



**UFRJ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO



**instituto de**  
**ciências farmacêuticas**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

**MARA BELTRAN DOS SANTOS**

**ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO TB3, ASSOCIADO À  
*Tocoyena bullata*, EMPREGANDO ELICIAÇÃO BIOLÓGICA COM LISADO  
MICOBACTERIANO**

**MACAÉ**

**2022**

MARA BELTRAN DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO TB3, ASSOCIADO À  
*Tocoyena bullata*, EMPREGANDO ELICIAÇÃO BIOLÓGICA COM LISADO  
MICOBACTERIANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Farmácia do Centro Multidisciplinar  
UFRJ- Macaé, como forma de obtenção do título  
de farmacêutica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Oliveira  
Guimarães.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Michelle Frazão  
Muzitano.

Apoio: PIBIC-CNPQ.

**MACAÉ**

**2022**

## CIP - Catalogação na Publicação

S234

Santos, Mara Beltran dos

Análise do perfil químico do fungo TB3, associado à *Tocoyena bullata*, empregando eliciação biológica com lisado micobacteriano / Mara Beltran dos Santos - Macaé, 2022.

100 f.

Orientador(a): Denise Oliveira Guimarães.

Co-orientador(a): Michelle Frazão Muzitano

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Fungos endofíticos. 2. Produtos biológicos. 3. *Tocoyena bullata*. 4. Metabólitos secundários. I. Guimarães, Denise Oliveira, orient. II. Muzitano, Michelle Frazão, coorient. III. Título.

CDD 561.92

MARA BELTRAN DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO TB3, ASSOCIADO À  
*Tocoyena bullata*, EMPREGANDO ELICIAÇÃO BIOLÓGICA COM LISADO  
MICOBACTERIANO**

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

Macaé, 01 de setembro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Denise Oliveira Guimarães (Presidenta da Banca)

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/3655111598408217>

Prof. Dr. Shaft Corrêa Pinto

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/8541879138856081>

Dr. Marlon Heggdorne de Araújo

Instituto Macaé de Ciência e Tecnologia - UFRJ

<http://lattes.cnpq.br/9779013239404101>

***“\_Stay hungry, stay foolish!”***

(Stewart Brand).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador do Universo, porque sem ele nada seria possível.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Oliveira Guimarães, por me aceitar como aluna de iniciação científica, pela dedicação, orientação, ensinamentos, confiança e paciência.

A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Michelle Frazão Muzitano, por toda ajuda durante este trabalho.

Ao meu pai, por ter me apoiado desde o início desse sonho, sempre acreditou em mim e me motivou em todas as situações, como também nunca mediu esforços para me proporcionar um ensino de qualidade.

A minha mãe e meus avós, por todo apoio e contribuição durante a minha trajetória.

As minhas amigas, Carol Mourão, Bianca do Nascimento e Daiana Amaral, que me acompanharam durante essa jornada. À Michele Rodrigues, pelas boas vivências.

A toda Família Mourão, por ter me acolhido com amor e carinho, obrigada!

À Thais Pereira, por ter puxado meu braço na hora de falar com a prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Oliveira Guimarães.

À Andrea Mota, pela motivação, companheirismo, puxões de orelhas e conselhos sobre a vida.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Em especial, à Juliana Givisiéz Valente, por ter preparado o eliciador biológico e ao Marcos Vinicius Toledo, por ter realizado as análises por CG-EM.

Ao pessoal do laboratório, principalmente ao Jobert, à Jessyca e ao Marlon, por toda ajuda e motivação, durante a realização deste projeto.

À Paula Gualter, que esteve comigo no finalzinho dos experimentos, me motivando sempre e compartilhando conhecimentos.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela oportunidade e alta qualidade de ensino, essencial na minha formação como profissional. Ao corpo docente, pelo compartilhamento de conhecimentos e dedicação. Especialmente à professora Samantha e aos professores Shaft, Thiago e Willian, por estarem sempre dispostos a me auxiliar durante a realização dos experimentos.

À agência de fomento, PIBIC-CNPQ, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

**Muito obrigada!**

---

## RESUMO

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior do tecido vegetal, em determinado momento de seu ciclo biológico, sem lhe causar danos visíveis e, mantêm com a planta uma relação mutualística, na qual resulta na produção de metabólitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica, devido as suas diversas atividades farmacológicas, como: antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, etc. Com o surgimento da genômica nos anos 2000, observaram que os microrganismos carregam em seu DNA regiões gênicas que codificam enzimas biossintéticas capazes de sintetizar diversos metabólitos secundários, demonstrando que muitas vezes esses genes estão silenciados em condições tradicionais de cultivo, não ocorrendo a transcrição e produção de toda sua quimiodiversidade. Diante disso, estratégias biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas para ativar esses genes, como exemplo podemos citar o uso de eliciadores, moléculas capazes de induzir ou estimular a produção de metabólitos secundários de microrganismos e vegetais. Eliciadores podem ser substâncias químicas, fatores físicos, e pequenas moléculas biológicas, como o DMSO, raios UV e fragmentos de parede celular de vegetais, respectivamente. Assim, este trabalho objetiva comparar os extratos brutos obtidos do fungo endofítico codificado como TB3, isolado da planta *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae), cultivado com e sem o eliciador biológico, visando sempre avaliar as modificações metabólicas decorrentes da aplicação da técnica de eliciação. Para os cultivos foi utilizado o meio fermentativo de arroz, micélio-ágar do fungo TB3 e o lisado de *Mycobacterium bovis*, cepa atenuada (BCG), como eliciador biológico. Os cultivos foram incubados por 21 dias, à 30 ° C. Após a fermentação realizou-se a extração dos metabólitos fúngicos por maceração estática com etanol absoluto, por 48 h, 30° C. Os extratos brutos foram fracionados por partição líquido-líquido com hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH). Através de cromatografia em camada delgada, foram analisadas frações HEX, BuOH e AcOEt, sugerindo-se a presença de 4 substâncias diferentes no cultivo eliciado, 2 da fração AcOEt e 2 da fração HEX. Ademais, também foi detectada uma substância eliciada na fração AcOEt por meio de CLAE-DAD e, identificadas 4 substâncias induzidas na fração HEX, através de CG-EM, sendo o composto de concentração majoritária, o ácido palmítico. Conclusão: A estratégia abordada foi promissora, uma vez que foram observadas alterações metabólicas no fungo TB3.

