 477-480.

GOMPERTZ, O.F. et al. Micologia Especial e Clínica - Micoses Subcutâneas. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004c. p. 481-486.

GRIMALDI, JR. G.; DAVID, J.R.; MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 36, p. 270-87, 1987.

GUERRA, J.A. et al. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. Cad. Saude Publica, v. 22, n. 11, p. 2319-27, 2006.

GUNATILAKA, A.A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. J. Nat. Prod., v. 69, p. 509-26, 2006.

GUPTA, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B.N. Antifungal antibiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 58, p. 46–57, 2002.

HAGE, C.A. Pulmonary histoplasmosis. Semin. Respir. Crit. Care Med., v.29, n. 2, p 151-65, 2008.

HAJJEH, A.R. et al. Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. J. Clin. Microbiol., v. 42, n. 4, p. 1519-27, 2004.

HELANDER, M.L.; RÄTÖ-LEHTIMÄKI. Effects of watering and simulated acid rain on quality of phyllosphere fungi of Birch leaves. Microbial. Ecology, v. 19, p. 119-125, 1990.

HOLGUIN, G. et al. La Microbiología de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. Cienc. Desarrollo, n. 25, n.144, p. 26–35, 1999.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. Biol. Fertil. Soils, v. 33, p. 265–78, 2001.

ISMET, A.; VIKINESWARY, S.; PARAMASWARI S, S. Production and chemical characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. World. J. Microbiol. Biot., v. 20, p. 523–28, 2004.

JARVIS, J.N.; HARRISON, T.S. Pulmonary cryptococcosis. Semin. Respir. Crit. Care. Med., v. 29, ed. 2, p.141-50, 2008.

JIN, L.H.; LIN, Y.C.; YAO, J.H. Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus No. 2524. J. Asian. Nat. Prod., p. 185–91, 2004.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in eletron microscopy. J. Cel. Biol., v. 27, p.137-8, 1965.

KAUFFMAN, C.A.; CARVER, P.L. Update on echinocandin antifungals. Semin. Respir. Crit. Care Med., v.29. ed 2. p.211-9, 2008.

KUO, Y.C. et al. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. J. Lab. Clin. Med., v. 140, n. 3, p. 176-87, 2002.

LANA, M. ; TAFURI, W.L. .Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. In: DAVID PEREIRA NEVES. Parasitologia Humana. 11. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Ann. Rev. Microbiol., v.60, p. 69-105, 2006.

LIN, X; HUANG A, Y; FANG A, M. et al. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. FEMS Microbiol. Lett., n. 251. p. 53–58, 2005.

LIN, Y.; WU, X.; DENG, Z. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from a salt lake in the Bahamas. Phytochemistry, v. 59, p.469–71. 2002.

LINDENBERG, A. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 50, n. 2, p.75-78, 2008.

MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; DE CASTRO, S.L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 102, n. 1, Rio de Janeiro, 2007.

MANDIGAN M.T; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia. 10 ed. São Paulo: Pearson Education, 2004. 608 p.

MARIUSHI, W.M. et al. Chronic *Aspergillus* sp. meningitis successfully treated with fluconazole. Case Report. Arg. Neuropsiquiatr., v. 57, p. 288-91, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.J. Immunol. Methods, v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 93, n. 7, 2764-69, 1996.

NASTI, T.H.; KHAN, M.A.; OWAIS, M. Enhanced efficacy of pH-sensitive nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in murine model. J. Antimicrob. Chemother., v. 57, n. 2, p. 349-52, 2006.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod., v. 66, p. 1022-37, 2003.

NI, T; JIA-HUI, P.; PENG, G.T. et al. A Copper Coordination Compound Produced by a Marine Fungus *Fusarium sp.* ZZF51 with Biosorption of Cu(II) Ions. Chinese J. Chem., v. 26, p. 516-521, 2008.

NOVAES, M.R.G., et al. Effects of administration of *Agaricus sylvaticus* fungi on hematological and immunological systems of rats with walker-256 carcinoma. Fundam. Clin. Pharmacol., v. 18, Suppl. 1, p. 125-29, 2004.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends. Microbiol., v.11, p. 272-79, 2003.

OLIVEIRA, R.D.R; MAFFEI, C.M.L., MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. Rev. Assoc. Med. Bras., v.47, n.3, p. 231-35, 2001.

PALOMINO, J.C. et al . Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents. Chemother., v. 46, n. 8, p. 2720-22, 2002.

PANDEY, R.C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. Med. Res. Ver., v.18, n. 5, p. 333-46. 1998.

PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C. P.; DROZDOWICZ, A. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium spp.*, na nodulação da soja. Pesq. Agrop. Bras., v. 34, n. 1, p. 99-108, 1999b.

PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. Pesq. Agrop. Bras., v. 34, n. 5, p. 801-11, 1999a.

PILEGGI, S.A.V. Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reiss por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico. 2005. p.15-19. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, 2005.

PRIEST, F.E.; CAMPBELL, I. Brewing Microbiology. 2 ed. UK: Chapman Hall, 1996. 306p.

QUIN, P.J. et al. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. São Paulo: Artmed, 2005. Cap12, p. 74-82.

