



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS UFRJ-MACAÉ  
Professor Aloísio Teixeira



**ISOLAMENTO E ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DO FUNGO  
ENDOFÍTICO TB3 DA ESPÉCIE VEGETAL *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. TENDO  
EM VISTA SEU POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO.**

GISELE DA SILVA BELCHIOR

Macaé - RJ  
Fevereiro de 2021

GISELE DA SILVA BELCHIOR

**ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DO FUNGO ENDOFÍTICO DA  
ESPÉCIE VEGETAL *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. TENDO EM VISTA SEU  
POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Farmácia  
da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro – Campus Macaé como um  
dos requisitos para obtenção do  
título de farmacêutico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Oliveira Guimarães

MACAÉ/ RJ  
Fevereiro de 2021

DB427a Da Silva Belchior, Gisele  
Análise do perfil químico e biológico do fungo endofítico da espécie vegetal *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. tendo em vista o seu potencial antimicobacteriano e anti-inflamatório. / Gisele Da Silva Belchior. -- Rio de Janeiro, 2021.  
61 f.

Orientadora: Michelle Frazão Muzitano.  
Coorientadora: Denise Oliveira Guimarães.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus  
Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em  
Farmácia, 2021.

1. Produtos naturais. 2. Tuberculose. 3. Fungos endofíticos. I. Frazão Muzitano, Michelle, orient. II. Oliveira Guimarães, Denise, coorient. III. Título.

GISELE DA SILVA BELCHIOR

ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DO FUNGO ENDOFÍTICO DA  
ESPÉCIE VEGETAL *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. TENDO EM VISTA SEU  
POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO.

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito de  
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 26 de fevereiro de 2021

Comissão avaliadora:

Prof. Dr<sup>a</sup>. MICHELLE FRAZÃO MUZITANO  
UFRJ/ CAMPUS MACAÉ

<http://lattes.cnpq.br/6637126351943749>

Prof. Dr. WILLIAN JONIS ANDRIOLI  
UFRJ/ CAMPUS MACAÉ

<http://lattes.cnpq.br/9247004940826494>

Doutorando: SANDERSON DIAS CALIXTO  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)

<http://lattes.cnpq.br/4705348856252126>

## **AGRADECIMENTOS**

Acredito que todos nós viemos ao mundo com um propósito, e acima de tudo e todos Deus, no qual rege e controla todo o universo, e guia os nossos sonhos e zela POR cada um deles. Apresento o início de um lindo sonho gerado e orquestrado por Deus, que sempre cuidou e cuidará de cada detalhe. Eu Te agradeço!

Aos meus pais, Mariene e Cosme, razão primordial que me fez chegar até aqui, tudo isso somente foi possível com o apoio e paciência de vocês. Obrigada pelo colo, pelas palavras que aquecem o coração, pelas incessantes orações e por me abraçarem com palavras mesmo quando a distância não permitia que isso fosse possível. Amo vocês, tudo isso somente foi possível graças ao empenho e perseverança de vocês.

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando, deixo a minha eterna gratidão.

Ao longo da trajetória nos deparamos com pessoas que são anjos de luz em nossas vidas, e esses podemos chamar de amigos, em especial quero agradecer a minha irmã Ana Carolina, que foi minha companheira de casa e curso, obrigada por entender meu silêncio, pelos conselhos e choros, e ser minha melhor companheira de brigadeiro, filmes e choro. Te amo amiga!

Aos meus presentes da UFRJ Macaé, Laiza e Marlon que fizeram parte do meu ciclo desde início e ao time que sempre esteve ao meu lado oferecendo o incentivo nos momentos que tudo parecia perdido e risadas em meio a tanto desespero, obrigada por terem sido parte da minha base durante esses momentos de provação.

Ao meu noivo, que esteve presente durante esse período totalmente caótico, obrigada por todas as palavras de incentivo, por ser abrigo e meu ponto de tranquilidade, eu te amo!

Às minhas orientadoras Michelle Muzitano e Denise Guimarães, por toda dedicação, paciência e troca que tivemos ao longo desses anos. Sempre dispostas a traçar melhores caminhos e por me acalmarem em meio a tanto desespero e me fazer acreditar que tudo daria certo, gratidões eternas!

Aos demais alunos e professores do LPBio, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho, gratidão!

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu”. (Eclesiastes 3:1)*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Taxa de incidência (em azul) de Tb no mundo (10 casos por 100.000 habitantes) (Adaptado de WHO,2020).....	2
<b>Figura2-</b> Coeficiente de incidência de tuberculose.....	3
<b>Figura 3-</b> Estrutura da parede celular das micobactérias. Os componentes incluem (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicano, (C) arabinogalactana, (D) lipoarabinomanana coberta por manose, (E) proteínas associadas à membrana plasmática e à parede celular, (F) ácidos micólicos e (G) moléculas de glicolípídios de superfície associadas aos ácidos micólicos.....	5
<b>Figura 4-</b> Ciclo de vida de <i>M. tuberculosis</i> e a progressão da doença.....	7
<b>Figura 5-</b> Resumo resposta imune inata e adaptativa frente a tuberculose.....	8
<b>Figura 6-</b> Mecanismo de ação dos medicamentos Anti-Tb com seus respectivos sítios de ação.....	11
<b>Figura 7-</b> Estruturas químicas dos medicamentos de primeira linha para o tratamento da tuberculose.....	12
<b>Figura 8-</b> Estrutura química de substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por fungos endofíticos.....	14
<b>Figura 9-</b> Planta <i>Tocoyena bullata</i> .....	15
<b>Figura 10-</b> Estrutura química do inibidor padrão de iNOS, L-NMMA.....	22
<b>Figura 11-</b> fungo endofítico isolado da espécie vegetal <i>Tocoyena bullata</i> TB3.....	25
<b>Figura 12-</b> Perfil cromatográfico (CCD) lâmpada germicida 254nm Fração Hexânica (H), Fração Acetato de Etila (A) Fração Aquosa (Aq), Extrato Bruto (Br), Branco (B) fungo endofítico da espécie vegetal <i>Tocoyena bullata</i> . (A) Condição cromatográfica BAW 8:0,5: 0,5 (B) Hex/ACOEt 2:1.....	26
<b>Figura 13-</b> Perfil cromatográfico (CCD) lâmpada UV 254 nm Fração Hexânica (H), Fração Acetato de Etila (A) Fração Aquosa (Aq), Extrato Bruto (Br), Branco (B) fungo endofítico da espécie vegetal <i>Tocoyena bullata</i> . (A) Condição cromatográfica BAW 8:0,5: 0,5 (B) Hex/ACOEt 2:1.....	27
<b>Figura 14-</b> Cromatografia meio de cultura (branco) à 254 nm $t_R$ 3,05 e 3,16 min.....	27

<b>Figura 15-</b> Cromatografia Extrato Bruto TB3 à 254 nm e espectro UV com $t_R$ 24,28 min.....	28
<b>Figura 16-</b> Cromatografia da fração AcOEt à 254 nm com espectro UV com $t_R$ 17,88 min.....	30
<b>Figura 17-</b> Cromatografia da Fração Aquosa à 254 nm e espectro UV com $t_R$ 24,28 min.....	28
<b>Figura 18-</b> Perfil cromatográfico em CG-MS da fração hexânica obtida do extrato do fungo <span style="float: right;">endofítico</span> TB3.....	28
<b>Figura 19-</b> Espectros de massas obtidos a partir da técnica de CG/EM referente a fração hexânica com tempos de retenção de 48,52 min - Ácido linoleico (A) e 53,89 min - Ácido palmítico (B) min. Respectivamente.....	30
<b>Figura 20</b> - Estruturas química ácido linoleico (A) e ácido palmítico (B).....	31
<b>Figura 21-</b> Avaliação da capacidade inibitória do Extrato, fração hexânica e acetato de etila isolados do extrato da espécie vegetal <i>Tocoyena bullata</i> no crescimento da cepa laboratorial <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv e do isolado clínico <i>M. tuberculosis</i> M299.....	33
<b>Figura 22-</b> Avaliação da capacidade inibitória do Extrato, fração hexânica e acetato de etila isolados do extrato da espécie vegetal <i>Tocoyena bullata</i> na produção de NO e TNF- $\alpha$ em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.....	35
<b>Figura 23-</b> Avaliação da citotoxicidade celular do Extrato, fração hexânica e acetato de etila isolados do extrato da espécie vegetal <i>Tocoyena bullata</i> através método MTT.....	36



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Rendimentos obtidos a partir do extrato bruto do fungo endofítico TB3 por meio das partições utilizando o solvente hexano e acetato de etila para obtenção da fração acetato de etila e fração hexânica.....	26
<b>Tabela 2:</b> Perfil cromatografico em CG-MS da fração hexânica obtida do extrato endofitico do fungo TB3.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ADC** – Albumina, dextrose, catalase
- AM** – Ácidos micólicos
- APC** – Células apresentadoras de antígeno
- ATCC** – *American Type Culture Collection*
- BAAR** – Bacilo álcool-ácido resistente
- BAW**- Butanol; Acetato de etila; Água
- D.O.** – Densidade óptica
- DMEM-F12** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMF** – Dimetilfamamida
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DSMO** – Dimetil sufóxido
- FC**- Fator de corda
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- IC<sub>50</sub>** – Concentração inibitória necessária para metade da atividade máxima.
- iNOX** – Óxido nítrico sintase induzida
- L-NMMA** – Acetato de N<sup>o</sup>- Metil-L-arginina
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- mAGP** – Complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano
- MC**- Membrana citoplasmática
- MIC<sub>50</sub>**– Concentração mínima inibitória necessária para inibir 50% do crescimento bacteriano
- Mtb** - *Mycobacterium tuberculosis*
- MTT** – 3-(4, 5 dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazol – sal de tetrazol
- NK** – Células *natural killer*
- NO** – Óxido nítrico
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- PBS** – Salina fosfatada tamponada
- SDS** – Dodecil sulfato de sódio
- SFB** – Soro fetal bovino
- TB** – *Tocoyena bullata*

**Tb** – Tuberculose

**TH** – Células T Helper

**TLR** – Receptor Toll-like

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral-alfa

**YMC**- Extrato de Levedura-Manitol

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 Tuberculose .....	1
1.2 Constituição Geral do bacilo .....	4
1.2.1 <i>Mycobacteria tuberculosis</i> .....	4
1.3 Resposta imune da tuberculose .....	6
1.4 Impactos da COVID-19 no controle da Tb .....	9
1.5 Tratamento farmacológico .....	10
1.6 Produtos naturais como fonte para novos fármacos .....	13
1.6.1 Fungos endofíticos como fonte para novos antimicrobianos.....	14
1.6.2 Seleção da planta.....	1
<b>2. Objetivo</b> .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.1.1 Objetivos específicos.....	16
<b>3. Material e Métodos</b> .....	17
3.1.1 Materiais Utilizados .....	17
3.1.2 Meios de cultura .....	17
3.1.2 Reagentes .....	17
3.1.3 Equipamentos .....	17
<b>3.2 Parte Química</b> .....	18
3.2.1 Obtenção do material vegetal.....	18
3.2.2 Obtenção do extrato do fungo endofítico TB3 .....	18
3.3 Cultivo do fungo TB3 .....	18
3.3.1 Obtenção do fungo .....	18
3.3.2 Fermentação - Cultivo do fungo em escala ampliada em meio sólido de arroz para fungos endofíticos .....	19
3.3.3 Obtenção dos extratos e frações orgânicas .....	20
3.4 Análise Cromatografia .....	20

3.4.1 Análise em CCD .....	20
3.5 Análise CLAE .....	21
3.5.1 Preparo da amostra.....	21
3.5.2 Condições para análise via CLAE .....	21
3.6 Análise em CG .....	21
3.6.1 Preparo da Amostra .....	21
3.6.2 Condições para análise via CG- MS .....	21
<b>3.7 Parte Biológica</b> .....	<b>22</b>
3.7.1 Cultivo celular .....	22
3.7.2 Quantificação da produção de NO .....	23
3.7.3 Avaliação da morte celular de macrófagos (método MTT) .....	23
3.7.4 Bioensaio indireto para quantificação da produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos.....	24
3.8 Avaliação da atividade antimicobacteriana.....	25
3.8.1 Obtenção e cultivo das micobactérias .....	25
3.8.2 Preparo do cultivo e ajuste da concentração micobacteriana .....	25
3.8.3 Avaliação da atividade micobacteriana .....	26
3.9 Análise estatística .....	26
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>26</b>
4.1 Isolamento e cultivo dos microrganismos .....	26
4.2 Rendimento resultante do cultivo em meio fermentativo de arroz.....	27
4.3 Análise cromatográfica (CCD, CLAE e CG/MS).....	28
4.3.1 Análise em CCD .....	28
4.3.2 Análise cromatográfica em CLAE .....	29
4.3.3 Análise cromatográfica em CG/MS .....	32
4.4 Ensaio biológicos .....	34
4.4.1 Avaliação da atividade antimicobacteriana das frações orgânicas da TB3 em cultura micobacteriana.....	34
4.4.2 Avaliação das frações obtidas do fungo TB3 quanto a inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ , e citotoxicidade.....	36
4.4.2 Avaliação das frações obtidas do fungo endofítico TB3 quanto a inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ , e citotoxicidade.....	36
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>40</b>

<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>41</b>
--	-----------

## RESUMO

Introdução: A tuberculose (Tb) é uma doença de alta prevalência que acomete grande parte da população mundial e demanda uma necessidade cíclica e contínua por fármacos eficazes devido à resistência observada. Objetivo: Este trabalho propôs os estudos das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória com o fungo endofítico TB3, isolado de *Tocoyena bullata*, encontrada na Restinga de Jurubatiba-RJ. Materiais e métodos: O fungo TB3 foi cultivado em meio de arroz e obtido o extrato bruto etanólico após maceração e concentração do solvente no extrato bruto foram obtidas as frações em hexano e acetato de etila, por partição líquido-líquido. A avaliação da atividade antimicobacteriana foi realizada através do método de MTT. A produção de mediadores inflamatórios foi avaliada em macrófagos RAW 264.7, sendo o óxido nítrico (NO) analisado pelo método de Griess e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) através de bioensaio com a linhagem celular L929. Resultados e discussão: O extrato bruto etanólico do fungo TB3, apresentou inibição do crescimento frente *M. tuberculosis* H37Rv com MIC<sub>50</sub> 76 $\pm$ 0,7; 63,5 $\pm$ 0,7  $\mu$ g/mL. O extrato apresentou IC<sub>50</sub> de 94 $\pm$ 0,9 e 42 $\pm$ 0,7  $\mu$ g/mL para a inibição da produção de NO e TNF- $\alpha$ , respectivamente. Essa tendência anti-inflamatória do extrato poderá ser útil quando enfocada a Tb pulmonar severa, onde o quadro hiper inflamatório precisa ser controlado para evitar danos teciduais nos pulmões e perda de função. O extrato ativo foi particionado e a análise da fração em hexano, que se destacou nos ensaios biológicos, por CG-EM, mostrou picos majoritários com tempos de retenção 48,52 e 53,89 min, sugerindo por similaridade com a biblioteca *National Institute of Standards Technology* (NIST) serem o ácido hexadecanoico (ácido palmítico) e ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico), respectivamente. De acordo com a literatura, o ácido linoleico possui atividade antimicobacteria, atuando na inibição da síntese de ácido micólico. Sendo assim, esse ácido pode ser uma das substâncias responsáveis pela ação do extrato de TB3. Conclusão: O extrato do fungo endofítico de *Tocoyena bullata* TB3 apresenta promissora atividade antimicobacteriana frente cepas atenuada e virulentas. Além, de ser também capaz de inibir a produção de NO e TNF- $\alpha$ .

**Palavras-chave:** produtos naturais; tuberculose; fungos endofíticos.

## ABSTRACT

Tuberculosis (Tb) is a highly prevalent disease that affects a large part of the world population and demands a cyclical and continuous need for effective drugs due to the observed resistance. Objective: This work proposed the studies of antimicrobial and anti-inflammatory activities with the endophytic fungus TB3, isolated from *Tocoyena bullata*, found in Restinga de Jurubatiba-RJ. Material and methods: The TB3 fungus was grown in a rice medium and obtained the crude ethanolic extract after maceration and concentration of the solvent in the crude extract. The fractions in hexane and ethyl acetate were obtained by liquid-liquid partition. The evaluation of antimycobacterial activity was performed using the MTT method. The production of inflammatory mediators was evaluated in RAW 264.7 macrophages, with nitric oxide (NO) being analyzed by the Griess method and the tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) through bioassay with the L929 cell line. Results and discussion: The crude ethanolic extract of the fungus TB3, shows growth inhibition against *M. tuberculosis* H37Rv with MICs  $50 \pm 0.7$ ;  $63 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ . The extract showed an IC<sub>50</sub> of  $94 \pm 0.9$  and  $42 \pm 0.7 \mu\text{g / mL}$  for the inhibition of NO and TNF- $\alpha$  production, respectively. This anti-inflammatory tendency of the extract may be useful when focusing on severe pulmonary Tb, where the hyperinflammatory condition needs to be controlled to avoid tissue damage to the lungs and loss of function. The active extract was partitioned and the analysis of the fraction in hexane, which stood out in biological tests, by CG-EM, showed major peaks with retention times 48.52 and 53.89 min, suggesting by similarity with the National Institute of Standards and Technology (NIST) library to be hexadecanoic acid and 9, 12-octadecadienoic acid, respectively. According to the literature, linoleic acid has antimycobacterial activity, acting in the inhibition of mycolic acid synthesis. Then this acid could be one of the substances responsible for the action of the TB3 extract. Conclusion: The extract of the endophytic fungus of *Tocoyena bullata* TB3 shows promising antimycobacterial activity against attenuated and virulent strains. In addition, it is also able to inhibit the production of NO and TNF- $\alpha$ .