**Palavras-chaves:** fungos endofíticos, eliciação, *Tocoyena bullata*, produtos bioativos, quimiodiversidade.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Dados preliminares sobre o padrão de resistência inicial dos casos de tuberculose no Brasil, entre 2012 e 2021 .....	34
<b>Figura 2:</b> Desfecho do tratamento de TB MDR e TB RR, no Brasil, entre os anos de 2010- 2019 .....	34
<b>Figura 3:</b> Planta <i>Tocoyena bullata</i> e fungo endofítico TB3 .....	46
<b>Figura 4:</b> Frascos de Erlenmeyer contendo os CT, CE, B e M .....	49
<b>Figura 5:</b> Fluxograma da partição líquido-líquido a partir dos extratos etanólicos de arroz .....	40
<b>Figura 6:</b> Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de diodos no LPBio .....	51
<b>Figura 7:</b> Cromatoplaça das frações HEX .....	54
<b>Figura 8:</b> Cromatografia em Camada Delgada das Frações HEX .....	54
<b>Figura 9:</b> Cromatoplaça das Frações AcOEt .....	55
<b>Figura 10:</b> Cromatoplaça das Frações BuOH .....	56
<b>Figura 11:</b> Cromatograma da Fração 2-B-TB3, injeção de 20µL, 225 nm .....	57
<b>Figura 12:</b> Cromatograma da Fração 3-B-B, em 254 nm .....	58
<b>Figura 13:</b> Cromatograma da Fração 4-B-M, em 254 nm .....	58
<b>Figura 14:</b> Cromatograma da Fração 1-B-TB3, em 254 nm .....	59
<b>Figura 15:</b> Cromatograma da Fração 2-B-TB3, em 254 nm .....	60
<b>Figura 16:</b> Cromatograma da Fração 3-C-B, em 254 nm .....	62
<b>Figura 17:</b> Cromatograma da Fração 4-C-M, em 254 nm .....	63
<b>Figura 18:</b> Cromatograma da Fração 1-C-TB3, em 254 nm .....	64
<b>Figura 19:</b> Cromatograma da Fração 2-C-TB3, em 254 nm .....	64
<b>Figura 20:</b> Cromatograma da Fração 3-D-B, em 254 nm .....	66
<b>Figura 21:</b> Cromatograma da Fração 4-D-M, em 254 nm .....	66
<b>Figura 22:</b> Cromatograma da Fração 1-D-TB3 .....	67

<b>Figura 23:</b> Cromatograma da Fração 2-D-TB3 .....	67
<b>Figura 24:</b> Estruturas de ácidos graxos produzidos por fungos endofíticos .....	73
<b>Figura 25:</b> Estrutura do Trimetilsilil éster de ácido palmítico .....	87
<b>Figura 26:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 3-B-B - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	87
<b>Figura 27:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 4-B-M- 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	88
<b>Figura 28:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 1-B-TB3- 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	88
<b>Figura 29:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 2-B-TB3- 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	89
<b>Figura 30:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 3-C-B - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	89
<b>Figura 31:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 4-B-M - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	90
<b>Figura 32:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 1-B-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	90
<b>Figura 33:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 2-B-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	91
<b>Figura 34:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 3-D-B - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	91
<b>Figura 35:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 4-D-M - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	92
<b>Figura 36:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 1-D-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	92
<b>Figura 37:</b> Cromatogramas sobrepostos da Fração 2-D-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm .....	93
<b>Figura 38:</b> Cromatograma Fração 4-A-M .....	93
<b>Figura 39:</b> Cromatograma Fração 3-A-B .....	94
<b>Figura 40:</b> Fração 1-A-TB3 .....	94
<b>Figura 41:</b> Fração 2-A-TB3 .....	95
<b>Figura 42:</b> Fração 3-B-B .....	95

<b>Figura 43:</b> Fração 4-B-M .....	96
<b>Figura 44:</b> Fração 1-B-TB3 .....	96
<b>Figura 45:</b> Fração 2-B-TB3 .....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Esquema básico para o tratamento de tuberculose em adultos e adolescentes ( $\geq 10$ anos) .....	28
<b>Tabela 2:</b> Estrutura dos fármacos do Esquema Básico e seu mecanismo de ação .....	28
<b>Tabela 3:</b> Estrutura química dos principais fármacos de segunda linha para o tratamento da TB .....	31
<b>Tabela 4:</b> Medicamentos que podem ser utilizados para tratar TB DR .....	34
<b>Tabela 5:</b> Classificação dos eliciadores .....	45
<b>Tabela 6:</b> Classificação dos eliciadores quanto à origem .....	46
<b>Tabela 7:</b> Gradiente de concentração de acetonitrila na fase móvel por tempo de eluição .....	54
<b>Tabela 8:</b> Rendimento após partição dos extratos etanólicos de arroz: .....	55
<b>Tabela 9:</b> Picos majoritários das frações acetato de etila, cromatograma sobreposto em 225, 254 e 365nm .....	62
<b>Tabela 10:</b> Tempo de retenção das substâncias detectadas no comprimento de 254nm .....	63
<b>Tabela 11:</b> Picos majoritários detectados em 225 e 254 nm das frações butanólicas ...	67
<b>Tabela 12:</b> Principais picos detectados em 225 e 254 nm das frações aquosas .....	70
<b>Tabela 13:</b> Compostos Identificados nas frações HEX e concentração .....	71
<b>Tabela 14:</b> Compostos Identificados nas frações AcOEt e concentração .....	72
<b>Tabela 15:</b> Todos os compostos identificados e tempo de retenção (min) .....	73
<b>Tabela 16:</b> Substâncias eliciadas produzidas pelo fungo TB3 suas propriedades .....	76

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ACN</b>	Acetonitrila.
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila.
<b>antiTB</b>	Anti-tuberculose.
<b>BAAR</b>	Bacilo lcool-ácido resistente.
<b>BAW</b>	Em inglês : <i>Butanol/Acetic Acid/ Water</i> (Butanol/ cido acético/ água).
<b>BCG</b>	Vacina BCG, Bacilo Calmette-guiné.
<b>BGCs</b>	Em inglês : <i>biosynthetic gene clusters</i> (agrupamentos gnicos biossintticos)
<b>BuOH</b>	Butanol.
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada.
<b>CE</b>	Cultivo eliciado.
<b>CG- EM</b>	Cromatografia Gasosa acoplada  espectrometria de massas.
<b>CLAE-DAD</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficincia acoplada a detector de arranjos de diodo.
<b>CT</b>	Cultivo tradicional.
<b>DFC</b>	Dose fixa combinada.
<b>DNA</b>	Em ingls: <i>deoxyribonucleic acid</i> (cido desoxirribonucleico).
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido.
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferases.
<b>DNC</b>	Doença de Notificao Compulsória.
<b>DST</b>	Doença Sexualmente Transmissível.
<b>E</b>	Etambutol.