RAO, K.V et al. Three new manzamine alkaloids from a common Indonesian sponge and their activity against infectious and tropical parasitic diseases. J. Nat. Prod., v. 67, n. 8, p. 314–318, 2004.

REIS, A.O; GENARO, O. Leishmaniose tegumentar americana. In: NEVES, D.P. et. al. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Cap 8, p. 47-57.

RESTREPO, A. Pulmonary paracoccidioidomycosis. Semin Respir Crit Care Med., v. 29, n. 2. p. 182-97, 2008.

REX, J.H. et al. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. J. Infect. Dis., v..30, p. 662-678, 2000.

RIDDELL, R.J.; CLOTHIER, R.H.; BALLS, M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. Food Chem. Toxicol., v. 24, n. 6-7, p. 469-71, 1986.

RODRIGUES, A.M et al. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate Rev. Soc. Med. Trop., v. 39, n.2, p.139-45, 2006.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Brit. Med. J., v. 2, p. 1261-1262, 1903.

ROSSETTI, M. L. R et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. Rev. Saude Publica ,v..36, n.4,2002.

RUIZ, L.R.B.; ZAITZ, C. Dermatofitos e dermatofitoses na cidade de São Paulo no período de agosto de 1996 a julho de 1998. An. Bras. Dermatol., v. 76, n. 4, p.391-401, 2001.

SAMSON, J.C; ROBERT, A. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites . Stud. Mycol., v. 49, p. 1-260, 2007.

SAMSON, R.A. et al. Diagnostic tools to identify black aspergilla. Stud. Mycol., v. 59. p. 129-145, 2007.

SANT'ANA P.L, et al. Multicenter brazilian of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97, n.2, p. 253-57, 2002.

SANTO, A.H. Potencial epidemiológico da utilização das causas múltiplas de morte por meio de suas menções nas declarações de óbito, Brasil, 2003. Rev. Panam. Salud Publica, v. 22, n. 3, p. 178–86, 2007.

SCHIMEL, J. Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. Ecol. Stud., n. 113, p. 239-54, 1995.

SCHROERS, H.J. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. Stud. Mycol., v. 16, p. 1-214, 2001.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycol. Res., v. 106, p. 996–1004, 2002.

SEATON, R.A. et al. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 91, n. 6, p. 727-28, 1997.

SHIAO, M.S.; DON, H.S. Biosynthesis of mevinolin, a hypocholesterolemic fungal metabolite, in: *Aspergillus terreus*. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China, v. 11, n. 3, p. 233-31, 1987.

SHU, Y.Z. Recent Natural Products Based Drug Development: a Pharmaceutical Industry Perspective. J. Nat. Prod., v. 61, p. 1053-71, 1998.

SOBEL, J.D, VAZQUEZ, J.A. Fungal infections of the urinary tract. World J.Urol., v. 17, p. 410–14, 1999.

SPALDING, M.; BLASCO, F.; FIELD, C. World Mangrove Atlas. Okinawa: The International Society for Mangrove Ecosystems. 1997, 178p.

SPINELLO, I.M; MUNOZ, A; JOHNSON, R.H. Pulmonary coccidioidomycosis. Semin Respir. Crit. Care Med., v. 29, n. 2. p. 166-73. 2008.

TIAN, X.L., et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. World J. Microb. Biotechnol., v. 20. p. 303–9, 2004.

TRUFEM, S. F. B. Biotecnologia de Zygomycota. In: BONONI, V.L.R. (Org.). Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, 1998. p 48-64.

URBEN, A.F.; URIARTT, A.H. Curso de cultivo de Lentinus edodes (shiitake) com "Juo-Cao". Rio de Janeiro: Embrapa, 2002. p. 84-105.

URBINA, J.A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in Kinetoplastid parasites. Parasitology, v. 114, 1997.

VARKEY, J.B.; PERFECT, J.R. Rare and emerging fungal pulmonary infections. Semin. Respir. Crit. Care Med., v.29, p. 121-31, 2008.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug Disc. Today, v. 3, n. 5, p. 232-38, 1998.

VIOTTI, R. et al. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am. Heart J., v. 127, p.151-161, 1994.

VONBERG, R.P.; GASTMEIER, P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. J. Hosp. Infect., v. 63, n. 3, p. 246-54, 2006.

WALSH, T. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin. Microbiol. Infect., v.10, p.48–66, 2004. Suppl. 1.

WALSH, T.J. et. al. Infectious Diseases Society of America. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis., v. 46, n. 3, p. 327-60, 2008.

WARNOCK, D.W. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. Jpn. J. Med. Mycol., v. 48, p.1-12, 2007.

WILLIAMS, C. et al. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*, J. Microb. Methods, v.55, n.3, p.813-16, 2003.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin. Infect. Dis., v.39, p. 309-17, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Geneva: WHO, 1990. (Technical Report Series, 793).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. Geneva: WHO, 1999.

XU, Q.; WANG, J.; HUANG, Y. Metabolites from mangrove endophytic fungus *Dothiorella* sp. Acta Oceanol. Sinica, v. 23, p. 541–47, 2004.

ZONIOS, D.I.; BENNETT, J.E. Update on azole antifungals. Semin. Respir. Crit. Care. Med., v. 29, n.2, p. 198-210, 2008.