**KEYWORDS:** natural products; tuberculosis; endophytic fungi



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Tuberculose

A tuberculose (Tb) é considerada uma das doenças mais antigas do mundo, que acomete a população desde antiguidade, registros arqueológicos foram capazes de demonstrar a existência da doença há mais de 8000 anos antes de Cristo (aC). A mesma pode ser confirmada pela presença dos principais sinais clínicos responsivos da doença como alterações ósseas características como deformidades tuberculosas, lesões erosivas e colapso das vértebras, que puderam ser observadas em diversos tipos de povos (CAMPOS e PIANTA et al., 2001).

O reconhecimento da Tb pulmonar e a compreensão de suas manifestações clínicas foram descritos por Hipócrates quando denominava o indivíduo acometido com a doença de acordo com suas características apresentadas como sendo tísica ou consumpção (GONÇALVES, 2000).

Com relação a maneira que a doença foi propagada pelo continente América, acredita-se que foi através do fluxo migratório europeu durante as expedições, possibilitando que a Tb fosse transmitida, no qual acarretou a morte de diversos povos indígenas. No Brasil, a disseminação da doença ocorreu por meio da chegada dos jesuítas, que ao migrarem, portando a doença, eram capazes de transmitir a mesma, pelo convívio com os nativos (CAMPOS e PIANTA et al., 2001).

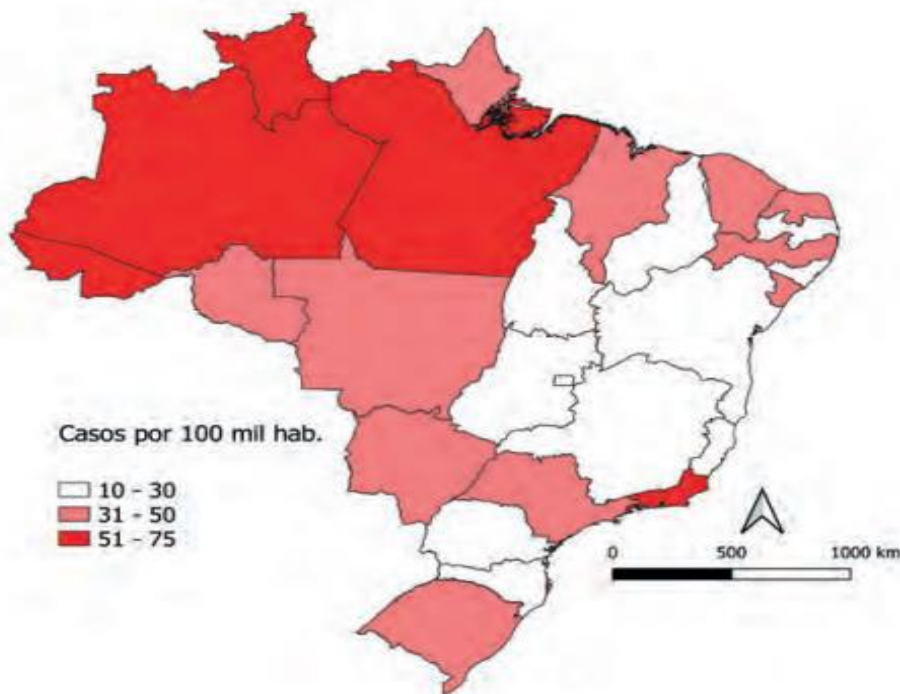
Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Tb é uma das 10 maiores doenças infecciosas que leva a de morte em todo mundo. Em 2019 estima-se que 7,1 milhões de pessoas foram diagnosticadas com Tb e 1,4 milhões de pessoas vieram a óbito por Tb (WHO, 2020).

A doença em questão pode acometer qualquer indivíduo, porém os adultos são o que mais desenvolvem a patologia em questão, ficando com 90% dos números de casos, no que refere ao gênero, vale ressaltar que a Tb possui maior manifestação em homens quando comparado com as mulheres (WHO, 2020).

A Tb no mundo vem apresentando uma queda no seu número de incidência, quando comparado aos anos de 2015 a 2019, no qual ocorreu a redução de 142 a 130 novos casos por 100.000 habitantes. Entretanto os países pertencentes a região das Américas, segundo subdivisão da OMS, estão apresentando um leve aumento



Em 2019, a situação epidemiológica mostra que foram diagnosticados e registrados, 96 mil casos novos que corresponde a 46 casos/100 mil habitantes (WHO, 2020). Ressalta-se que 487 óbitos foram notificados em 2019 (Boletim de Tuberculose, 2020).



**Figura 2:** Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil habitantes), (Adaptado, BOLETIM TUBERCULOSE, 2020).

Os estados que apresentam um maior coeficiente de incidência de Tb, e, cujas capitais apresentaram um coeficiente de incidência superior a 51 casos/100 habitantes são: Rio de Janeiro, Amazonas, Pará, Roraima e Acre. (BOLETIM DE EPIDEMIOLOGIA, 2020).

Observa-se que a Tb é uma doença que possui preocupante agravo de transmissão e grande relevância no Brasil, particularmente no Estado do Rio de Janeiro, onde em nível nacional é o segundo estado que mais notifica casos confirmados, no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), segundo dados do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net (BRASIL, 2020).

## 1.2 Constituição geral do bacilo

A constituição primordial da parede celular consiste em um complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) (ALDERWICK et al., 2012). A parede celular é a principal responsável pela resistência inata aos antibióticos e desempenha um papel importante, para a sua virulência e viabilidade (CAREL et al., 2014). Possui em sua constituição química diversos lipídeos, entre eles os ácidos micólicos (AM) que são responsáveis pela morfologia do bacilo. Sendo utilizados em testes de identificação das espécies e subespécies de micobactérias (BRASIL 2008; GROENEWALD et al., 2014). Em sua parede encontra-se o composto 6-6' dimicolato de trealose responsável pela película que *M. tuberculosis* forma em meio de cultivo líquido e pelo aspecto de corda do crescimento bacilar em esfregaços (BRASIL, 2008). A estrutura do fator de corda (FC) foi completamente esclarecida por Noll et al. em 1956. A membrana citoplasmática (MC) é responsável pelo transporte e seleção de substâncias e pela síntese de pigmentos carotenoides e niacina, utilizados nos testes de identificação fenotípica (BRASIL, 2008). Grânulos de polifosfato são utilizados em atividades energéticas e multiplicação celular e ribossomos, que possuem enzimas necessárias à biossíntese celular, entre elas a responsável pela redução do nitrato a nitrito, uma das provas utilizadas na identificação de *M. tuberculosis* (BRASIL, 2008).

### 1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

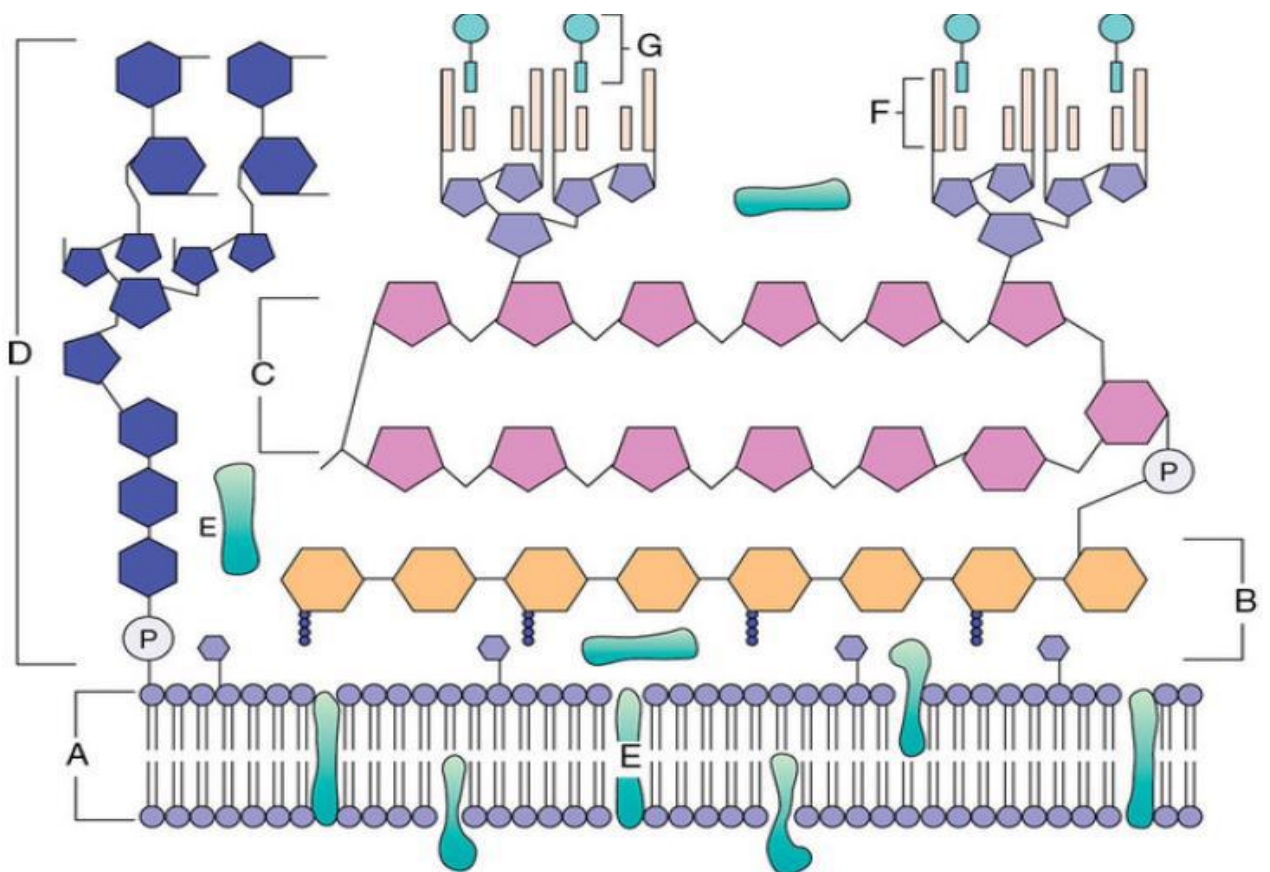
*M. tuberculosis* é pertencente ao táxon complexo no qual inclui *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii* e *M. pinnipeddi*, formando um pequeno e discreto grupo de microrganismos, que exibem mais de 95% de homologia no que diz respeito ao seu ácido desoxirribonucleico (DNA). *M. tuberculosis* tem um nível de variação genética muito baixo, sugerindo que toda a população de organismos *M. tuberculosis* resultou da expansão clonal após um estrangulamento evolutivo há cerca de 35000 anos atrás (MURRAY et al., 2008).

O gênero *Mycobacterium* compreende uma série de bactérias pertencentes ao grupo caracterizado como gram-positivas, na qual a apresentação clínica da doença se dá pela presença do bacilo em sua forma ativa (MURRAY et al., 2008).

O mecanismo para o crescimento e multiplicação do patógeno, ocorre com a utilização de maneira estrita de oxigênio, caracterizando-se como um patógeno aeróbico (MURRAY et al., 2008).

A estrutura da parede celular consiste em uma membrana interna recoberta por uma camada espessa de peptidoglicanos (PGL) covalentemente ligado a moléculas de ácidos micólicos associados a arabinogalactanos, recoberto por lipídeos livres, glicolipídeos, polipeptídeos e lipoproteínas e sem membrana externa, conforme demonstrado na figura 3 (MURRAY et al., 2010).

Os ácidos micólicos, são os principais lipídios presentes, conjuntamente com outros lipídios formam uma monocamada externa, constituindo uma barreira hidrofóbica resistente a degradação enzimática e a alguns fármacos (KARAKOUSIS ET al., 2004).



**Figura 3:** Estrutura da parede celular das micobactérias. Os componentes incluem (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicano, (C) arabinogalactana, (D) lipoarabinomanana coberta por manose, (E) proteínas associadas à membrana plasmática e à parede celular, (F) ácidos micólicos e (G) moléculas de glicolipídios de superfície associadas aos ácidos micólicos (Adaptado Murray, 7ª ed. 2014).

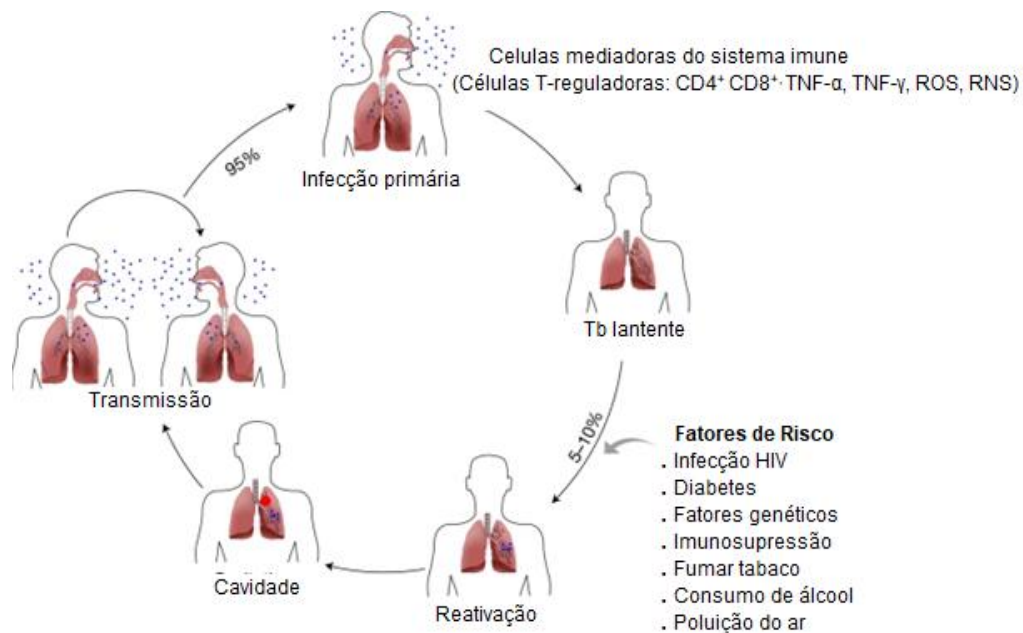
### 1.3 Resposta imune da tuberculose

A Tb ocorre por meio de um processo inflamatório, podendo ser considerada uma doença crônica e apresenta característica de inflamação granulomatosa, que se caracteriza por agregado de macrófagos ativados que assumem uma aparência epitelióide (ABBAS, 2018).

Por tratar-se de uma doença infectocontagiosa que acomete principalmente as vias aéreas, a sua forma pulmonar é a de maior incidência. O principal sintoma associado é a tosse, podendo ser produtiva ou não. Contudo, a bactéria pode acometer outros tecidos, a chamada tuberculose extrapulmonar. Sendo a Tb extrapulmonar associado na maioria dos casos, em pacientes HIV-positivo ou com algum tipo de comprometimento imunológico (SCHLUGER e ROM, 1998)

O bacilo *M. tuberculosis* acomete principalmente as vias aéreas, sendo tipicamente transmitido através da liberação de aerossóis contendo partículas infecciosas resultante da tosse de indivíduo acometido com a doença pulmonar em seu estágio ativo, e posteriormente as gotículas no qual possuem o bacilo são inaladas pelo indivíduo saudável. Por possuir grande afinidade com ambientes ricos em oxigênio o bacilo tendo a se instalar em locais cujo aporte do mesmo ocorra de maneira facilitada como o ápice dos pulmões e córtex renal. A doença caracteriza-se por meio do tempo de duração e a intensidade da exposição ao bacilo (AMARAL, et al., 2016).

Após a inalação do bacilo é estabelecido um processo inflamatório primário, porém as células do sistema imune são capazes de controlá-los fazendo com que a mesma entre em fase de latência. Células inflamatórias são recrutadas para o local de infecção, e se estabelece um equilíbrio entre o bacilo e o hospedeiro. Entretanto pode-se ocorrer a multiplicação bacilar, no qual o bacilo assume sua forma ativa pela reativação da infecção existente, tal situação pode estar associada a diversos comprometimentos imunológicos e a virulência da cepa infectante, entre outros aspectos (SCHLUGER e ROM, 1998).