<b>EB</b>	Esquema básico.
<b>EEA</b>	Extrato etanólico de arroz.
<b>ESF</b>	Estratégia Saúde da Família.
<b>EM</b>	Espectrômetro de massas.
<b>Et</b>	Etionamida.
<b>EtOH</b>	Etanol.
<b>FE</b>	Fase estacionária.
<b>FM</b>	Fase móvel.
<b>H</b>	Isoniazida.
<b>HATs</b>	Histonas Acetiltransferases.
<b>HDAC</b>	Histonas desacetilases.
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana.
<b>HEX</b>	Hexano/ Hexânica.
<b>HPOA</b>	Ácido pirazinoico.
<b>ILTB</b>	Infecção latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
<b>LC-MS</b>	Em inglês: <i>Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas).
<b>LPBio</b>	Laboratório de Produtos Bioativos da UFRJ, campus Macaé.
<b>MBC</b>	Em inglês: <i>Minimum bactericidal concentration</i> (Concentração bactericida mínima).
<b>MRSA</b>	Em inglês: <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina) .
<b>MS</b>	Ministério da Saúde.
<b>MeOH</b>	Metanol.

<b>MIC</b>	Em inglês: <i>Minimum inhibitory concentration</i> (Concentração inibitória mínima).
<b>MOs</b>	Microrganismos.
<b>MT</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde.
<b>OSMAC</b>	“ <i>One strain - Many compounds</i> “ (Em português: Uma cepa - Muitos compostos).
<b>PAI</b>	Programa Ampliado de Imunização.
<b>PARNARJ</b>	Parque Nacional Restinga de Jurubatiba.
<b>PAS</b>	ácido paraminossalicílico.
<b>PDA</b>	Em inglês: <i>Potato Dextrose Agar</i> (Ágar Batata Dextrose).
<b>pH</b>	Símbolo do potencial hidrogeniônico.
<b>PN</b>	Produtos Naturais.
<b>PNCT</b>	Programa Nacional de Controle da Tuberculose.
<b>PPD</b>	<i>Protein Purified Derivative</i> (Em português: Derivado proteico purificado) .
<b>PT</b>	Prova tuberculina.
<b>rpm</b>	rotação por minuto.
<b>R</b>	Rifampicina.
<b>RNA</b>	Em inglês: <i>ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucléico).
<b>Rt</b>	Tempo de retenção.
<b>S</b>	Streptomomicina.
<b>SAHA</b>	Em inglês: <i>suberoylanilide hydroxamic acid</i> (ácido hidroxâmico de suberoilanilida).
<b>SBHA</b>	Em inglês: <i>Suberohydroxamic acid</i> ( ácido suberohidroxâmico).

<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde.
<b>TB</b>	Tuberculose.
<b>TB DR</b>	Tuberculose droga resistente.
<b>TB MDR</b>	Tuberculose multirresistente.
<b>TB RR</b>	Tuberculose resistente à rifampicina.
<b>TB- HIV</b>	Co-infecção por <i>M. tuberculosis</i> e HIV.
<b>TB3</b>	Código de uma das espécies de fungo isolado da planta <i>Tocoyena bullata</i> , oriunda do Parque Nacional Restinga de Jurubatiba.
<b>TDO</b>	Tratamento Diretamente Observado.
<b>TFA</b>	Em inglês: <i>Trifluoroacetic Acid</i> (Ácido trifluoroacético).
<b>TRM TB</b>	Teste rápido molecular de Tuberculose.
<b>TS</b>	Teste de sensibilidade.
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>UBS</b>	Unidade Básica de Saúde.
<b>UFC</b>	Unidade formadora de Colônia.
<b>XDR</b>	Em inglês: <i>extensively drug resistant</i> . Em português: Resistência extensiva às drogas.
<b>Z</b>	Pirazinamida.
<b>ZN</b>	Ziehl-Neelsen (Técnica de coloração).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1. Tuberculose .....	19
1.1.1. Histórico .....	19
1.1.2. Tuberculose hoje .....	24
1.1.3. Micobactérias .....	25
1.1.4. Transmissão da Tuberculose .....	25
1.1.5. Prevenção .....	26
1.1.6. Tratamento .....	26
1.1.7. Tuberculose Resistente .....	32
1.2. Produtos naturais como fonte de produtos bioativos .....	36
1.3. Microrganismos endofíticos .....	38
1.3.1. Produtos Naturais de Fungos Endofíticos .....	39
1.4. Estratégias biotecnológicas que induzem a produção de metabólitos secundários	41
1.4.1. Cocultivo .....	42
1.4.2. Modulação epigenética .....	42
1.4.3 Eliciação .....	44
1.4.3.1. Elicidores Bióticos .....	45
1.4.3.2. Elicidores Abióticos .....	45
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	46
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	47
3.1. Objetivo geral .....	47

3.2. Objetivos específicos .....	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1. MATERIAL</b> .....	<b>48</b>
4.1.1. Material biológico .....	48
4.1.2. Meio de cultura .....	48
4.1.3. Solventes .....	48
4.1.4. Equipamentos .....	49
4.1.5. Vidrarias .....	49
4.1.6. Outros .....	49
<b>4.2. MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.2.1. Preparo do meio de cultura .....	48
4.2.2. Preparo do lisado autoclavado de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	49
4.2.3. Inoculação do Fungo em diferentes condições de cultivo .....	50
4.2.4. Extração através de maceração estática .....	51
4.2.5. Fracionamento dos extratos: partição líquido-líquido .....	51
4.2.6. Análise do perfil químico através de técnicas analíticas .....	52
4.2.6.1. Cromatografia em camada delgada .....	52
4.2.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector arranjo de diodos (CLAE-DAD) .....	53
4.2.6.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas .....	54
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
5.1. Rendimentos dos extratos etanólicos brutos .....	54
5.2. Rendimentos dos fracionamentos por partição líquido-líquido .....	52
5.3. Cromatografia em Camada Delgada .....	55

5.3.1 Frações Hexânicas .....	55
5.3.2. Frações Acetato Etila .....	57
5.3.3. Frações Butanólicas .....	57
5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector Arranjo de Diodos .....	58
5.4.1. Frações Acetato de Etila .....	59
5.4.2. Frações Butanólicas .....	64
5.4.3 Frações Aquosas .....	67
5.5. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas .....	70
5.5.1. Frações Hexânicas .....	71
5.5.2. Frações Acetato de Etila .....	72
5.6. Substâncias encontradas .....	74
5.6.1. Ácidos graxos .....	74
5.6.2. Hidrocarbonetos lineares .....	75
5.6.3. Ésteres de silil .....	75
5.6.4. Organossulfurados .....	76
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>
<b>8. ANEXO I .....</b>	<b>89</b>
<b>9. ANEXO II .....</b>	<b>95</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Tuberculose

### 1.1.1. Histórico

A tuberculose é uma das doenças infecto contagiosas que mais mata no mundo, seu agente etiológico foi isolado pela primeira vez pelo bacteriologista alemão, Dr. Robert Koch (1843 -1910), que anunciou essa descoberta ao mundo, em 24 de março de 1882, Berlin. Através da publicação “*Die Aetiologie der Tuberkulose*” (Em português: A etiologia da tuberculose), onde demonstrou que um microrganismo era responsável por causar tanto a tuberculose pulmonar, quanto as formas extrapulmonares, o mesmo foi nomeado um ano depois como *Mycobacterium tuberculosis*. Esse foi o marco que deu início ao controle e eliminação dessa doença, por conta disso, 100 anos após o ocorrido, esse dia ficou conhecido como “*World TB day*” (Em português: Dia mundial da tuberculose) um dia para educar o público sobre o impacto da tuberculose ao redor do mundo (SAKULA, 1983; CAMBAU; DRANCOURT, 2014; CDC, 2016).

Em meados do século XIX, a tuberculose era a causa da morte entre 1 a cada 7 óbitos na Europa e nos Estados Unidos, em 1881, Koch apresentou a primeira cultura pura de bactéria, no 7<sup>a</sup> Congresso Médico Internacional, em Londres, onde recebeu críticas positivas, dentre elas, de Louis Pasteur (1822 - 1895) que exclamou: "*C'est un grand progrès, Monsieur!*" (Em português: É um grande progresso, senhor!). Após o congresso, Koch retornou a Berlim determinado a identificar o microrganismo causador da tuberculose, e obteve sucesso! Ao analisar amostras de lesões tuberculosas, observou que as mesmas não eram coradas facilmente pela coloração com álcool-azul de metileno desenvolvida por Weigert, em 1875, pois os bacilos da tuberculose só eram corados depois de um longo período em contato com o corante, cerca de 24 horas, hoje já se sabe que isso é devido à grande quantidade de ácido micólico em sua parede celular, o que confere uma característica álcool-ácido resistente, melhor discutida no item 1.1.3. Micobactérias (SAKULA, 1982; CAMBAU; DRANCOURT, 2014; WAGNER *et al.*, 2017) .

Diante disso, implementou um método inovador que foi capaz de isolar os bacilos da tuberculose e consistia em espalhar espécies infectadas por micobactérias em lamínulas, após fixação, as lamínulas foram submergidas em solução alcalina de etanol e azul de metileno aquecida, 40° C, por aproximadamente 1 hora. Então contracoradas com uma solução de Vesuvina (*Bismarck brown*) e enxaguadas com água destilada. Analisando no microscópio,

notou que os bacilos da tuberculose eram corados de azul brilhante, ao contrário de outras bactérias e tecidos animais, que eram corados de marrom. Através disso, provou que as diferentes formas da tuberculose eram causadas por um mesmo agente etiológico, e também o possibilitou a reprodução da doença em cobaias, porquinhos da índia, inoculadas experimentalmente, sendo que a descoberta lhe rendeu o prêmio Nobel de Medicina em 1905. E em sua homenagem, o *Mycobacterium tuberculosis* também é conhecido como Bacilo de Koch (SAKULA, 1983; VILCHÈZE; KREMER, 2017; MARTINI *et al.*, 2018).

Inspirado no trabalho de Koch, Paul Ehrlich (1854- 1915) criou um novo método para corar os Bacilos. Onde aplicou inicialmente, água de anilina, fucsina e violeta genciana, em um tempo menor de coloração e, para melhorar a descoloração dos tecidos ao redor dos tubérculos, aplicou também, ácido nítrico e álcool, além disso, descobriu por acidente os benefícios de aquecer a lamínula antes de observá-la em microscópio (BOIRE *et al.*, 2013). O novo método introduzido por Ehrlich serviu de base para o método criado por Ziehl e Neelsen (VALENTE *et al.*, 2016; The Nobel Prize, 2022) .

A coloração de Ziehl-Neelsen (ZN) e suas modificações têm sido ferramentas essenciais na descoberta de micobactérias (KRADIN, 2018). Trata-se de uma coloração desenvolvida para explorar a característica ácido resistente do gênero *Mycobacterium spp* (TANG *et al.*, 2015) .

Franz Ziehl (1857-1926) foi um bacteriologista alemão, e o primeiro a modificar o método de Ehrlich, em agosto de 1882, inseriu o fenol no lugar da anilina à técnica, fazendo com que a solução se tornasse mais estável. Pouco tempo depois, cientistas estudaram os benefícios de utilizar o fenol na técnica de coloração, demonstrando diferentes importâncias do ácido carbólico (Fenol) na solução, dentre elas temos que o mesmo aumenta a solubilidade da fucsina nos lipídeos da parede celular (SIQUEIRA *et al.*, 1983; SINGHAL; MYNEEDU, 2015).

Em sequência, temos novamente uma modificação no método de coloração do bacilo de Koch, dessa vez, pelo patologista alemão, Friedrich Neelsen (1854 -1898) , ele manteve o uso do fenol, introduzido por Ziehl, mas utilizou ácido sulfúrico no lugar do ácido nítrico, proposto por Koch. Neelsen publicou o método em 14 de julho de 1883, que consistia no uso de uma solução de fucsina 0,75 % em 5% de ácido carbólico (fenol), seguido de descoloração com uma solução de ácido sulfúrico 25% (VILCHÈZE; KREMER, 2017).

O método de coloração do bacilo da tuberculose levou cerca de 16 meses para ser padronizado, mas somente uma década depois, as modificações realizadas por Neelsen, o método “ *Acid-fast stain*”, foi amplamente reconhecido como método Ziehl- Neelsen de

coloração, e é importante relembrar os 5 cientistas mais importantes que colaboraram com esse trabalho, desde o Robert Koch, o primeiro a isolar o bacilo, até todos os responsáveis por modificar o método de coloração, até a mesma ser padronizada, sendo eles: Paul Ehrlich, Franz Ziehl, Rindfleisch (Sugeriu o aquecimento da lamínula, ao invés de utilizar um solução aquecida, proposta inicialmente por Koch), e Friedrich Neelsen (VILCHÈZE; KREMER, 2017).

A pesquisa continuou, após o isolamento do microrganismo, o enfoque do Dr. Robert Koch foi voltado na obtenção da cura para a doença. Em agosto de 1890, Koch anunciou dramaticamente que tinha descoberto a cura para a tuberculose e a comunidade científica da época se alegrou com a notícia, mas dentro de poucos meses, sua teoria foi refutada fazendo com que a reputação do bacteriologista ficasse manchada (BURKE, 1993).

A tão sonhada "cura" da tuberculose era uma proteína, denominada tuberculina, embora o objetivo de Koch fosse utilizá-la no tratamento de doenças causadas por *Mycobacterium* spp, como para a tuberculose e para lepra, a proteína é empregada até hoje para o diagnóstico (KAUFMANN, 2001; CAMBAU; DRANCOURT, 2014; DINC; ARIKAN, 2019).