**Figura 4:** Ciclo de vida de *M. tuberculosis* e a progressão da doença (Adaptado de KUMAR *et al.*, 2011).

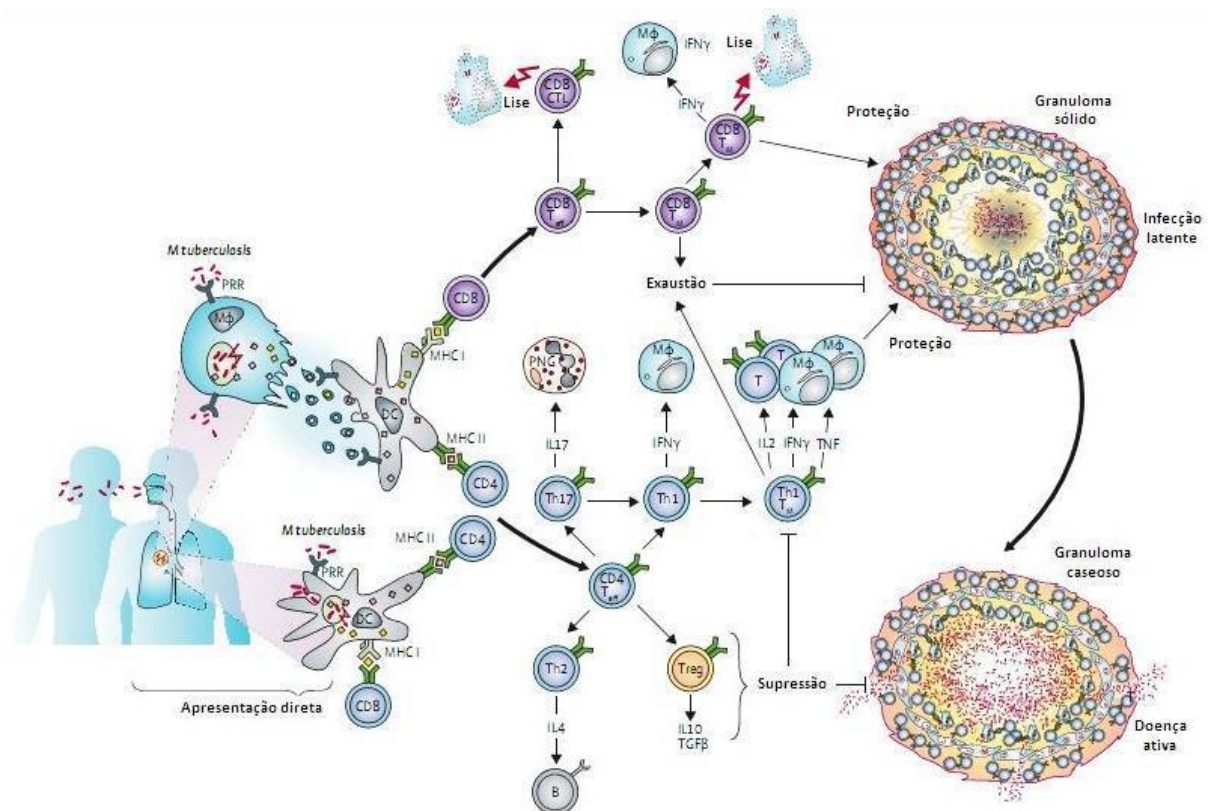
A imunidade inata tem seu início com a fagocitose dos bacilos pelos macrófagos alveolares e do parênquima pulmonar, seguido pelas células dendríticas. Assim a resposta inflamatória local é iniciada, e com isso ocorre o recrutamento adicional de outras células inflamatórias, como monócitos, neutrófilos e células dendríticas, que são potenciais alvos de propagação da inflamação, propiciando a formação de granuloma que vem a ser a principal característica da Tb (ABBAS, 2018).

A resposta imune inata é a primeira etapa de defesa e é considerada primordial para *M. tuberculosis*, especificamente os macrófagos residentes nas primeiras barreiras de defesa frente a micobactéria. Após a fagocitose, os bacilos se mantem no interior do fagossomo. A partir da fusão do fagossoma com o lisossoma, os antígenos podem ser processados e posteriormente apresentados aos linfócitos T. A ativação celular induz a produção de diversos mediadores químicos, como citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1), quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico) (THAISS e KAUFMANN, 2010). Tais citocinas são primariamente liberadas por



células dendríticas e macrófagos em resposta a interação dos receptores de superfície presentes nestas com o bacilo da tuberculose (KORBEL *et al.*, 2008).

A liberação das citocinas IFN $\gamma$  e IL-17 possui papel primordial na contenção da *M. tuberculosis*. Os linfócitos T CD4+ específicos para *M. tuberculosis* são ativados por células apresentadoras de antígenos (APCs) que são capazes de absorver e processar os antígenos derivados da micobactéria, que são apresentados por MHC de classe II. As células T CD8+ contribuem para a defesa do hospedeiro, não somente pela produção de citocinas, mas também pela sua atividade citotóxica no qual a mesma é capaz de mediar (TEIXEIRA, 2007).



**Figura 5:** Resumo resposta imune inata e adaptativa frente a tuberculose (Adaptado, KAUFMANN *et al.*, 2010).

A resposta imune adquirida é mediada por linfócitos, nesse contexto, as células CD4+ vão se diferenciar no subconjunto de células T helper (Th1), no qual são produtoras das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Tais citocinas são responsáveis por acelerar o processo de infiltração celular referente ao processo inflamatório estando diretamente ligado ao processo de organização estrutural na formação do granuloma, sendo ainda capazes de aumentar a resposta microbicida frente aos macrófagos (LYADOVA e PANTELEEV *et al.*, 2015 e JAYACHANDRAN *et al.*, 2008).



O granuloma é um mecanismo de defesa do sistema imune utilizado para delimitar a área de infecção bacilar e prevenir a disseminação. Sua constituição ocorre por um acúmulo de macrófagos, infectados ou não infectados, em vários estágios de ativação, macrófagos espumosos lipídicos, macrófagos epitelioides e outras células fagocíticas, como neutrófilos, rodeados por linfócitos (DORHOI *et al.*, 2011). Em geral, a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$  e NO, pelos macrófagos infectados é essencial para a proteção contra micobactérias. No entanto, durante o curso da doença ativa em casos clínicos severos da Tb, os fatores pró-inflamatórios desempenham um papel *dual*, mediando a proteção quando produzidos em concentrações adequadas ou contribuindo para o agravamento da patologia quando produzidos de forma exacerbada (GARLANDA *et al.*, 2007). A infecção por cepas micobacterianas virulentas induz a morte por necrose dos macrófagos infectados possibilitando a liberação do bacilo ou pequenos aglomerados bacilares. A necrose amplia as áreas de lesão pulmonar e a destruição de brônquios e vasos (GARLANDA *et al.*, 2007 e LYADOVA *et al.*, 2010). Além disso, o acúmulo de neutrófilos no foco inflamatório decorrente da morte necrótica das células infectadas favorece a disseminação bacteriana, por serem células permissíveis e de vida curta; além de liberarem uma gama de produtos microbicidas e citotóxicos que contribuem para a patologia pulmonar e formação da necrose. Sob este prisma, tratamentos adjuvantes, como o uso de anti-inflamatórios, associados a terapia anti-Tb têm sido explorados para reduzir o quadro inflamatório excessivo desenvolvido em indivíduos hiper-reativos.

#### **1.4 Impactos da COVID-19 na epidemiologia e controle da tuberculose no mundo**

Atualmente discute-se sobre o novo coronavírus SARS-CoV-2, e as principais problemáticas que a pandemia poderá trazer para o controle e a prevenção da Tb.

A pandemia COVID-19 ameaça reverter os avanços recentes relacionados a redução da carga global de Tb, estima-se que em 2020 ocorra de 0,2-0,4 milhões de mortes a mais do que em 2019 (WHO, 2020).

Tal problemática relaciona-se as dificuldades de atendimento, visto que se ocorreu uma priorização dos serviços de saúde para os pacientes hospitalizados pelo

novo vírus. Além da problemática relacionada à associação da infecção pulmonar viral e bacteriana, que pode resultar em quadros mais graves, visto que ambas as patologias atingem os pulmões podendo então aumentar os índices de mortalidade.

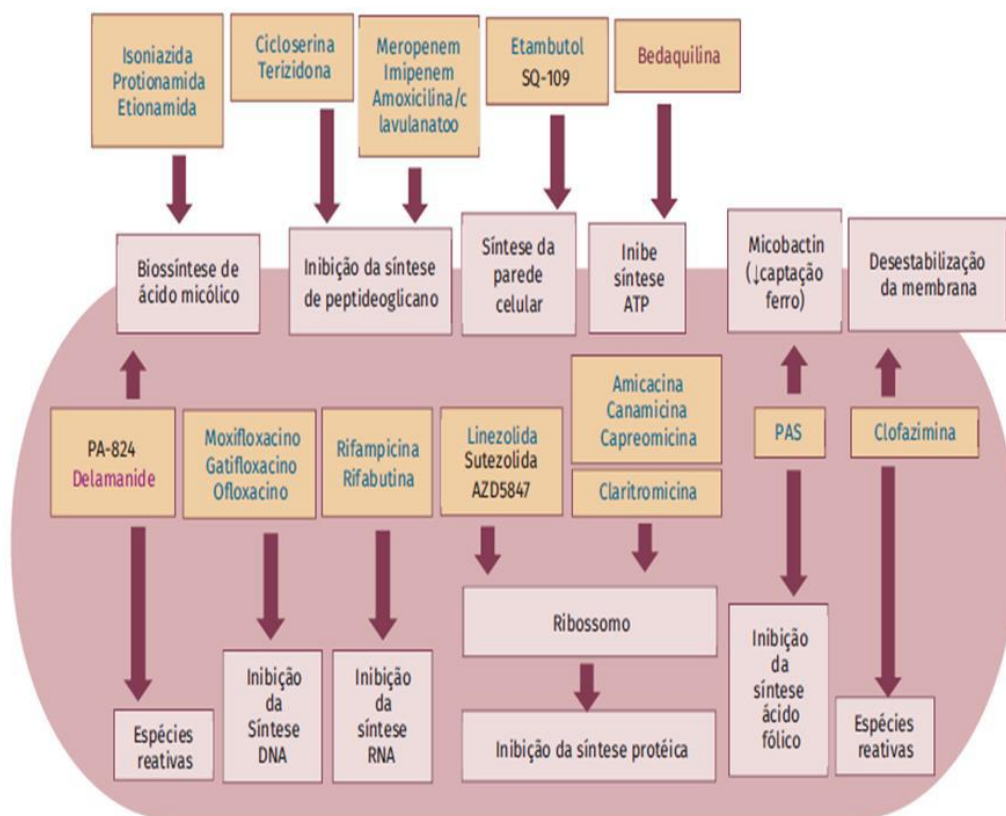
O impacto econômico da pandemia é um agravante previsto para piorar a incidência de Tb: Produto Interno Bruto (PIB) per capita e subnutrição. Com isso sugere-se que poderá ocorrer um aumento de mais de 1 milhão por ano de pessoas desenvolvendo a Tb no período 2020–2025, apresentando um número adicional de 6,3 milhões de casos adicionais e 1,4 milhões de óbitos. O impacto na subsistência resultante de renda perdida ou desemprego também pode aumentar a porcentagem de pessoas com tuberculose (WHO, 2020).

### **1.5 Tratamento farmacológico**

De acordo com a padronização nacional, o tratamento terapêutico de escolha da Tb consiste em vários medicamentos que são disponibilizados em toda a rede pública de saúde de forma gratuita. Possuindo protocolo de tratamento diversificado, pois a mesma apresenta diversificado mecanismo de resistência (Brasil, 2019).

Os mecanismos de ação dos medicamentos utilizados no tratamento da Tb envolvem diferentes sistemas enzimáticos do bacilo ou o bloqueio da síntese de metabólitos essenciais (Figura 6).

Pelo fato de existir distintos mecanismos de resistência, diversas classes de medicamentos são utilizadas no tratamento da doença, sendo necessário que exista associações que atuem em diferentes pontos do ciclo de reprodução da bactéria, para que o tratamento possa ser eficiente e seguro ao paciente.

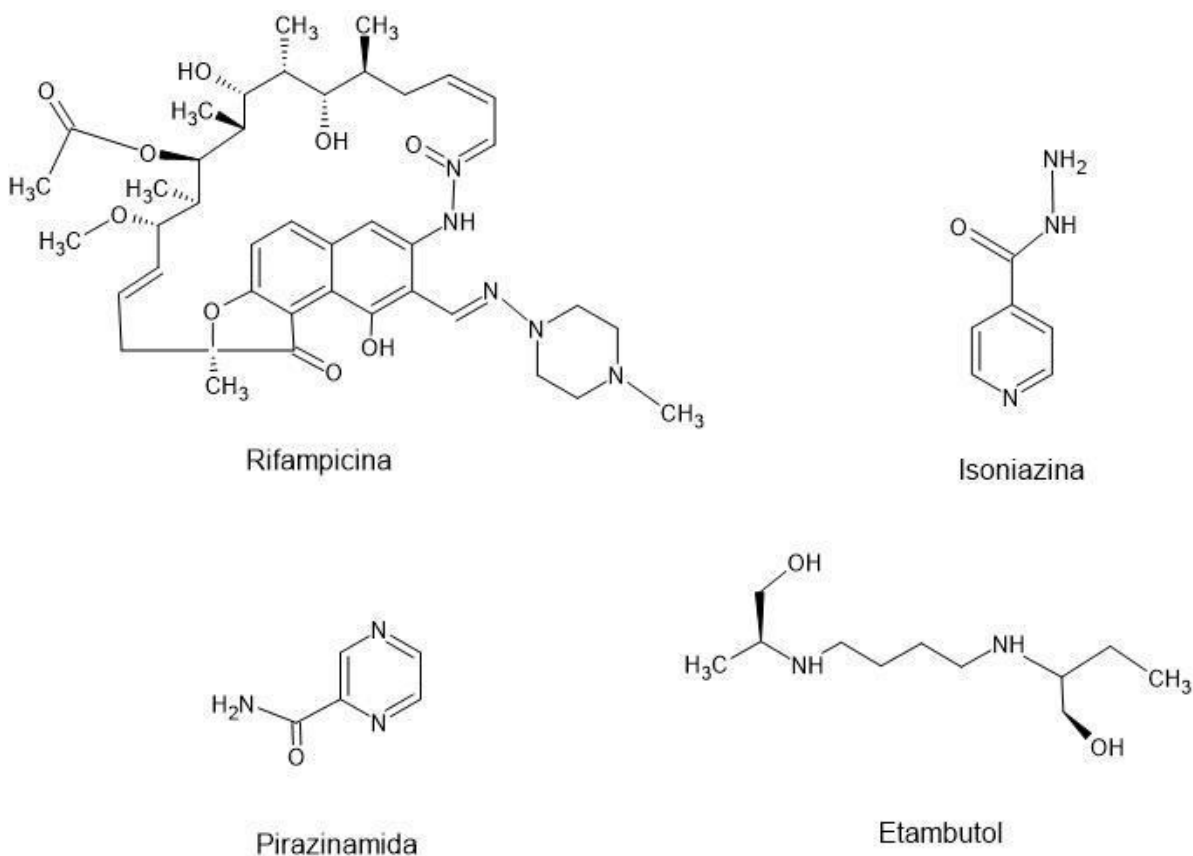


**Figura 6:** Mecanismo de ação dos medicamentos Anti-Tb com seus respectivos sítios de ação (Adaptado Brasil, 2ª ed. 2019).

O esquema básico do tratamento da Tb em adultos e adolescentes é composto por um esquema farmacológico composto por comprimidos com doses fixas combinadas de quatro medicamentos, sendo eles Rifampicina 150 mg (R), Isoniazida 75 mg (H), Pirazinamida 400 mg (Z) e Etambutol 275 mg (E) (RHZE), que irão compor a fase intensiva do tratamento que percorre pelos dois primeiros meses, seguida pela fase de manutenção que possui duração de quatro meses, com a utilização de apenas dois medicamentos proposto no esquema anterior, sendo eles, Rifampicina 300 mg e Isoniazida 150 mg (figura 7) (BRASIL, 2019).

Entretanto, existe desenvolvimento de resistência ao tratamento com a isoniazida e rifampicina sendo classificada como Resistente à Múltiplas Drogas (MDR-Tb). Nos casos de MDR-Tb são necessários combinações de medicamentos de segunda linha: ácido para-aminosalicílico (PAS), canamicina, fluoroquinonas, capreomicina, etionamida e cicloserina e um período mínimo de 20 meses para o tratamento (BUONSENSO et al., 2010 e PRASAD e SINGH, 2008). Na tuberculose extensivamente resistente (XDR-Tb) ocorre não somente a resistência aos fármacos

isoniazida e rifampicina, mas a qualquer fluoroquinolona e pelo menos um medicamento injetável de segunda linha.



**Figura 7:** Estruturas químicas dos medicamentos de primeira linha para o tratamento da tuberculose.

Novos fármacos ou substâncias capazes de atuar em cepas MDR, com menor duração do tratamento, menos efeitos adversos sendo capazes de penetrar na célula hospedeira exercendo atividade antimicobacteriana de forma seletiva são de extremo interesse terapêutico (JANIN, 2007). Além disso, a obtenção de fármacos ou substâncias naturais com características anti-inflamatórias e antimicobacterianas, em casos clínicos severos da Tb, possibilitam a ação na contenção da proliferação micobacteriana e na resposta hiperinflamatória desenvolvida nestes casos, prolongando o tempo de vida do paciente (BUONSENSO et al., 2010)

O desenvolvimento da Tb está estritamente relacionado com o aparecimento de processos inflamatórios severos, com isso se faz necessário a utilização de fármacos que sejam capazes de realizar o controle de tal processo. Com isso, a terapia adjuvante consiste na combinação de imunomoduladores (fármacos,

intervenções biológicas e imunológicas) à terapia antimicobacteriana. Sendo capaz de atuar na contenção da proliferação micobacteriana e no controle da resposta imune do hospedeiro objetivando a redução da resposta inflamatória excessiva (em casos clínicos severos), reparação ou prevenção dos danos teciduais necróticos e aumento da capacidade do organismo na eliminação ou contenção do Mtb hiper-reativos (HAWN et al., 2013, KAUFMANN et al., 2014; ZUMLA et al., 2015).

O tratamento adjuvante direcionado a resposta do hospedeiro a infecção tem sido explorado na clínica terapêutica e nos estudos em modelos experimentais (ZUMLA et al., 2014 e KAUFMANN et al., 2014).

A utilização de glicocorticoides, dexametasona e prednisolona em conjunto com o tratamento padrão anti-Tb já tem sido realizado nos casos de meningite e pericardite tuberculosa, manifestações de Tb extrapulmonar graves (PRASAD & SINGH, 2008)

Sendo assim, se faz necessário a busca por medicamentos que possuam ação dual frente ao tratamento da Tb, visando uma maior eficiência no tratamento por facilitar adequação a terapia medicamentosa do paciente, pela diminuição de medicamentos utilizados para o tratamento da doença em questão.

## **1.6 Produtos naturais como fonte para novos fármacos**

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é uma prática popular que é realizada há muitas décadas (MEDEIROS, et al., 2013).

Atualmente a utilização de plantas medicinais ocorre no âmbito do Sistema Único de Saúde e é regulamentada pelo Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, no qual rege a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, objetivando garantir que a população tenha acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2016.).

Ressalta-se que grande parte dos estudos químicos, farmacológicos e clínicos dos medicamentos é oriunda principalmente da utilização de plantas. Por mais que existam modelos diversificados para obtenção de um novo fármaco, a química de produtos naturais ainda é capaz de desempenhar um papel fundamental na busca por novas substâncias ativas (VASUNDHARA, et al., 2019).

Visando isto, a pesquisa científica cada vez mais volta sua atenção para outras fontes de produtos naturais além das plantas, avançando os estudos para fontes ainda pouco investigadas, como micro-organismos marinhos e endofíticos, representando

um grande avanço na área dos antibióticos, imunossupressores e medicamentos antineoplásicos (TULP e BOHLIN, 2004).

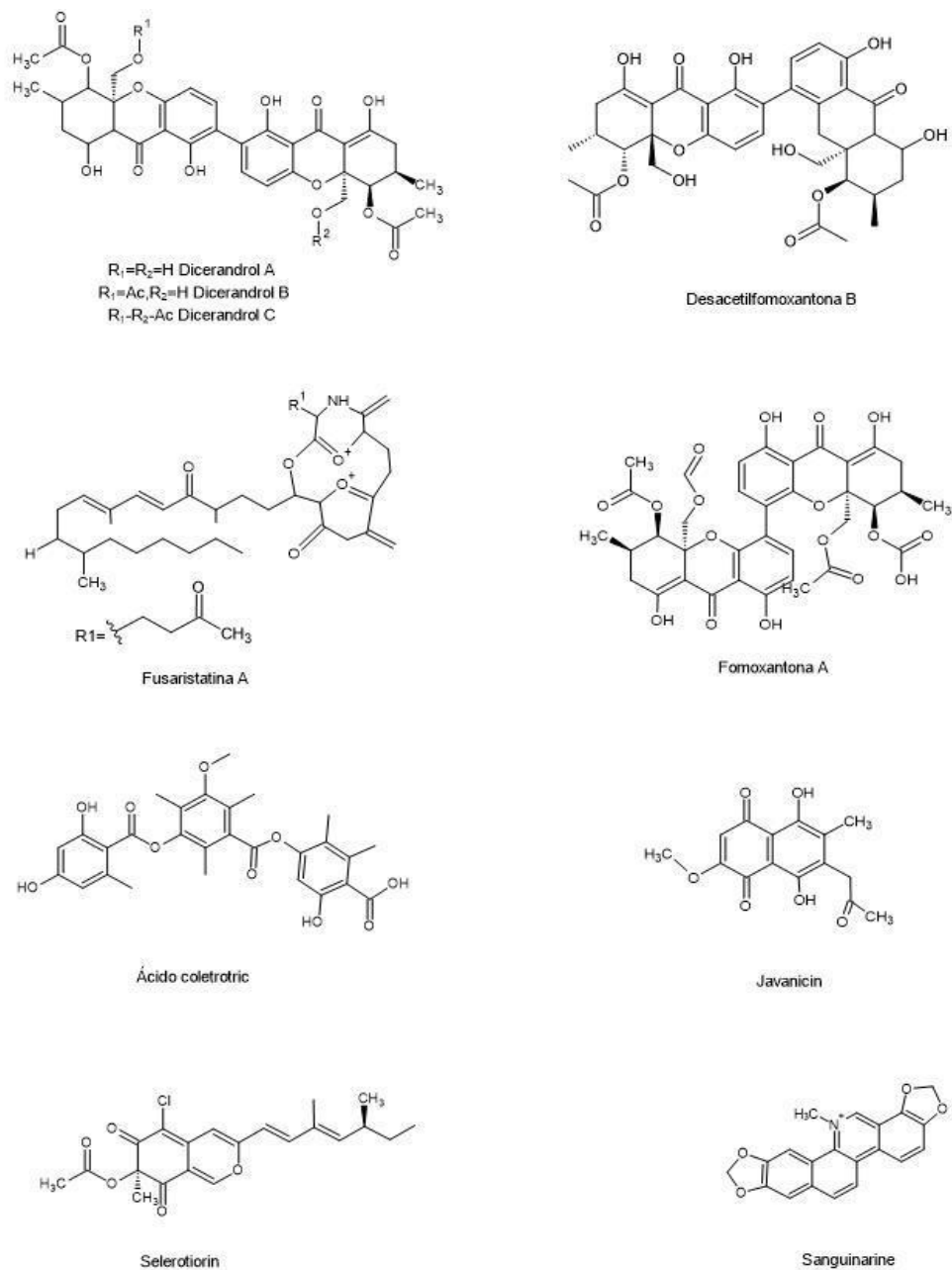
Os micro-organismos desempenham um papel importante na produção de novos produtos naturais que podem ser utilizados na indústria farmacêutica (humana e animal), alimentícia e agrícola, proporcionando à medicina moderna fármacos amplamente eficazes, incluindo a penicilina a partir do fungo *Penicillium notatum*, e bacitracina a partir da bactéria *Bacillus subtilis*. Os micro-organismos endofíticos apresentam uma enorme diversidade de estratégias de adaptação que se desenvolveram em ambientes especiais. A diversidade e adaptação especializada tornou esta fonte natural uma área importante de estudo na busca de novos medicamentos e substâncias (PADHI *et al.*, 2013).

### **1.6.1 Fungos endofíticos como fonte para novos antimicrobianos**

Segundo CHAPLA *et al.* 2013, os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais, são encontrados dentro da célula ou no interstício celular, com isso são chamados fungos simbioses sendo os mesmos capazes de parasitar o seu tecido sem causar nenhum dano imediato ao hospedeiro.

Apresenta melhores características de adaptação terrestre colonizando plantas terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (RANA, *et al.*, 2019).

O estudo de produtos naturais bioativos utilizando como fonte fungos endofíticos, apresenta-se como uma fonte inesgotável e ainda pouco explorada. Já foram descritas mais de 2000 mil substâncias, sendo que 51 % apresentaram estruturas inéditas e 80 % atividade biológica (VASUNDHARA, *et al.*, 2019).



**Figura 8:** Estrutura química de substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por fungos endofíticos (Adaptado, VASUNDHARA, et al. 2019).

### 1.6.2 Seleção da planta

A planta do *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. pertencente à família das Rubiaceae, conhecida popularmente como marmelo da praia, marmelada da praia, araçarana, louro do brejo, jenipapo bravo. Apresenta características morfológicas com presença de arbustos com ramos robustos folhas opostas, inteiras, coriáceas, pilosas em ambas as faces, de superfície rugosa; flores de cor creme com corola tubular muito longa.

Frutos globosos, lisos, com manchas amareladas. É uma planta nativa brasileira, podendo ser encontrada em diversas regiões do Brasil, como em áreas de restinga ou lugares brejosos.



**Figura 9:** Planta *Tocoyena bullata* (Laboratório de Produtos Bioativos LPBio).

Trabalhos preliminares do grupo de pesquisa em produtos bioativos do Campus UFRJ Macaé demonstram que extratos de fungos endofíticos isolados da planta em questão possuem perfil farmacológico satisfatório. Sendo capazes de modular a produção de mediadores químicos do processo inflamatório, tais como NO e TNF- $\alpha$ , e inibir o crescimento de cepas micobacterianas (CALIXTO, 2016).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar o potencial químico do fungo endofítico isolado da espécie vegetal *Tocoyena bullata* (TB), juntamente com as suas frações hexânica e acetato de etila, quanto à capacidade antimicobacteriana e anti-inflamatória.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Cultivo em escala ampliada do fungo TB3 e obtenção do extrato bruto;



- Fracionamento do extrato de TB3 e avaliação do perfil cromatográfico por CG-MS da fração em hexano.
- Avaliação do perfil cromatográfico por CCD e CLAE-DAD do extrato de TB3;
- Avaliação da capacidade antimicobacteriana do extrato no crescimento de cepas de baixa virulência (*M. tuberculosis* H37Rv) e hipervirulência (*M. tuberculosis* M299) em cultura bacteriana;
- Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato em macrófagos murinos estimulados por LPS, quanto à capacidade de inibir a produção de NO e TNF- $\alpha$ ;
- Avaliação da citotoxicidade do extrato em cultura de macrófagos murinos;

### 3 MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais Utilizados

##### 3.1.1 Meios de cultura

Extrato de Levedura-Manitol (YMC) e arroz parborizado (UncleBen's).

##### 3.1.2 Reagentes

EtOH 70%, NaClO 5%, H<sub>2</sub>O estéril, EtOH (Isofar REF: 203 ONU: 1170), AcOEt (Tedia Lote: 1004120R), BuOH (Vetec, Cód. 244, ONU: 1120), DMSO (Panreac 131954.1611), ACN grau HPLC (Tedia, AS 1122-001, Lote:14010052), MeOH grau HPLC (Tedia, MS 1922-001, Lote:1008114), H<sub>2</sub>O Milli-Q e resazurina (Sigma R7017-1G, 127K3524).

##### 3.1.3 Materiais e Equipamentos

Pinça, béquer, bisturí, placas de petri, espalhador de bactérias, tubos de ensaio, palitos de madeira estéreis, autoclave (Prismac), estufa (MedClave), microtubos de 1,5 e 1,0 mL, *transfer tubes*, ponteiras (1000 $\mu$ L e 100 $\mu$ L), placa de aquecimento com agitador magnético (Phoenix luferco AP59), Erlenmeyer, BOD (SOLAB SL200), funil simples, funil de partição, algodão, rotaevaporador (Buchi), etiquetas, frascos, balança analítica (Marte AY22D), fluxo-Trox (FLV506), estufa

(Deleo), placa de 96 poços, micropipetas, *vials* para CLAE, ultrassom (Ultra Cleaner 800<sup>a</sup>), CLAE com injetor automático (Shimadzu).

## **3.2 PARTE QUÍMICA**

### **3.2.1 Obtenção do material vegetal**

A espécie vegetal, *Tocoyena bullata*, foi coletada no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba que fica situada no norte do estado do Rio Janeiro, no município de Quissamã, com a seguinte coordenada geográfica: S 22.26899° (latitude) O 41.64668° (longitude). A coleta e acesso à biodiversidade desta planta e de seus fungos endofíticos associados estão de acordo com a legislação vigente, sob protocolo SisGen cadastro número: AAA989F.

O material vegetal fresco foi devidamente armazenado e prosseguiu-se com o processo de esterilização de superfície, realizado em ambiente estéril, para a obtenção dos microrganismos endofíticos.

### **3.2.2 Obtenção do extrato de fungo endofítico**

O processo de obtenção do extrato do fungo endofítico foi realizado previamente pela aluna Leticia Da Costa Carneiro (CARNEIRO, 2016). A espécie vegetal foi lavada em água corrente e esterilizada superficialmente da seguinte maneira: imersão em álcool etílico 70% por 2,5 minutos, solução de hipoclorito de sódio 5% entre 60 e 90 segundos, imersão em álcool etílico por 1 minuto, e, por fim, em água destilada estéril. Em seguida o material vegetal foi cortado em pequenos fragmentos, sendo os fragmentos inoculados em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA). Foi realizado um controle para cada tempo de esterilização a ser utilizado. Para isso, foi feita a inoculação de cerca de 20-30 µL da água estéril utilizada na última lavagem em meio BDA. A ausência de crescimento de microrganismos nesta etapa com água estéril referente a última lavagem indicou o isolamento apenas de microrganismos endofíticos. A coleta e purificação das diferentes linhagens foram feitas pelo repique em tubos de ensaio *slant*, contendo meio BDA. Foram preparados estoques das linhagens para adequada preservação das mesmas utilizando-se duas metodologias: em água estéril (CASTELLANI, 1939)

e óleo mineral.

### **3.3 Cultivo do fungo**

O fungo endofítico da *Tocoyenna bullata* primeiramente foi reativado a partir do armazenamento segundo a técnica de CASTELLANI (1939). Foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultivo de dextrose, malte e extrato de levedura (YMC), no qual ficaram incubadas em estufa a 30° C para crescimento durante sete dias.

#### **3.3.1 Obtenção do fungo**

Após a sua reativação, foi realizada a etapa que garante o crescimento do fungo, no qual foi-se transferido fragmentos do fungo para um novo meio de nutritivo afim de oferecer aporte para o seu crescimento. Procedimento realizado na capela de fluxo laminar, no qual para a transferência dos fragmentos dos fungos, utilizou-se tubo de transferência (*transfer tube*) que possibilita um corte em disco (0,5 cm de diâmetro) contendo ágar e micélio do fungo. Esse fragmento foi transferido para placas de petri contendo YMC, no qual foram utilizadas 25 placas contendo YMC para a realização da etapa subsequente.

#### **3.3.2 Fermentação - Cultivo do fungo em escala ampliada em meio sólido de arroz para fungos endofíticos**

Para obtenção de uma maior quantidade de biomassa foi necessário a utilização de trinta e dois Erlenmeyers de 500 mL, contendo em cada um 90 g de arroz e 50 mL de água destilada, no qual ambos foram previamente autoclavados por 40 minutos. Dos 32 Erlenmeyers utilizados, dois foram utilizados como controle do meio e aos demais foram adicionados doze fragmentos do micélio fungo endofítico. Os Erlenmeyers contendo os fungos foram incubados em estufa a 30°C durante 26 dias, ao decorrer destes dias foram realizadas leves agitações ao meio, para garantir que houvesse crescimento de maneira uniforme ao meio sólido de arroz.

### **3.3.3 Obtenção dos extratos e frações orgânicas**

Após o processo descrito anteriormente, a fim de obter-se os metabolitos ativos presentes nos microrganismos, realizou-se extração por meio da utilização de etanol. O processo de extração deu-se da seguinte maneira, adicionou-se etanol até que houvesse cobertura total das culturas dos fungos e deixando-a em processo de maceração por 7 dias.

A obtenção dos extratos deu-se por meio de filtração simples, para a remoção de resíduos insolúveis, foram realizadas ao total 3 macerações. Após a completa evaporação do solvente foi obtido o extrato bruto etanólico.

O extrato bruto etanólico passou pelo processo de partição utilizando os solventes hexano (sendo duas partições com 300 mL e 150 mL cada) e acetato de etila hidratado (AcOEt) (sendo duas partições com 300 mL e 150 mL cada). Após a adição dos solventes foram obtidas as frações hexânicas, e acetato de etila e aquosa residual. As frações hexânicas, e em acetato de etila, inicialmente, foram depositadas em frascos de vidro penicilina previamente tarados e suas massas obtidas, após secagem total, por meio de pesagem em balança analítica. Posteriormente, a fração aquosa foi congelada para armazenamento.

## **3.4 Análise Cromatográfica**

### **3.4.1 Análise em CCD**

Realizou-se uma avaliação do perfil químico das frações em hexano e acetato de etila, nos processos anteriormente citados, a análise em questão deu-se pela cromatografia de camada delgada (CCD). Como fase móvel para ambas as frações foram utilizados os seguintes eluentes e com suas respectivas concentrações, BAW 8:0, 5:0,5; Hex/ AcOEt 2:1, com fase estacionária contendo uma fina camada de sílica-gel, sendo utilizado como solução reveladora o sulfato cérico.

### **3.5 Análise em CLAE**

As frações acetato de etila obtidas por meio das culturas fúngicas tiveram seus perfis analisado por meio da cromatográfica líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

#### **3.5.1 Preparo da Amostra**

As amostras foram analisadas na concentração de 1 mg/mL previamente solubilizadas em acetonitrila grau HPLC.

#### **3.5.2 Condições para a análise via CLAE**

A coluna utilizada foi a Luna C18, 5 µm, 100Å, com dimensão de 250 x 4,6 mm. A temperatura do forno e da célula de detecção foi configurada para 30 °C e o volume de injeção da amostra igual a 20 µL.

### **3.6 Análise em CG**

A fração hexânica obtida por meio da cultura fúngicas teve seu perfil químico analisado por meio de cromatográfica gasosa (CG-MS).

#### **3.6.1 Preparo da Amostra**

As amostras foram analisadas na concentração 1 mg/mL previamente solubilizado em metanol grau HPLC.