No Brasil, a tuberculina é a PPD RT-23 (PPD – *Protein Purified Derivative*, RT: *Reset Tuberculin*, 23: número da partida) originada da Dinamarca, é utilizada para a investigação de infecção latente pelo *M. tuberculosis* em adultos, e para o diagnóstico de TB em crianças. Trata-se de um teste que se baseia em uma reação de hipersensibilidade cutânea após a aplicação da PPD por via intradérmica, a leitura deve ser feita entre 48-72h. Vale ressaltar que também é utilizada para diagnóstico em bovinos e búfalos (LÁU ,2006 ; BRASIL, 2014; DINC; ARIKAN, 2019). A descrição feita por Charles Mantoux (1877- 1947) sobre a reação intradérmica da tuberculina levou ao entendimento da imunologia e fisiopatologia da tuberculose (CAMBAU; DRANCOURT, 2014) .

O bacteriologista Francês, Léon Charles Albert Calmette (1863 –1933 ), auxiliou R. Koch durante a extração da tuberculina, de culturas em larga escala do bacilo. O mesmo trabalhou juntamente com Jean-Marie Camille Guérin (1872–1961), um médico veterinário e bacteriologista francês, em busca da vacina para a tuberculose, entre os anos de 1908 -1921, no Instituto Pasteur de Paris, França (CAMBAU; DRANCOURT, 2014).

Para a pesquisa, eles utilizaram uma cepa de *Mycobacterium bovis*, que havia sido isolada do leite de uma vaca que sofria de mastite tuberculosa. Ao seguir o método de atenuação de bactérias desenvolvido por Louis Pasteur, seu mentor, notaram que a bile bovina reduzia a aglomeração e a virulência da cepa de *M. bovis* isolada. Após cerca de 231

passagens seriadas, o bacilo atenuado ofereceu proteção em modelos animais, contra a tuberculose. Através da genômica, foi possível elucidar a região que fora deletada, por Calmette e Guérin, qual ficou conhecido como RD1 (*Region of Deletion 1* - Em português: Região de deleção 1), também demonstrou que essa região gênica é crucial na perda da virulência da cepa e também está presente no *Mycobacterium tuberculosis* (ABDALLAH; BEHR, 2017; FATIMA, 2020; LANGE, *et al*; 2021 ).

A imunização clínica com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) foi iniciada em 1921, os primeiros ensaios foram conduzido por Heimbech, entre estudantes de enfermagem, na Noruega, e concluiu-se que os alunos vacinados com o BCG tiveram menos taxas de tuberculose ativa do que os alunos que não foram vacinados (FATIMA, 2020).

Em 1940, temos ensaios clínicos sobre o papel protetor da vacina BCG na tuberculose infantil e, em 1960, a Organização Mundial da Saúde desenvolve estratégias para a vacinação de rotina da BCG na população, mas somente em 1974 a vacina é incluída no calendário de imunização infantil do Programa Ampliado de Imunização (PAI). Em 1977, a meta do PAI era ter imunizantes contra difteria, coqueluche, tétano, poliomielite, sarampo e tuberculose disponíveis para todas as crianças do mundo até 1990 (KEJA, 1988; FATIMA, 2020).

Na época que a vacina BCG foi descoberta ainda não existia um antibiótico de amplo espectro, capaz de atacar bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de bactérias ácido-resistentes. Esse cenário mudou em 1944, quando Selman Waksman descobriu a estreptomicina.

Selman Abraham Waksman (1888 -1973) foi um microbiologista, nascido na Ucrânia, que ficou conhecido pela sua brilhante descoberta, motivo pelo qual foi ganhador do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 1952 (The Nobel Prize, 2022).

Waksman estudava os microrganismos do solo, em 1923, ele notou que os ascomicetos tinham a capacidade de matar muitas bactérias, mas não deu muita importância na época. Anos se passaram, o microbiologista, incentivado pelo trabalho de outros, como pela descoberta da Penicilina, decidiu buscar antibióticos contra bactérias gram-negativas. Além desse incentivo, o Dr. Waksman também recebeu um pedido do conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos e da Associação Americana de Trudeau, para investigar a atividade de microrganismos do solo contra o bacilo de Koch (YAQUB, 2014).

Em 1939, Waksman inicia sua triagem, financiada pelo governo dos Estados Unidos, pela Universidade de Rutgers e por doações privadas. Sua equipe era formada por 50 graduados e assistentes, tinham como objetivo principal rastrear a atividade antimicrobiana de ascomicetos e outros microrganismos do solo. Até conseguirem isolar uma substância que não

fosse tóxica, o grupo testou 3 substâncias que ficaram conhecidas, a Actinomicina, isolada por Waksman e Boyd Woodruff, a segunda foi a Clavacin e a terceira a Fumagina. Ambas tóxicas, esse cenário mudou em 1943, quando Frederick Beaudette, um patologista, coletou amostras da garganta de uma galinha doente, com auxílio de um Swab, então inoculou o material em meio de cultura sólido de ágar, percebendo a presença de um microrganismo incomum, Beaudette envia a colônia para o Waksman, que o identificou como *Streptomyces griseus*, o mesmo microrganismo estudado por ele em 1916. Desse microrganismo, ele isolou a estreptomicina, a qual foi estudada pela sua equipe, e demonstraram que a substância conseguiu inibir o crescimento de 10 bactérias gram-positivas e 12 gram-negativas, incluindo o *Yersinia pestis*. Sua descoberta foi anunciada em janeiro de 1944 (LIGON-BORDEN, 2003).

O primeiro teste em humanos foi realizado em 1944, por William H. Feldman (1892-1974) e Horton Corwin Hinshaw (1902-2000), na clínica Mayo. A paciente era uma mulher contaminada com o Bacilo de Koch, a mesma foi tratada com extratos da bactéria *S. griseus* e teve uma evolução rápida do quadro, chegando a cura. Essa descoberta deu abertura para mais estudos e, conseqüentemente, para a descoberta de novos fármacos. Com a necessidade de prevenir a seleção de mutantes resistentes à droga, durante a monoterapia, foram empregados regimes de quimioterapia e multidrogas eficazes. Em 1946, inicia-se a triagem com administração de estreptomicina à paciente acamados. Em 1948, os fármacos estreptomicina e Ácido 4-aminosalicílico (PAS), quando administrados por monoterapia, não resultaram em melhora do quadro, mas quando administrados concomitantemente, havia uma melhora, então introduziu-se a politerapia. Entre os anos de 1952-1955, temos o estudo da isoniazida combinada com estreptomicina ou PAS, para tratar a tuberculose. Até 1959, observou-se a relação do tratamento em domicílio e a contaminação cruzada, e foi visto que a terapia administrada em casa tinha os mesmos efeitos que no sanatório e também não houve aumento da coinfeção familiar. Em 1958, tivemos o início do tratamento diretamente observado, ainda utilizado hoje. Em 1970, foram acrescentados pirazinamida e rifampicina ao tratamento com estreptomicina e isoniazida. Entre os anos de 1972-1974, foi demonstrado, através de estudo, que o tratamento poderia ser diminuído para 6 meses, quando administrados os 4 fármacos, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina (MIGLIORI *et al.* 2022).