#### **3.6.2 Condições para a análise via CG-MS**

As análises por cromatografia gasosa foram desenvolvidas em um modelo GC-QP2010S Shimadzu equipado com detector de massas (EM) e uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,33 µm) usando hélio como gás de arraste (1.0 mL min<sup>-1</sup>). A temperatura do injetor foi de 250 °C e a do forno da coluna

foi programada para intervalo de 40 – 240 °C na razão de 3 °C min<sup>-1</sup>. A temperatura da linha de transferência foi de 240 °C, fonte de íons à 240 °C, IEEM, 70 eV. Os constituintes das amostras analisadas foram identificados por comparação aos índices de retenção em cromatografia gasosa e padrão de fragmentação em EM de uma solução padrão de n-alcenos (C7 – C26).

### **3.7 PARTE BIOLÓGICA**

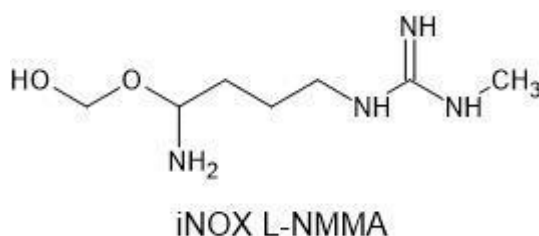
Etapa realizada em parceria com o Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual Norte Fluminense. Os experimentos foram conduzidos pelo, atualmente doutorando, Sanderson Calixto, orientado pela Dr.<sup>a</sup> Thatiana Lopes Biá Ventura Simão e pela Prof.<sup>a</sup> Michelle Muzitano.

#### **3.7.1 Cultivo celular**

As linhagens murinas de macrófagos peritoneais RAW 264.7 e fibroblastos L929 foram obtidos da ATCC (VA, USA) e cultivados em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (20 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, NY, USA), mantidos em estufa de cultivo celular a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando em experimentação, os macrófagos RAW 264.7 (5x10<sup>5</sup> células/mL) foram plaqueados com DMEM-F12 suplementado com 2% SFB, na presença e na ausência dos extratos dos fungos endofíticos (0,8, 4, 20 e 100 µg/mL) e/ou LPS (1 µg/mL, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA). A placa foi mantida em estufa e após 24 h, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação dos parâmetros inflamatórios. Os fibroblastos murinos L929 foram plaqueados (2,5x10<sup>5</sup> células/mL) com DMEM-F12 suplementado com 10% SFB, 24 h antes do dia de coleta do sobrenadante na cultura de macrófagos. Quando em experimentação, o meio de cultura suplementado foi retirado e 50 µL/poço de DMEM-F12 suplementado com 10% SFB e actinomicina D (2 µg/mL) foram adicionados. Posteriormente, 50 µL/poço do sobrenadante coletado da placa de RAW 264.7 estimulada com LPS e tratada por 24 h foram transferidas para a mesma.

### 3.7.2 Quantificação da produção de NO

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito. Cinquenta microlitros dos sobrenadantes (obtido conforme item 3.7.1) foram acrescentados aos 50  $\mu$ L de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Aldrich). Após 10 min, a absorbância foi mensurada a 570 nm em espectrofotômetro de placa (Dinatech MR5000). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em  $\mu$ M utilizando como referência uma curva de nitrito de sódio decrescida do valor obtido com os aditivos sem células (GRIESS, 1939). O fármaco padrão, L-NMMA (Acetato de N<sup>G</sup>- metil-L-arginina) conhecido pela inibição da iNOS, foi utilizado, na concentração de 20  $\mu$ g/mL ( $40,86 \pm 1,06\%$ , IC<sub>50</sub>  $19,5 \pm 1,6 \mu$ g/mL) para comparação da atividade inibitória com as apresentadas pelos extratos dos fungos endofíticos em estudo. Em concentrações maiores, o fármaco apresentou citotoxicidade elevada e em concentrações menores não foi capaz de manter sua atividade inibitória (VENTURA, 2011). As quantidades obtidas em  $\mu$ M de NO no sobrenadante de cada amostra foram comparadas ao controle negativo de produção de NO, somente cultura de macrófagos, e ao controle positivo de produção de NO, macrófagos não tratados e estimulados com LPS.



**Figura 10:** Estrutura química do inibidor padrão de iNOS, L-NMMA

### 3.7.3 Avaliação da morte celular em macrófagos (método MTT)

Para o método do MTT, a placa contendo a cultura celular tratada conforme item 3.7.1 ao fim do período de incubação de 24 h foi acrescida de 10  $\mu$ L/poço de solução de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich). Após 2 h, o sobrenadante da placa foi removido e os cristais de formazan obtidos foram solubilizados em isopropanol

adicionado de ácido clorídrico (HCl) (4 mM). A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa a 570 nm (Dinatech MR5000). Para comparação direta com os resultados obtidos no método do LDH, o percentual de viabilidade obtido através do método do MTT foi convertido em percentual de citotoxicidade utilizando como referência os valores obtidos nos controles utilizados, segundo a fórmula:  $100 - ((D.O._{amostra} - D.O._{c+}) * 100 / (D.O._{c-} - D.O._{c+}))$ . Como controles positivos de mortalidade para os ensaios acima descritos foram utilizados a cultura de macrófagos estimulados e não-tratados acrescidas de 10 µL de Triton X-100 a 0,1% no momento anterior a coleta do sobrenadante e como controle negativo foram utilizadas cultura de macrófagos estimulados e não-tratados.

Ressalta-se que foi empregado o controle do solvente 0,5% DMSO (Sigma Aldrich) usado na diluição das substâncias.

#### **3.7.4 Bioensaio indireto para quantificação da produção de TNF-α por macrófagos**

O bioensaio de forma indireta permite a investigação da presença de TNF-α no sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7, uma vez que os fibroblastos murinos L929 utilizados são sensíveis à presença de TNF-α. Deste modo, a concentração de TNF-α no sobrenadante da cultura está associada ao índice de morte celular. Os fibroblastos L929 foram tratados com solução de tripsina 0,025%+ EDTA 0,2% (Vetec, Brasil) e para remoção do frasco de cultivo celular. Após a remoção, o conteúdo contendo as células foi acrescido de SFB para interromper a ação da solução tripsina. Posteriormente as células contidas no tubo de cultura foram lavadas com PBS estéril e ressuspendidas em meio de cultivo DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 20 µg/mL de gentamicina e então plaqueadas na concentração  $2 \times 10^5$  células/mL em placa de 96 poços. Após a incubação por 24 h a 37°C, 50 µL do sobrenadante proveniente da cultura de macrófagos RAW 264.7 obtidos conforme descrito no item 3.7.1 foram transferidos à cultura de fibroblastos L929. Posteriormente, adicionou-se 50µL de meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e actinomicina D (2 µg/mL). Após nova incubação de 24 h, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (descrita no item 3.7.3). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm. A concentração de TNF-α no



sobrenadante foi mensurada em pg/mL usando como referência uma curva de TNF- $\alpha$  murino recombinante. As quantidades obtidas em pg/mL de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cada amostra foram comparadas ao controle negativo de produção de TNF- $\alpha$ , somente cultura de macrófagos, e ao controle positivo de produção de TNF- $\alpha$ , macrófagos não tratados e estimulados com LPS.

### **3.8 Avaliação da atividade antimicobacteriana**

O extrato de fungo endofítico foi avaliado quanto a sua capacidade de inibir o crescimento micobacteriano diretamente na cultura de cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* M299.

A atividade dos extratos de fungos endofíticos foi comparada a rifampicina, fármaco padrão para tratamento da tuberculose. A rifampicina foi utilizada nas concentrações de 0,00032 - 1  $\mu$ g/mL para a cepa *M. tuberculosis* H37Rv e 0,008, - 10  $\mu$ g/mL para a cepa *M. tuberculosis* M299 durante 5 dias.

#### **3.8.1 Obtenção e cultivo das micobactérias.**

A cepa laboratorial de referência *M. tuberculosis* H37Rv foi obtida da ATCC (27294). A cepa *Beijing*, *M. tuberculosis* M299, proveniente de um isolado clínico de pacientes com Tb em Moçambique foi gentilmente cedida pelo Dr. Philip Suffys (Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil). As cepas foram cultivadas em meio *Middlebrook* 7H9 (Difco, Detroit, MI), acrescido de 0,05% Tween 80 suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase- Difco Laboratories) durante 7 dias até a fase mid-log, em estufa bacteriológica à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O monitoramento do crescimento micobacteriano foi efetuado através da medida de densidade óptica (D.O 600nm), por espectrofotometria (Biochrom, modelo Libra S6). As alíquotas de 1 mL (10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> bactérias) foram retiradas para estoque e acondicionadas à -70°C.

#### **3.8.2 Preparo do cultivo e ajuste da concentração micobacteriana**

Antes da execução dos experimentos, as culturas em suspensão por 7 dias foram agitadas no vórtex e sonicadas em banho de ultrassom por 1 min para dispersão

dos grumos. O ajuste da concentração bacteriana utilizada nos experimentos foi através da leitura prévia de 1 mL das culturas em meio líquido (7H9) em espectrofotômetro (Hitachi – modelo U-1100) a 600 nm, subtraído da D.O. do meio de cultura 7H9 somente suplementado.

### **3.8.3 Avaliação da atividade micobactericida**

A suspensão de *Mycobacterium* ( $3 \times 10^7$  UFC/mL) foi preparada segundo item 3.8.2 e na fase logarítmica de crescimento, 50 µL foram plaqueados em placa de 96 poços ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) junto com o extrato do fungo endofítico (50 µL) adicionados 4, 20, 100 e 500 µg/mL, para ambas as cepas. A placa foi então incubada a 37 °C por 7 dias. Após esse período, foram adicionados 10 µL de MTT e 3 h depois, 100 µL de tampão de lise (20% p/v de SDS, 50% v/v de DMF, Sigma Aldrich). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm. Como controle positivo foi utilizado meio de cultura 7H9 suplementado com ADC acrescido de bactérias e não tratado e como controle negativo, meio de cultura somente.

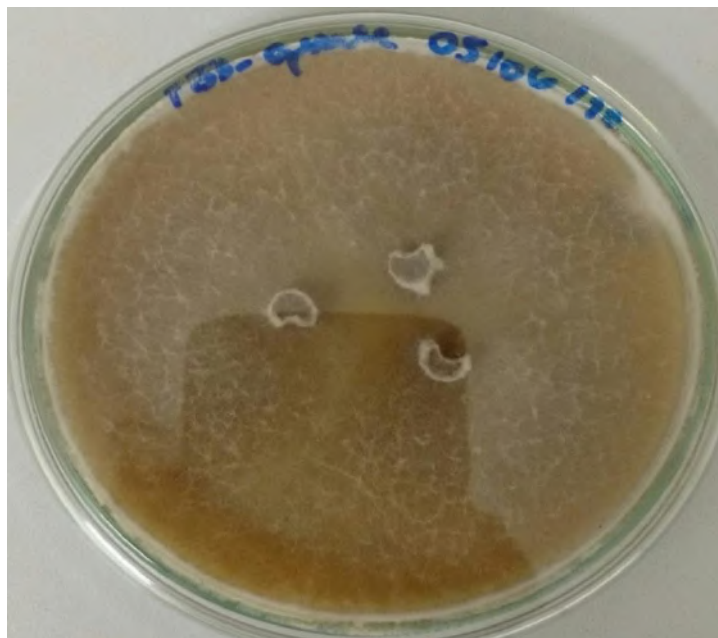
### **3.9 Análise estatística**

Os experimentos em questão foram analisados de acordo com a média de  $\pm$  erro padrão da média da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa GraphPad Prism.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Isolamento e cultivo dos microrganismos**

Durante o processo de cultivo, foi possível realizar reativação do fungo endofítico **TB3** proveniente da espécie vegetal *Tocoyena bullata* no qual encontrava-se em estoque, armazenada em solução estéril contendo água destilada, a amostra em questão é proveniente da biblioteca de microrganismos do Laboratório de Produtos Bioativos. Tais fungos quando isolados foram denominados por TB (*Tocoyena bullata*) e enumerado de acordo com a sua ordem de isolamento.



**Figura 11:** Foto do fungo endofítico TB3 isolado da espécie vegetal *Tocoyena bullata*, em YMC, após 7 dias de crescimento.

#### 4.2 Rendimento resultante do cultivo em meio fermentativo de arroz

O Rendimento obtido após a realização após o cultivo do fungo endofítico em escala ampliada de 103, 37 g de extrato bruto, desses foram utilizadas alíquotas para obtenção da fração hexânica e fração acetato de etila, no qual através das partições foram possíveis a obtenção das seguintes massas, como demonstrados na tabela 1.

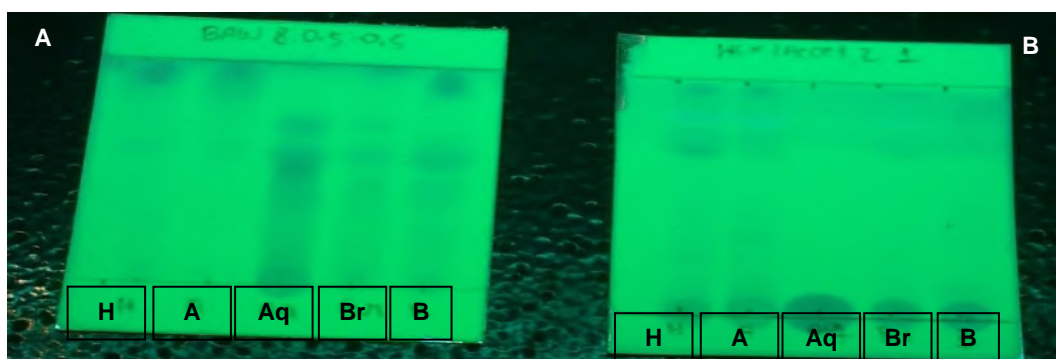
**Tabela 1:** Rendimentos obtidos a partir do extrato bruto do fungo endofítico TB3 por meio das partições utilizando o solvente hexano e acetato de etila para obtenção da fração acetato de etila e fração hexânica.

Massa Utilizada na Partição	Rendimento
<b>1ª partição realizada</b>	
Massa utilizada Extrato Bruto 37,41g	Fração Hexânica 5,29g
	Fração Acetato de etila 0,18g
<b>2ª partição massa utilizada</b>	
Massa utilizada Extrato Bruto 71,63g	Fração Hexânica 8,008g
	Fração acetato de etila 0,3652g

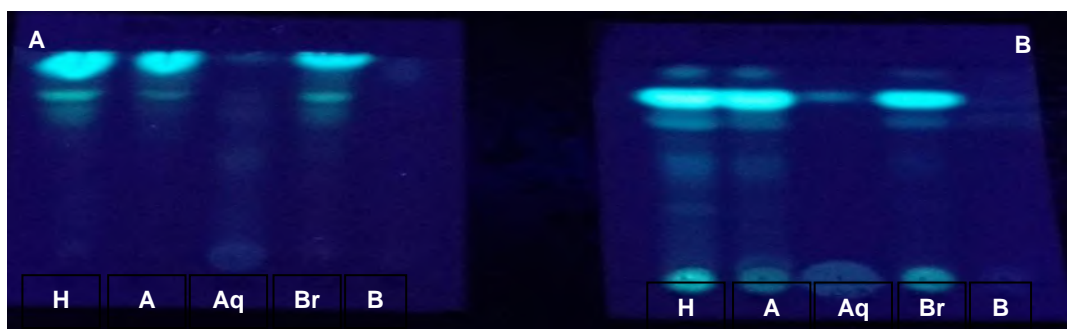
### 4.3 Análise cromatográfica (CCD, CLAE e CG/MS)

#### 4.3.1 Análise em CCD

Por mais que a técnica em questão não seja muito conclusiva, por motivo das amostras possuírem elevada complexidade química, a técnica possui grande valia e trata-se de um procedimento rápido para analisar o perfil químico do extrato e suas respectivas frações. Todas as frações obtidas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) a 254 e 365 nm. Ambas foram reveladas com a solução química reveladora contendo sulfato cérico. As frações hexânica e em acetato de etila possuem perfil semelhante por CCD com banda principal de  $R_f$  0,82 em Hex/ACOEt 2:1. O sistema de partições foram capazes de separar as substâncias de menor polaridade, também mais intensas quando observado o extrato bruto na Figura 13, à 365 nm.



**Figura 12:** Perfil cromatográfico (CCD) a 254 nm. Fração Hexânica (H), Fração Acetato de Etila (A) Fração Aquosa (Aq), Extrato Bruto (Br), do fungo endofítico da espécie vegetal *Tocoyena bullata*, Branco da cultura (B), obtido pela maceração do arroz com álcool etílico. Condição cromatográfica BAW 8:0,5:0,5 (A), Hex/ACOEt 2:1 (B)



**Figura 13:** Perfil cromatográfico (CCD) lâmpada UV a 365 nm Fração Hexânica (H), Fração Acetato de Etila (A) Fração Aquosa (Aq), Extrato Bruto (Br) do fungo endofítico da espécie vegetal *Tocoyena bullata*, Branco (B). obtido do meio de cultivo contendo arroz e álcool etílico utilizado como controle do ensaio. Condição cromatográfica BAW 8:0,5: 0,5 (A), Hex/ACOEt 2:1(B).

Observa-se conforme apresentado nas figuras 12 e 13 o comportamento químico do branco no qual o mesmo apresenta maior afinidade a fase estacionária, com isso aparenta ter maior caráter polar, por apresentar maior afinidade a fase estacionária do sistema, ressaltando-se que o branco utilizado foi o obtido do extrato etanolico, sendo os mesmos utilizados apenas para controle sem realização de partição.

#### 4.3.2 Análise cromatográfica em CLAE

A fração acetato de etila foi analisada por CLAE a fim de conhecer mais sobre seu perfil químico e sua complexidade. A técnica utilizada em questão garante uma maior sensibilidade de análise de estruturas químicas com maior grau complexibilidade, conforme podemos observar frente o caráter químico apresentado no item 4.2.1.

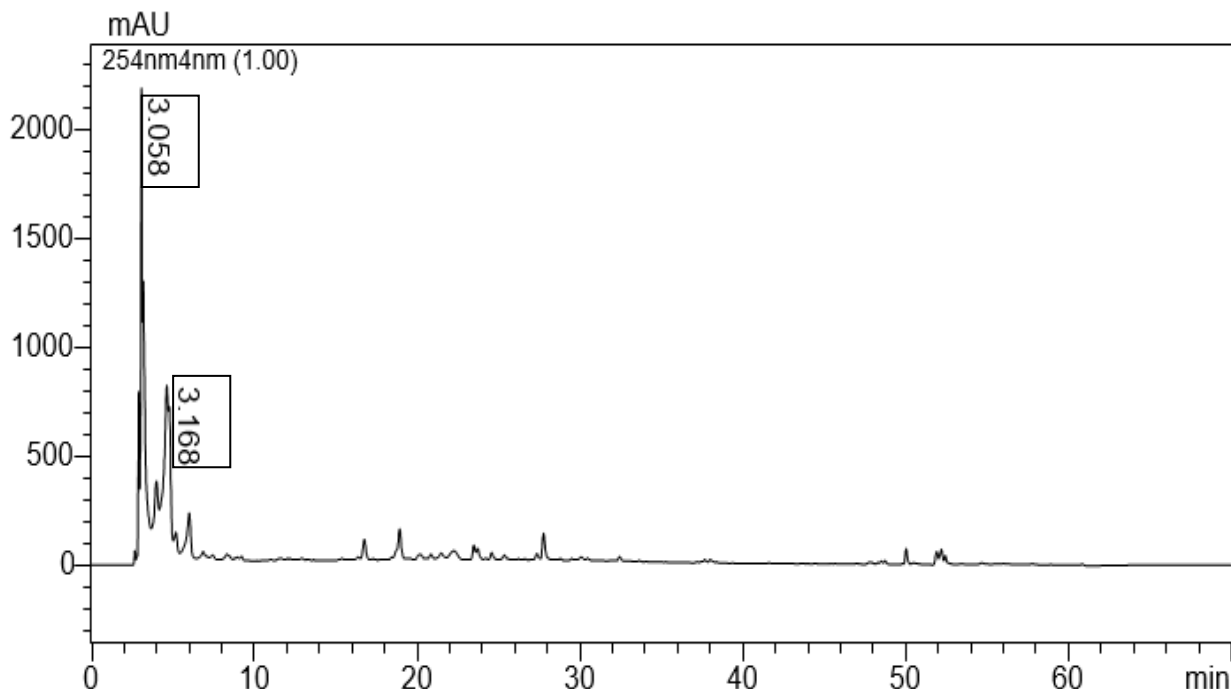
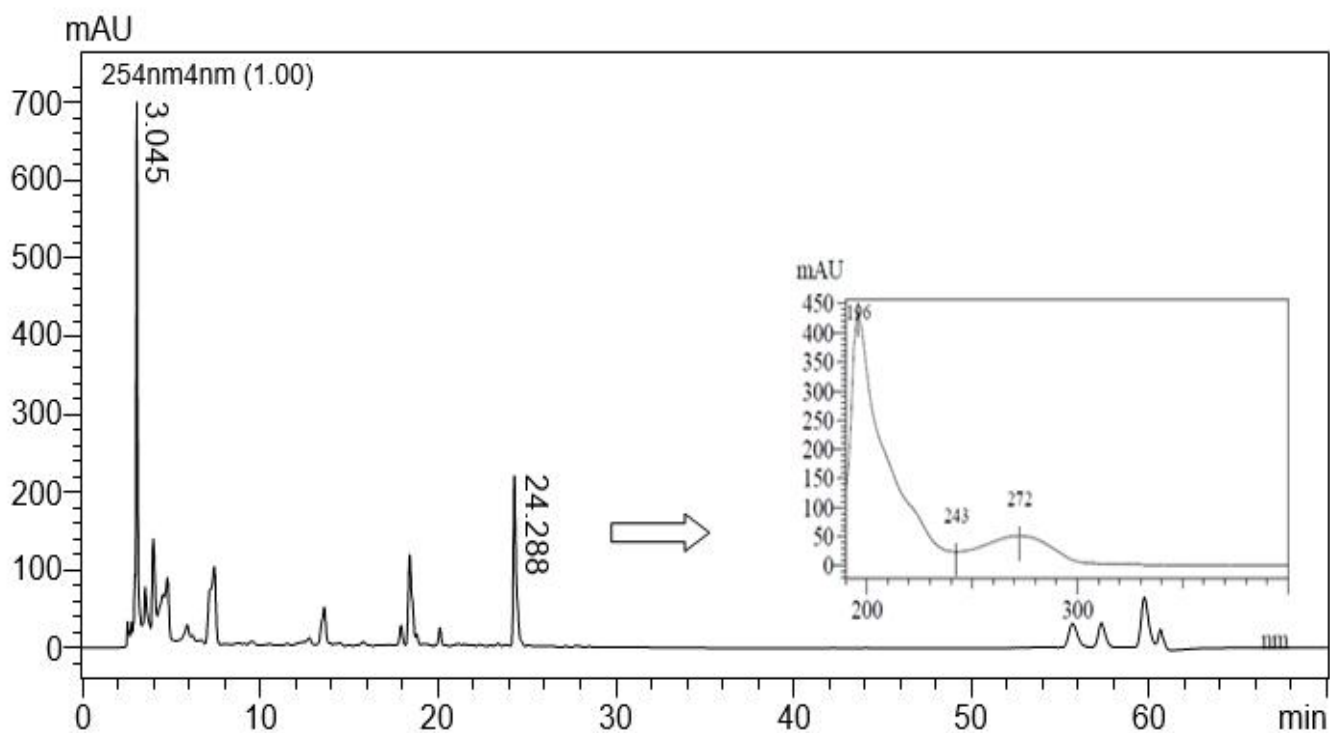
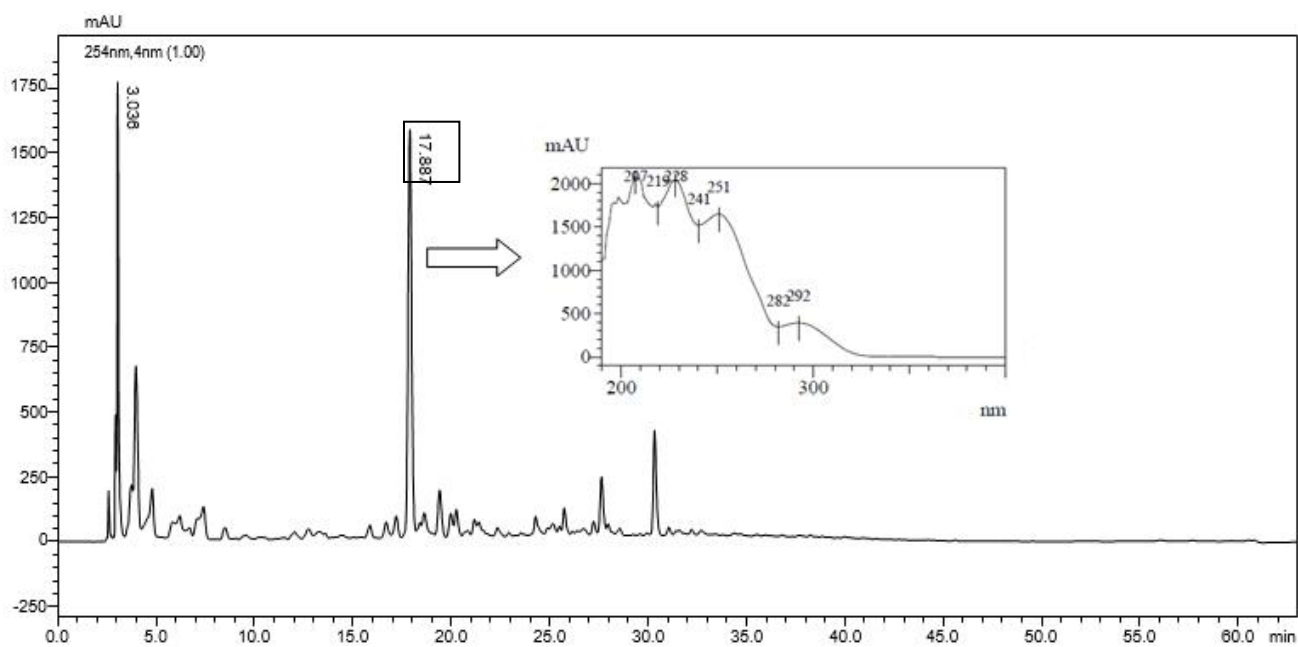


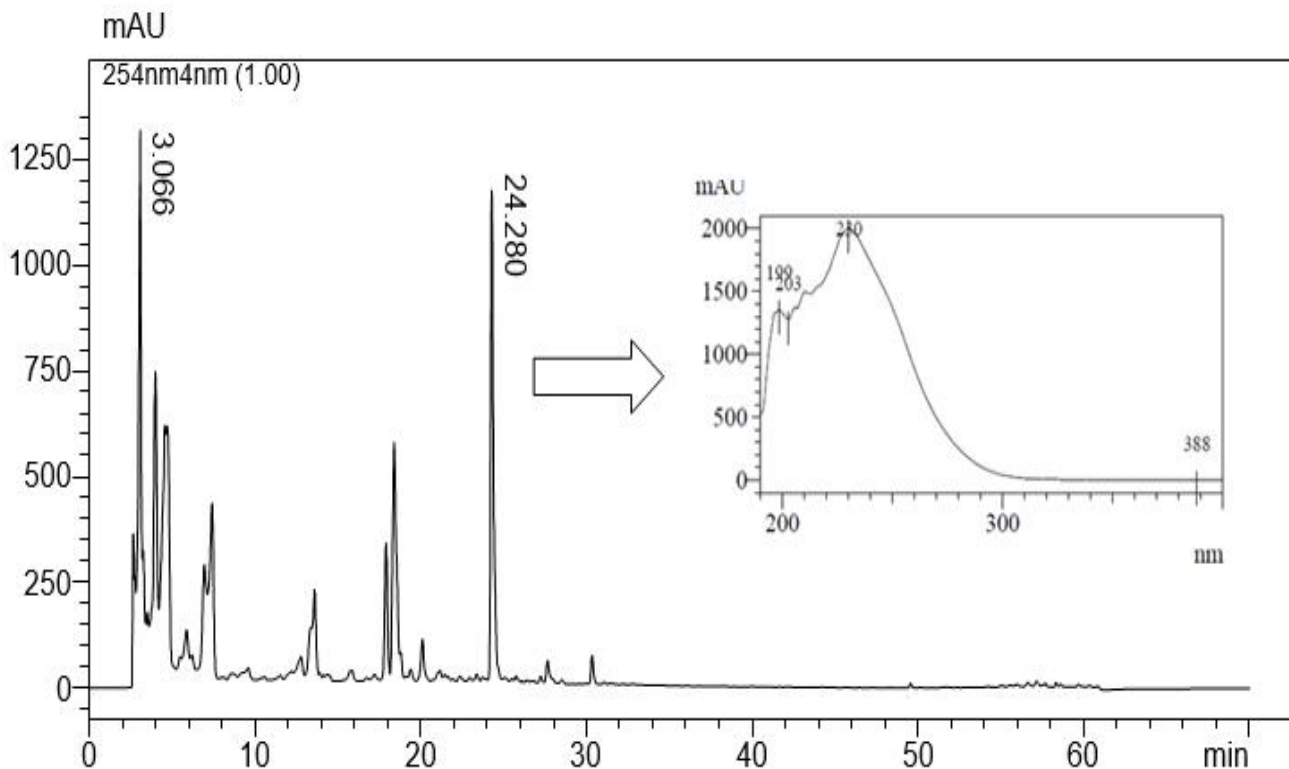
Figura 14: Cromatograma meio de cultura (branco) à 254nm



**Figura 15:** Cromatograma Extrato Bruto TB3 à 254nm e espectro UV do pico de  $t_R$  24,28 min.



**Figura 16:** Cromatograma da fração AcOEt à 254nm com espectro UV do pico de  $t_R$  17,88 min.

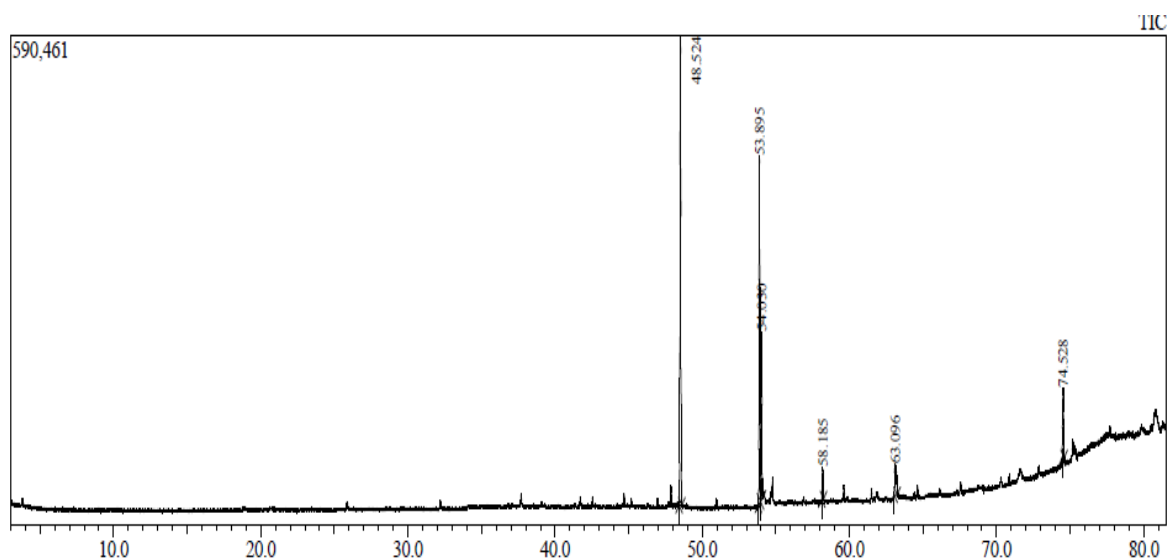


**Figura 17:** Cromatograma da Fração Aquosa à 254nm e espectro UV do pico de  $t_R$  24,28 min.

As frações analisadas apresentaram alto grau de complexidade. A amostra do extrato produzido apenas com meio de arroz, sem o fungo em cultura (branco) apresentou picos referentes a substâncias polares entre 0 e 10 min. Com pico majoritário em 3,05 min. Esse grupo de substâncias apolares, como era de se esperar, pode ser observado em todas as amostras e se deve majoritariamente a substâncias do meio de cultura e não a metabólitos produzidos pelo fungo. O extrato bruto e a fração aquosa apresentam pico majoritário após 10 min com  $t_R$  24,28 min. Essa substância apresentou máximos de absorção ( $\lambda_{Max}$ ) no espectro de UV de 203 e 230 nm, indicativo de sistemas aromáticos e/ou de duplas conjugadas. A fração em acetato de etila mostrou-se enriquecida da substância com  $t_R$  17,89 min, que apresenta  $\lambda_{Max}$  de 207, 228, 251 e 292 nm; sendo indicativo de substância com maior número de sistemas de elétrons conjugados.

### 4.3.3 Análise Cromatográfica CG/MS

A fração hexânica obtida do cultivo foi avaliada quanto ao seu perfil de complexidade e possíveis constituintes em CG-EM sob as condições já descritas.