### 1.1.2. Tuberculose hoje

Em março de 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose como uma emergência de saúde pública global, devido ao surgimento da tuberculose multidroga resistente e a epidemia do HIV (FATIMA, 2020).

Em 2015, a OMS lançou “*The End TB Strategy*”, e tem como objetivo a redução de 80% da incidência de TB, as mortes em 90%, além de diminuir os custos do tratamento, todos países, assim como o Brasil, têm até 2030 para atingir essa meta. Para isso, estabeleceram 3 pilares: O primeiro pilar, tem relação com medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento. O segundo pilar é voltado à políticas de prevenção e cuidado e o terceiro pilar, não menos importante, diz sobre intensificar a pesquisa e inovação (WHO, 2015).

Colaborando com essa estratégia, no Brasil, temos o Plano Nacional Pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública, publicado em 2017, mas sua primeira versão data de 1996, o qual visa um país sem tuberculose, mais recentemente foram publicadas estratégias para 2021-2025, intitulado como Brasil Livre de Tuberculose (BRASIL, 2021).

Em 2020, 1,5 milhão de pessoas morreram de tuberculose no mundo, sendo que 214.000 tiveram coinfeção com HIV. Até a pandemia do coronavírus (COVID-19), a tuberculose era a principal causa de morte no mundo por doenças infecciosas, com um agente etiológico, ficando acima do HIV/AIDs (WHO, 2021).

Estima-se que anualmente surgirão aproximadamente 10 milhões de novos casos de tuberculose no mundo, em 2020, a OMS notificou 9,9 milhões de novos casos, o Ministério da Saúde notificou, no Brasil, 66.819 novos casos de TB, o que equivale a um coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100 mil habitantes. A taxa de mortalidade obtida foi de 2,1% (BRASIL, 2021, WHO, 2021; KHAWBUNG *et al.*, 2021).

Em 2020, 68,5% dos casos de TB pulmonar confirmados por critério laboratorial encerraram o tratamento como cura, entretanto algumas regiões do Brasil obtiveram um percentual de cura menor do que o valor nacional, dentre elas, podemos citar as regiões: nordeste, centro-oeste e sul, que obtiveram 66,8 %, 60,3% e 63,2% respectivamente. Além disso, alguns tratamentos foram encerrados com Abandono (12,9%), esse valor é maior do que o limite tolerável de abandono estipulado pela OMS, que é de 5%, vale frisar que equivale ao percentual de abandono de TB sensível. Dessa forma, vemos a necessidade de implementar estratégias de conscientização sobre o tratamento adequado (BRASIL, 2021).

No Brasil, a tuberculose é uma doença de notificação compulsória semanal, ou seja, a contar 7 dias após o diagnóstico (não é necessário notificar casos suspeitos) de tuberculose,

essa informação deve ser comunicada à autoridade de saúde, a fim de adotar medidas de intervenção. No caso da tuberculose, a notificação é através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), onde serão notificados: novos casos, recidivas, reingressos após abandono, pós óbito e transferência, deve ser utilizado o formulário disponível no site da SINAN, qual é padronizado, o mesmo deve ser enviado em duas vias, com todos os campos preenchidos (BRASIL, 2015; BRASIL, 2020).

### **1.1.3. Micobactérias**

O gênero *Mycobacterium*, a qual pertence o Bacilo de Koch, possui 188 espécies, que incluem vários patógenos humanos importantes, sendo a espécie *tuberculosis* a principal causadora da tuberculose no homem, além de outras espécies ambientais. É composto por bacilos, ou seja, bactérias em forma de bastões, álcool-ácido resistentes, gram-positivas, pertencentes ao filo Actinobacteria, da ordem *Actinomycetales* (GUPTA, *et al.*, 2018; LPSN, 2022).

As micobactérias possuem um envelope rico em ácidos graxos, de cadeia carbônica longa, o que dificulta a entrada do fármaco dentro da célula e contribui para a resistência. O principal constituinte da parede celular, é o ácido micólico, mais a frente veremos, que é o alvo molecular do fármaco Isoniazida, pertencente ao EB. Além disso, essa característica hidrofóbica confere a esse gênero de bactéria a característica álcool-ácido resistente (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; FIOCRUZ, 2016; WAGNER *et al.*, 2017).

### **1.1.4. Transmissão da Tuberculose**

A doença afeta principalmente os pulmões dos indivíduos infectados, por ser sua porta de entrada no organismo, mas pode atingir outros órgãos, de acordo com o órgão acometido, pode ser denominada de tuberculose pulmonar ou extrapulmonar (cerca de 10-20% dos casos de TB ativa), como por exemplo a TB cutânea, representa somente 1,5 % dos casos de tuberculose no Brasil (TEIXEIRA, *et al.*, 2007; BRASIL 2022).

A transmissão da tuberculose é por meio da inalação de partículas aerossóis contendo o bacilo, de um indivíduo contaminado para um indivíduo suscetível, sem que haja contato, ou seja, transmissão direta. Ocorre em cascata e pode ser dividida em 5 etapas. A etapa zero inicia-se com um paciente que tem a doença ativa, já relacionaram as diferentes formas da tuberculose e a capacidade do indivíduo transmitir o bacilo, dessa forma observaram que o paciente que desenvolve a forma pulmonar possui maior virulência do que quando desenvolve as outras formas. A etapa 1, é quando os bacilos são liberados no ar, isso pode ocorrer através

da fala, tosse, espirro, etc. A etapa 2, refere-se à sobrevivência do bacilo no ar. A 3ª etapa é onde ocorre a exposição do indivíduo as partículas aerossóis contaminadas pelo bacilo, e por fim, a etapa 4, o desenvolvimento da doença. Estima-se que 10-15% das pessoas expostas desenvolvem a doença, uma vez com a forma ativa, esse paciente torna-se o ponto zero, onde pode contaminar cerca de 15 pessoas, de seu convívio social, anualmente (BRASIL, 2007; CHURCHYARD, 2017).