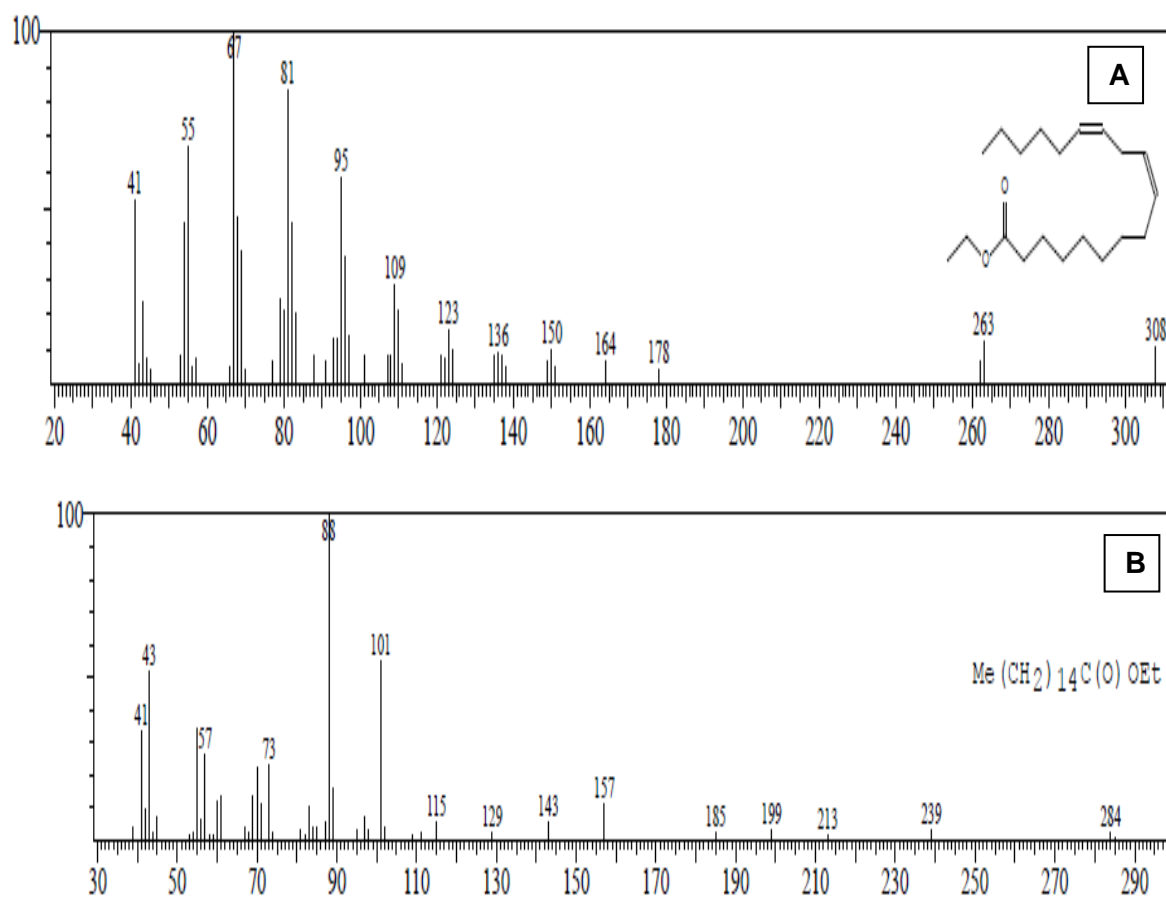


**Figura 18:** Perfil cromatográfico em CG-MS da fração hexânica obtida do extrato do fungo endofítico TB3

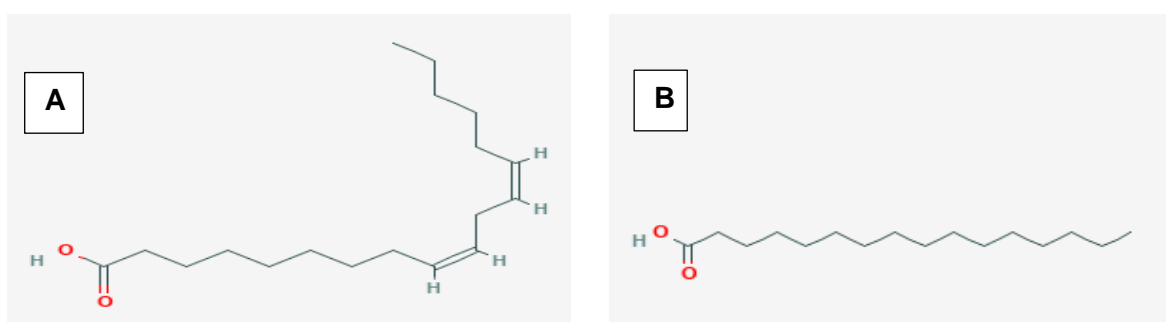
**Tabela 2:** Perfil cromatográfico em CG-MS da fração hexânica obtida do extrato endofítico do fungo TB3

Pico	Tempo de Retenção (min)	Area (%)	Nome	Similaridade (%)
1	48,529	32,24	Ácido Hexadecanoico, Etil Ester	97
2	53,899	24,77	9,12 -Ácido Octadecanoico	94
3	54,039	12,51	9-Ácido Octadecanoico, Etil ester	96
4	58,198	1,68	Ácido Hexadecanoico, Etil Ester	97
5	63,1	3,08	Ácido Hexadecanoico, 2, hidroxí	81
6	63,21	2,72	9,12 Cloreto Octadecanoico	90
7	67,171	8,03	9- Ácido Octadecanoico	83
8	71,415	8,46	Octacosano	96
9	74,53	5,64	Tetratetracontano	96
10	75,183	0,87	15,17,19-21-hexatetriacontatetrano	66
		100		





**Figura 19:** Espectros de massas obtidos a partir da técnica de CG/EM referente a fração hexânica com tempos de retenção de 48,52 Ácido linoleico (A) e 53,89 Ácido palmítico (B) min. respectivamente.



**Figura 20:** Estruturas química ácido linoleico (A) e ácido palmítico (B)

Pela análise do espectro obtido pelo CG-EM, pode-se observar a presença de dois compostos majoritários presentes na fração hexânica do TB3, sendo os ácidos graxos, ácido palmítico e ácido linoleico.

De acordo com dados da literatura o ácido linoleico que é pertencente a classe dos ácidos graxos insaturados, possui atividade satisfatória frente a frente a cepa *Mycobacterium smegmatis* no que se refere a sua atividade antimicrobacteriano sendo

capaz de inibir o seu crescimento, atuando na síntese do ácido micólico (KALITA et.al., 2018). Enquanto o ácido palmítico não possui relevância significativa referente a sua ação antimicobacteriana (STAVRI *et al.*, 2004; SEIDEL e TAYLOR 2004).

#### **4.4 Ensaios Biológicos**

Afim de avaliar a atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana realizou-se ensaios *in vitro* a fim de avaliar a atividade do extrato bruto e as frações acetato de etila e hexânica, do extrato bruto isolado do fungo endofítico da espécie vegetal *Tocoyena bullata*.

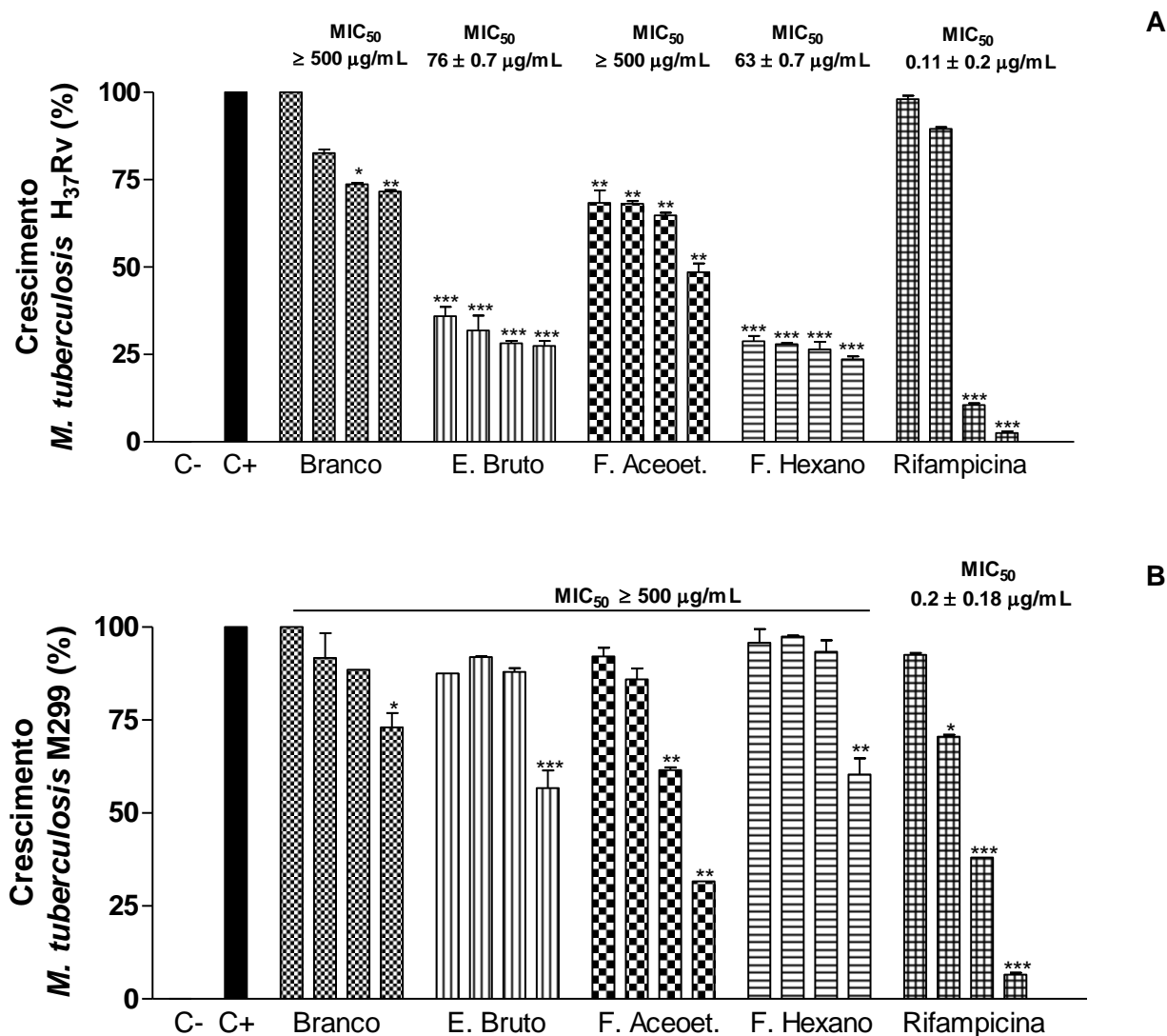
##### **4.4.1 Avaliação da atividade antimicobacteriana das frações orgânicas da TB3 em cultura micobacteriana**

Avaliou-se as frações hexânica e acetato de etila obtidas a partir do extrato bruto etanólico do fungo endofítico isolado da espécie vegetal *Tocoyena bullata*, codificado como TB3, em comparação com o efeito do extrato bruto e do branco.

As amostras resultantes do fungo TB3 foram avaliadas quanto a sua capacidade antimicobacteriana, utilizando duas culturas de *M. tuberculosis* patogênicas, sendo a cepa laboratorial de baixa virulência *M. tuberculosis* H37Rv, a de isolado clínico *M. tuberculosis* M299 sendo a cepa hipervirulenta.

A busca continua por extratos ou substâncias que sejam capazes de inibir o crescimento micobacteriano é de suma importância para o tratamento efetivo da tuberculose. Visto que a patologia está diretamente interligado ao processo inflamatório, sendo assim, apresenta grande relevância a descoberta de um medicamento que possua atividade tanto frente a inibição do crescimento micobacteriano e que module a resposta inflamatório nos casos severos da doença.

PAN et al., 2011 e ISAKA et al.,2001 demonstraram que fungos endofíticos podem apresentar inibição do crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv, cepa de baixa virulência. Há relatos que substâncias obtidas de fungos endofíticos possuem efeitos antimicrobianos e antimicobacterianos, como descrito por ISAKA et al., 2001 e CHENG et al., 2012.



**Figura 21: Avaliação da capacidade inibitória do Extrato, fração hexânica e acetato de etila isolados do extrato da espécie vegetal *Tocoyena bullata* no crescimento da cepa laboratorial *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv e do isolado clínico *M. tuberculosis* M299.** As suspensões bacterianas (1 × 10<sup>6</sup> CFU/poço) da cepa laboratorial *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (A) e do isolado clínico *M. tuberculosis* M299 (B) foram tratadas ou não tratadas com as amostras nas concentrações de (4, 20, 100 e 500 µg/mL) ou com o fármaco anti-Tb padrão rifampicina (0,00032 - 1 µg/mL para a cepa *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv e 0,008, - 10 µg/mL para a cepa *M. tuberculosis* M299) durante 5 dias. Após este período, o método do MTT foi utilizado para estudo do efeito inibitório. As quatro barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. As suspensões bacterianas tratadas com o fármaco rifampicina e o meio de cultivo 7H9 foram utilizados como um controle positivo e a suspensão bacteriana não tratada como controle negativo. Valores são reportados como média ± desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com p < 0,001 (\*\*\*), p < 0,01 (\*\*) e p < 0,05 (\*). Na parte superior de cada gráfico encontra-se a concentração mínima inibitória 50% obtida nas atividades avaliadas. (n=3).

Com isso podemos avaliar, que a fração hexânica e o extrato bruto do fungo TB3 se mostraram eficientes na inibição no crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv,

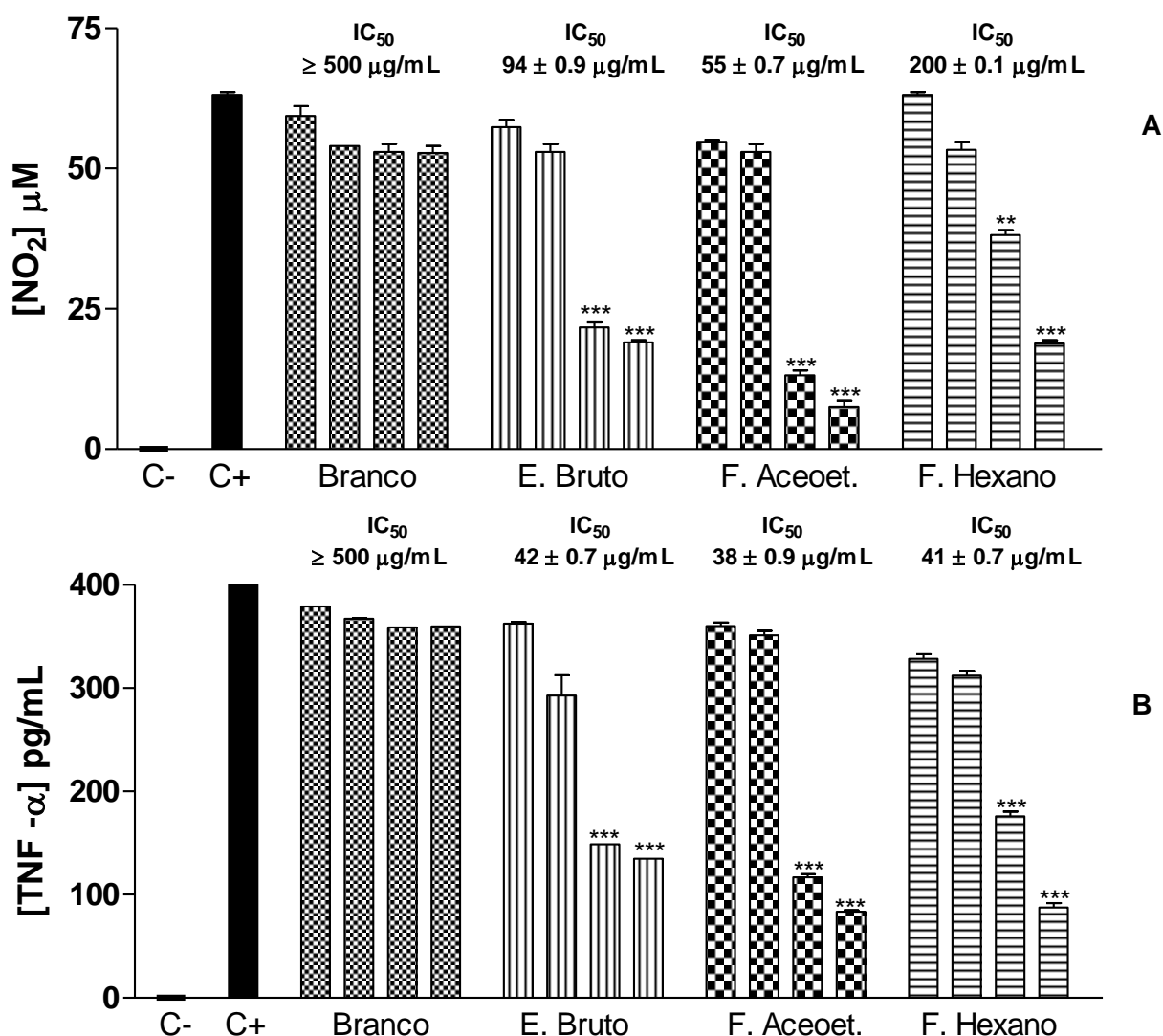
sendo a amostra que apresentou maior potencial de inibição em sua maior concentração foi a fração hexânica com Concentração mínima inibitório de 50% (MIC<sub>50</sub>) 63±0,7µg/mL. Os resultados obtidos foram comparados com o resultado apresentado pela rifampicina, que é o fármaco padrão já descrito e utilizado no tratamento da tuberculose.

A amostra obtida a partir do meio de arroz (branco), não apresentaram atividade significativa, demonstrando que os resultados positivos eram devidos aos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofítico (GUIMARÃES, et al., 2008).

Quanto a inibição frente a cepa hipervirulenta *M. tuberculosis* M299, todas as frações testadas se mostraram ineficientes no processo de inibição do crescimento com valores de MIC<sub>50</sub> acima de 500 µg/mL.