#### **1.1.5.Prevenção**

Hoje a melhor forma de prevenir a tuberculose é através da vacinação que protege o indivíduo contra o agravamento da infecção, sendo a forma pulmonar a mais letal. Além disso, uma forma de prevenir é conscientizar o indivíduo sobre as chances de transmissão e quais medidas adotar para não transmitir a bactéria para outras pessoas (BRASIL, 2022; CHO, *et al.*, 2021).

A vacina BCG, Bacilo Calmette-Guérin, é ofertada pelo Sistema Único de Saúde, faz parte do Plano Nacional de Imunização (PNI), onde o recém nascido recebe uma dose única logo que nasce, a mesma protege o indivíduo das formas mais graves da tuberculose, como a tuberculose meníngea. Em casos onde a criança não recebe ao nascer, é recomendado a administração da dose até 4 anos, 11 meses e 29 dias (BRASIL, 2012; BRASIL, 2022).

Outra forma de prevenção é através do tratamento da infecção latente da tuberculose (ILTb), evitando o desenvolvimento da tuberculose ativa, deve ser feito rastreamento em domicílios onde ocorre o contato com pessoas infectadas, principalmente em crianças. Também é necessário esse rastreamento em indivíduos imunossuprimidos, como por exemplo os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRASIL, 2022). Nos itens 1.1.6. Tratamento e 1.1.7. Tuberculose resistente, esse tema será abordado com mais detalhes sobre a quimioterapia que deve ser adotada.

No município de Macaé, o rastreamento da tuberculose é realizado pela Atenção Básica de Saúde, através de demandas espontâneas, quando relata-se sintomática respiratória por mais de 3 semanas. Onde temos: 1- Coleta das amostras para análise de baciloscopia de escarro. 2- Baciloscopia positiva - Inicia-se o tratamento, é realizada a notificação para o SINAN, dentro de 7 dias, seguir o fluxograma de consultadas para casos confirmados de Tuberculose ou 3- Baciloscopia negativa com suspeitas - Encaminhar paciente para investigar a causa dos sintomas respiratórios (MACAÉ, 2020).

### 1.1.6. Tratamento

A tuberculose possui tratamento e muitas das vezes o paciente consegue obter a cura, mas é imprescindível que o tratamento seja realizado de forma adequada, caso contrário, podem ocorrer seleção de cepas mutantes, levando a uma resistência adquirida, assim como caso de recidivas (BRASIL, 2019).

Os fatores limitantes, em relação ao tratamento da tuberculose hoje, tem relação com o tempo de duração, cerca de seis meses, além dos efeitos adversos que o paciente sofre, esses serão citados mais adiante. Além disso, existe uma falsa sensação de cura, onde o paciente tem uma melhora do quadro clínico em 100%, após o primeiro mês do tratamento, por conta disso, interrompe o tratamento, quando na verdade, a infecção só está assintomática (BRASIL, 2019).

No Brasil, o tratamento da tuberculose segue o mesmo método descrito pela OMS em 1958, o Tratamento Diretamente Observado (TDO), como o próprio nome diz, o paciente será observado durante a ingestão da terapia medicamentosa, em todos os dias úteis ou pelo menos 3 vezes na semana, e tem como objetivo principal melhorar a adesão do paciente. Aos finais de semana e feriados, o paciente realizará a automedicação, sem a presença de um agente da saúde, mas o mesmo deve esclarecer a importância da necessidade de tomar os medicamentos todos os dias. O local onde ocorrerá o TDO fica a critério do paciente, podendo ser à domicílio, em unidades de saúde, como estratégia saúde da família (ESF), unidade básica de saúde (UBS), entre outros. Além disso, também pode ser compartilhado, ou seja, o paciente realiza consulta em um local, mas o tratamento da tuberculose ocorre em outro, neste caso é importante o compartilhamento de informações entre ambos (BRASIL, 2019; MIGLIORI *et al.* 2022).

Em relação aos fármacos, propriamente dito, o ministério da saúde os divide em 5 grupos, que são novamente divididos em fármacos essenciais e fármacos acompanhantes. O grupo 1 é composto pelos fármacos essenciais: Isoniazida, pirazinamida e rifampicina e pelo fármaco acompanhante, o etambutol. No grupo 2, os fármacos essenciais são as fluoroquinolonas, como levofloxacino e moxifloxacino. No grupo 3, temos os fármacos essenciais injetáveis, como: Estreptomicina, canamicina, amicacina e capreomicina. O grupo 4 é composto pelos fármacos de segunda linha menos eficazes, como: Etionamida/protionamida, cicloserina/terizidona e PAS (ácido paraminossalicílico) e por fim, o grupo 5, com fármacos de segunda linha que possuem menos estudos clínicos, como: Clofazimina, carbapenem, amoxicilina/clavulanato de potássio (BRASIL, 2019).

O EB inclui os fármacos de primeira linha, que podemos ver na tabela 1, é utilizado para todos os casos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, assim como em caso de recidivas e pós-abandono (É considerado como caso de abandono, todo paciente que não comparecer às unidades de serviço de saúde durante um período superior à 30 dias), sendo exceção os casos onde temos meningoencefalite. A administração dos fármacos citados é através de comprimidos de dose fixa combinada (DFC), consiste em um tratamento inicial, de dois meses, chamado de fase intensiva, onde o paciente recebe o DFC composto por Rifampicina (R ), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E), seguidos de 4 meses, fase de manutenção, onde o DFC é composto somente pelos fármacos RH. No caso do paciente com tuberculose meningoencefalite e osteoarticular, também é utilizado corticoides, como prednisona e dexametasona, além disso, a fase de manutenção é estendida de 4 para 7 meses (RABAHI *et al.*, 2017; BRASIL, 2019).

**Tabela 1: Esquema básico para o tratamento de tuberculose em adultos e adolescentes (≥ 10 anos)**

ESQUEMA	PESO	UNIDADE / DOSE	DURAÇÃO
<b>R H Z E</b> 150 /75 /400 /275 mg em comprimidos de Doses Fixas Combinadas (DFC)	10 - 35 kg.	2 comprimidos	2 meses - Fase intensiva
	36 - 50 kg.	3 comprimidos	
	51 - 70 kg.	4 comprimidos	
	> 70 kg.	5 comprimidos	
<b>R H</b> 300/ 150 mg (A)ou 150/ 75 mg (B) Comprimidos DFC	10 - 35 kg.	1 comprimido A 2 comprimidos B	4 meses - Fase de manutenção
	36 - 50 kg.	1 cp. A + 1 cp. B ou 3 cp. B.	
	51 - 70 kg.	2 cp. A ou 4 cp. B	
	> 70 kg.	2 cp. A + 1 cp. B ou 5 cp. B	

**R**- Rifampicina, **H**- Isoniazida, **E**- Etambutol, e **Z** - Pirazinamida.

**cp.** comprimido.

Fonte: Tabela baseada em BRASIL, 2022.