#### **4.4.2 Avaliação das frações obtidas do fungo endofítico TB3 quanto a inibição da produção de NO e TNF-α, e citotoxicidade**

Neste estudo foi possível observar que a fração acetato de etila e a fração hexânica conseguiram inibir em suas maiores concentrações a os níveis de NO, apresentando concentração inibitória mínima 50% (IC<sub>50</sub>) 55±0,7 e 200±0,1µg/mL respectivamente. Entretanto, a fração acetato de etila apresenta uma maior capacidade de inibição do mediador químico NO, mostrando-se eficiente no controle do processo inflamatório, por atuar inibindo a expressão ou a atividade da iNOS.



**Figura 22: Avaliação da capacidade inibitória do Extrato, fração hexânica e acetato de etila isolados do extrato da espécie vegetal *Tocoyena bullata* na produção de NO e TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.** Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS [1  $\mu$ g/mL] e tratados com os extratos de fungos endofíticos nas concentrações de 4, 20, 100 e 500  $\mu$ g/mL. Após 24h o sobrenadante da cultura foi coletado e avaliado. **(A)** A concentração de NO em  $\mu$ g/mL foi obtida por uma curva padrão de nitrito e comparada aos controles positivo de produção de NO (macrófagos somente estimulados com LPS) e negativo (macrófagos não-estimulados). **(B)** O sobrenadante da cultura de macrófagos foi adicionado à cultura de fibroblastos murinos L929 previamente plaqueada incubando-se por 24h. A concentração de TNF- $\alpha$  em pg/mL foi obtida a partir de uma curva padrão de TNF- $\alpha$  murino recombinante e comparado aos controles de forma similar ao utilizado para a produção de NO. As quatro barras para cada amostra são referentes as concentrações testadas em ordem crescente. Valores são reportados como média  $\pm$  desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*). Na parte superior de cada gráfico encontra-se a concentração mínima inibitória 50% obtida nas atividades avaliadas. ( $n=3$ )

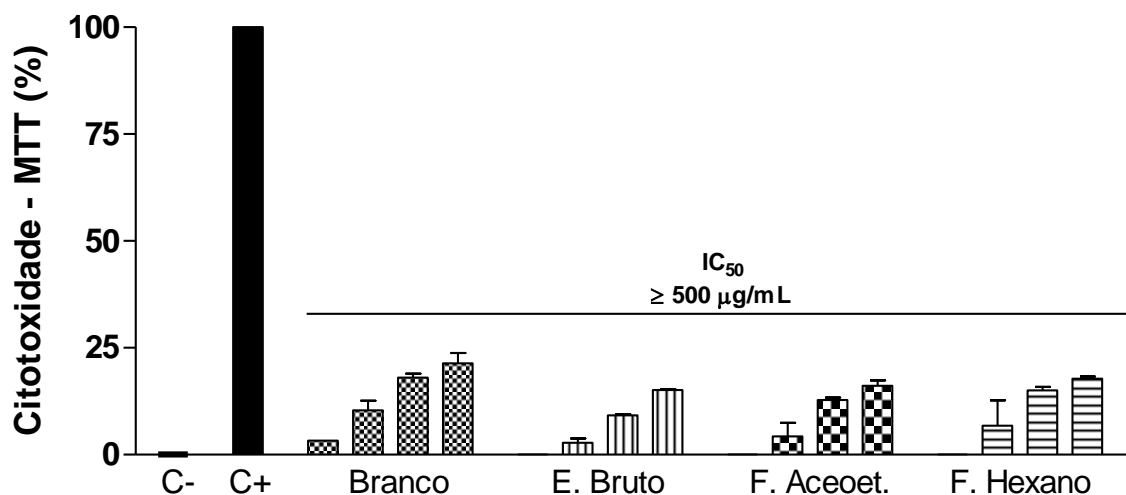
KARMAKAR et al., 2013, relatou que extratos de fungos endofíticos podem apresentar inibição da produção de NO através do sequestro desse radical

livre. Quanto a avaliação da atividade frente ao TNF- $\alpha$  observa-se que ambas as frações foram capazes de reduzir a produção de TNF- $\alpha$ , tendo a fração acetato e hexânica IC<sub>50</sub> 38 $\pm$ 0,9; 41 $\pm$ 0,7, respectivamente. Com isso a fração acetato de etila apresenta um maior potencial frente a inibição do mediador químico TNF- $\alpha$ , que é envolvido estreitamente no processo inflamatório.

Estudos demonstram que substâncias de fungos endofíticos, de forma geral, apresentam capacidade de inibir a produção de NO, TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias (KARMAKAR et al., 2013, LOPES, 2008 e DESHMUKH, et al., 2009).

Os mediadores pró-inflamatórios NO e o TNF- $\alpha$ , produzidas pelos macrófagos, estão envolvidas na resposta inflamatória. Apesar de seus efeitos protetores, quando em altas concentrações o TNF- $\alpha$  e o NO possuem efeitos deletérios.

Quanto a avaliação da citotoxicidade, esta foi avaliada pelo ensaio de verificação da viabilidade celular através da avaliação do potencial das mitocôndrias em metabolizar o 3- (4,5dimetiliazol-2-il) -2,5- difenil tetrazol (MTT) a formazan.



**Figura 23: Avaliação da citotoxicidade celular do Extrato, fração hexânica e acetato de etila isolados do extrato da espécie vegetal *Tocoyena bullata* através método MTT.** Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS [1 µg/mL] e tratados com os extratos de fungos endofíticos nas concentrações de 4, 20, 100 e 500 µg/mL. Após 24h o sobrenadante da cultura foi coletado e avaliado. Os níveis de citotoxicidade das amostras foram avaliados através da funcionalidade mitocondrial através do método do MTT e comparados aos controles negativo (macrófagos estimulados por LPS) e positivo (macrófagos estimulados por LPS e tratados com 1% de Triton X-100). As quatro barras para cada amostra são referentes as concentrações testadas em ordem crescente. Valores são reportados como média  $\pm$  desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*). Na parte superior de cada gráfico encontra-se a concentração mínima inibitória 50% obtida na atividade avaliada. (n=3).

Sendo assim, observa-se que as amostras apresentaram comportamento satisfatório frente a garantir a viabilidade celular, em todas as suas concentrações testadas inclusive em sua maior concentração, sendo um bom indicativo. Os valores

de IC<sub>50</sub>, não foram representados pois os valores ficaram acima de  $\geq 500\mu\text{g/mL}$ , em sua maior concentração testada com isso as amostras não foram tóxicas as linhagens de células testadas e nas respectivas concentrações avaliadas em todo o ensaio.

## 5. CONCLUSÃO

- A partir da técnica de cultivo em meio sólido de arroz em escala ampliada foi possível obter material suficiente do extrato e frações para o desenvolvimento desse trabalho;
- A partir das análises cromatográficas por CCD, CLAE e CG foi possível estudar o perfil químico do extrato e frações, sendo identificados ácido palmítico e linoleico como majoritários na fração hexânica.
- O extrato bruto as frações acetato de etila e hexânica obtidas da espécie vegetal *Tocoyena bullata*, demonstraram-se ativas na inibição dos níveis de NO e TNF-  $\alpha$  na cultura de macrófagos, sendo a fração hexânica a de maior atividade observada no controle da produção de TNF-  $\alpha$ .
- Em relação a ação antimicobacteriana, o extrato bruto e a fração hexânica foram capazes de inibir o crescimento de *M. Tuberculosis* H37Rv, mas não da cepa hipervirulenta *M. tuberculosis* M299.
- Com isso conclui-se que o fungo endofítico codificado TB3 possuem atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana, portanto caracteriza-se como uma importante fonte bioativa a ser estudada no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose.
- Os dados desse trabalho sugerem que o extrato de TB3 pode exercer papel dual quando estudado para TB, ação antimicobacteriana e anti-inflamatória, porém as substâncias responsáveis por ambos os efeitos possivelmente não são as mesmas, considerando que a fração hexânica exibiu maior potencial antimicobacteriano e a fração acetato de etila, maior potencial antiinflamatório.
- Devido ao bom desempenho observado na fração hexânica frente ao seu potencial de inibição do crescimento micobacteriano e a fração acetato de etila frente ao seu potencial inibir a modulação das citocinas pro-inflamatória, ocorrerá prosseguimento nos estudos com ambas as frações de maneira mais aprofundada, a fim de isolar-se as substâncias ativas presentes nas mesmas.



## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ABBAS, A. K. AND LICHTMAN, A.H.** (2018) *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Elsevier, 9ª edição, Rio de Janeiro, RJ.

ADMINISTRATOR. **ICMBIO - Parque Nacional de Jurubatiba - Parna Jurubatiba**. Icmbio.gov.br. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/parnajurubatiba/>>. Acesso em: 13 fev. 2021.

**ALDERWICK LJ., H. J., LLYOD GS. AND BIRCH HL.**The Mycobacterial Cell Wall – Peptidoglycan and Arabinogalactam Advanced Online Article. Cite this article as Cold Spring Harb Perspect Med doi: 10.1101/cshperspect.a021113.

**AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.** Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 11–20, 2016. 2021.

**BOGDAN, C.** Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. 2001, 2, 907- 916.

**BOLETIM TUBERCULOSE** (2020). Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Gerência de Pneumologia Sanitária. Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro. **BRASIL**, Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em Saúde. (2020)

**BRASIL**, Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em Saúde. (2020)

**BUONSENSO, D.; SERRANTI, D.; VALENTINI P.** (2010) Management of central nervous system tuberculosis in children: light and shade. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*; v. 14, p. 845-853 e **PRASAD, K. AND SINGH, M. B.** (2008) Corticosteroids for managing tuberculous meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 23, p. CD002244.

**CALIXTO, S.D.** (2016) Avaliação da atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória de extratos de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *Tocoyena bullata* e *Humiria balsamifera*. Trabalho de conclusão de curso em ciências biológicas UENF.

**CAREL, C., NUKDEE, K., CANTALALOUB, S., BONNE, M., DIAGNE, FL., DEFFE, M., ZERBIB, D.****Mycobacterium** tuberculosis Proteins Involved in Mycolic Acid Synthesis and Transport Localize Dynamically to the Old Growing Pole and Septum. Vol 9 Issue 5 e97148

**CHENG, M. J.; WU, M. D.; YANAI, H.; SU, Y. S.; CHEN, I. S. AND YUAN, G. F.** (2012). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. *Phytochem. Lett.* 5, 467–472. doi: 10.1016/j.phytol.2012.04.007.

Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis (2020).

**DESHMUKH**, S. K.; MISHRA, P. D.; KULKARNI-ALMEIDA, A., VEREKAR, S.; SAHOO, M.R.; PERIYASAMY, G.; GOSWAMI,H.; KHANNA, A.; BALAKRISHNAN, A. AND VISHWAKARMA, R. (2009) Anti-inflammatory and Anticancer activity of Ergoflavin Isolated from an Endophytic Fungus. *Chemistry e Biodiversity*- Volume 6, 2009.

**DORHOI**, A.; REECE, S.T. AND KAUFMANN, S.H. (2011) For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunological Reviews*. 2011, 240(1), 235-251.

**GONÇALVES**, Helen. A tuberculose ao longo dos tempos. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 7, n. 2, p. 305–327, 2000. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-59702000000300004](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-59702000000300004)>. Acesso em: 13 Feb. 2021.

**GUIMARÃES**, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMAN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. (2008). Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 52, p. 134-144.

**HIJJAR**, Miguel Aiub; GERHARDT, Germano; TEIXEIRA, Gilmário M; *et al.* Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. suppl 1, p. 50–57, 2007. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102007000800008](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102007000800008)>. Acesso em: 13 Feb. 2021.

**Horto Botânico | Museu Nacional - UFRJ**. Ufrj.br. Disponível em: <<http://www.museunacional.ufrj.br/hortobotanico/restinga/tocoyenabullata.html>>. Acesso em: 13 fev. 2021.

**Imagens da Peste Branca - História da Tuberculose**. Saude.gov.br. Disponível em: <<http://www.ccs.saude.gov.br/peste-branca/tb-historia.php>>. Acesso em: 13 Feb. 2021.

**ISAKA**, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M. AND THEBTARANONTH, Y. (2001). Phomoxanthones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *J. Nat. Prod.* 64, 1015–1018. doi: 0.1021/np010006h.

ISOLAMENTO E ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Tocoyena bullata* Schumman. Trabalho de conclusão de curso da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé. 2016, 47p

**JANIN**, Y. L. (2007) Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Review*, v. 15, p. 2479–2513.

**KALITA**, DJ., HUSSAIN , I., DEKA, CR., BURAGOHAIN KA., (2018). Antimicrobial activity of linoleic acid and oleic acid obtained from hexane extract of seeds of *Messua ferrea* L. and their in silico investigation. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, Vol.9(2), June 2018, pp. 132-142.

**Karakousis**, CP., BISHAI, R.W. and DORMAN, ES., (2004). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology* (2004) 6 (2), 105–116.

**KARAKOUSIS**, CP., BISHAI, R.W. and DORMAN, ES., (2004). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology* (2004) 6 (2), 105–116.

**KAUFMANN** S.H., ANDERSEN P. (1991) Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *ChemImmunol.* 1991;70:21-59.

**KAUFMANN** S.H., ANDERSEN P. (1991) Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *ChemImmunol.* 1991;70:21-59 .

**KAUFMANN**, S. H. E.; LANGE, C.; RAO, M.; BALAJI, K. N.; LOTZE, M.; SCHITO, M.; ZUMLA, A. I.; MAEURER, M. (2014) Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies- a state of the art review. *Lancet Respir. Med.* 2: 301-320.

**KAUFMANN**, S. H. E.; LANGE, C.; RAO, M.; BALAJI, K. N.; LOTZE, M.; SCHITO, M.; ZUMLA, A. I.; MAEURER, M. (2014) Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies- a state of the art review. *Lancet Respir. Med.* 2: 301-320.

**KAUFMANN**, S.H., HUSSEY, G. and LAMBERT, P.H. (2010). New vaccines for tuberculosis. *Lancet.* 2010, 375(9731), 2110-2119.

**KUMAR**, A.; FARHANA, A.; GUIDRY, L.; SAINI, V.; HONDALUS, M.; STEYN, A. J. C. (2011) Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Rev. Mol. Med.* 13: 1-25.

**LOPES, F. C. M.** (2008) Avaliação da atividade antiinflamatória, antitumoral e antiangiogênica de compostos isolados da planta *Alchornea glandulosa* e de fungos endofíticos a ela relacionados. 2008. 164 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103333>>

**LYADOVA, Irina V.; TSIGANOV, Evgeny N.; KAPINA, Marina A.; et al.** In Mice, Tuberculosis Progression Is Associated with Intensive Inflammatory Response and the Accumulation of Gr-1dim Cells in the Lungs. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10469, 2010. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010469>>. Acesso em: 14 Fev. 2021.

**MANUAL DE RECOMENDAÇÕES PARA O CONTROLE DA TUBERCULOSE NO BRASIL** (2019). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde

**MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S. and PFAÜER, M.A.,** (2014) *Mycobacterium*. In: *Microbiologia Médica*. 7° ed. Guanabara Koogan. 2014, 297-310.

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.** (2020). Relatório Global de Tuberculose 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131> >. Acesso em: 13 fev. 2021

**PADHI, L.; MOHANTA, Y. K.; PANDA, S. K.** (2013) Endophytic fungi with great promises

**PAN, J. H., CHEN, Y., HUANG, Y. H., TAO, Y. W., WANG, J., LI, Y.** (2011). Antimycobacterial activity of fusaric acid from a mangrove endophyte and its metal complexes. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1177–1181. doi: 0.1007/s12272-011-0716-9

**RANA, Kusam Lata; KOUR, Divjot; SHEIKH, Imran; et al.** (2019) Endophytic Fungi: Biodiversity, Ecological Significance, and Potential Industrial Applications. **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**, p. 1–62.

**SCHLUGER, NEIL W. ; ROM, WILLIAM N.** The Host Immune Response to Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 3, p. 679–691, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9517576/>>. Acesso em: 14 Fev. 2021.

**SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E AMBIENTAL COORDENAÇÃO DE VIGILÂNCIA**

**EPIDEMIOLOGICA GERÊNCIA DE TUBERCULOSE -GT BOLETIM  
EPIDEMIOLOGICO TUBERCULOSE Nº 01/2020 CENÁRIO EPIDEMIOLOGICO:  
TUBERCULOSE NO ESTADO RJ. ANÁLISE DO ANO DE DIAGNÓSTICO -2018.**

[s.l.]: , [s.d.]. Disponível em:  
<<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=4EwQFAI%2BDdI%3D>>. Acesso em: 13 Feb. 2021.

**TEIXEIRA HC**, ABRAMO C, MUNK ME. (2007). Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success, *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2007;33(3):323-334.

**TEIXEIRA**, Henrique Couto; ABRAMO, Clarice ; MUNK, Martin Emilio. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA**, v. 33, n. 3, p. 323–334, 2007. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132007000300015&lng=en&nrm=iso&tlng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132007000300015&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 14 Feb. 2021.

**THAISS**, C.A. and KAUFMANN, S.H. (2010) Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2010, 83(4), 209-215.

**VASUNDHARA**, M.; REDDY, M. Sudhakara ; KUMAR, Anil.(2019) Secondary Metabolites From Endophytic Fungi and Their Biological Activities. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 237–258,

**VENTURA**, T. L. B. (2011) Atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana de espécies vegetais ocorrentes no Brasil com ênfase em *Cecropia pachystachya* e *Vochysia divergens*. Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia, LBR/CBB UENF. (PRETSCH *et al.*, 2014 e ZHAO *et al.*, 2010).