Em relação ao mecanismo de ação dos fármacos de primeira linha para o tratamento da tuberculose, temos:

a- Rifampicina:

A rifampicina, cuja estrutura está ilustrada na tabela 2, é um antibiótico de amplo espectro, foi introduzida no tratamento da tuberculose em 1966, possui atividade contra cepas

gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, contra algumas gram negativas, como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenza*, entre outras. Seu mecanismo de ação é através da inibição da enzima RNA polimerase de bactérias, entretanto não é capaz de inibir esta enzima de mamíferos, dessa forma impede a síntese do ácido ribonucleico, sua interação ocorre na subunidade beta da RNA polimerase. Seu principal efeito adverso é o distúrbio gastrointestinal. Com intuito de evitar o surgimento de resistência antimicobacteriana, é importante que esse medicamento seja administrado em combinação com outros (GODEL; MARCHOU, 2007; FIOCRUZ, 2016; ABULFATHI, 2019; LARB, 2020).

#### b- Isoniazida:

A isoniazida (Tabela 2) é um pró-fármaco que precisa ser ativado pela enzima catalase/peroxidase do *M. tuberculosis*, uma vez ativado produz espécies radiculares que impedem a formação do ácido micólico, importante componente da parede celular da bactéria, causa dano ao material genético e conseqüentemente, a morte do microrganismo. Entre seus efeitos adversos, podemos citar: febre, irritação gástrica (náusea, vômito), dor abdominal, artralgia ou artrite (recomenda-se a administração de ácido acetilsalicílico nestes casos), prurido cutânea (medicar com anti-histamínico) (BRASIL, 2002; ARBEX *et al.*, 2010; FIOCRUZ, 2016).

#### c- Pirazinamida:

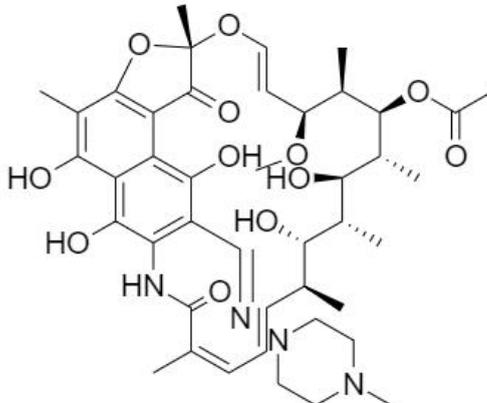
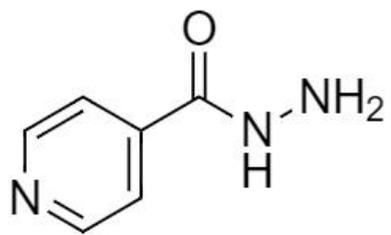
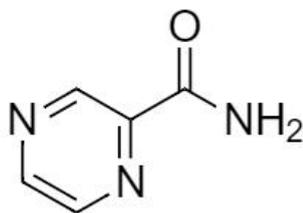
A pirazinamida é um fármaco derivado do ácido nicotínico, e possui estrutura similar à isoniazida, como podemos ver na Tabela 2. O mecanismo de ação mais aceito, descreve a pirazinamida como um pró-fármaco, pois a mesma precisa ser convertida a ácido pirazinóico para ter ação. Para isso, primeiramente, a pirazinamida é convertida em ânion de ácido pirazinóico, pela enzima pirazinamidase da bactéria, então o mesmo é excretado através de lisossomo, que possui o pH ácido, então convertido em ácido pirazinóico (HPOA), que retorna para o citoplasma causando acidificação, o que altera o potencial da membrana, induzindo a morte do bacilo. Possui efeitos adversos e condutas similares as do fármaco isoniazida, com exceção da hiperuricemia, acompanhada de sintomas ou não, a conduta recomendada nesse caso, é fazer uma orientação dietética, vale ressaltar que altas doses de ácido úrico no sangue pode levar a um quadro de gota (LIMA *et al.*, 2011; FIOCRUZ, 2016).

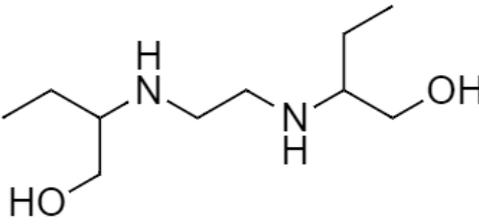
#### d- Etambutol:

O etambutol também pertence a linha de primeira escolha para o tratamento de tuberculose, é um fármaco bacteriostático, tem como alvo a membrana celular da bactéria. Onde ele atua inibindo a síntese de um ou mais metabólitos do microrganismo, levando a morte celular. Seus efeitos adversos podem estar relacionados a dores de cabeça, neuropatia periférica, hiperuricemia, assim como com a pirazinamida, além de poder desencadear problemas visuais, por conta disso, deve ser feito exame oftalmológico antes e durante o tratamento. O etambutol, no esquema básico, é usado para prevenir a resistência, uma vez que conseguiu reduzir a resistência primária relacionada a isoniazida e rifampicina em estudos clínicos (LIMA *et al.*, 2011; DALCOLMO, 2012; XIANG *et al.*, 2020; FIOCRUZ, 2016).

Como em todo tratamento contínuo, devem ser realizados exames para avaliar as funções dos órgãos, como do sistema renal, hepático e hematopoiético. Também é importante realizar ajuste de dose para pacientes que possuem problemas renais, uma vez que a mesma é a principal via de excreção do etambutol (FIOCRUZ, 2016).

**Tabela 2: Estrutura dos fármacos do Esquema básico e mecanismo de ação.**

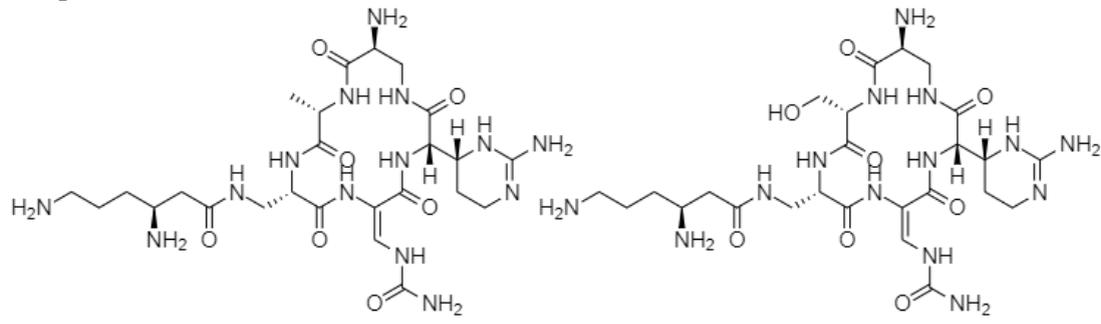
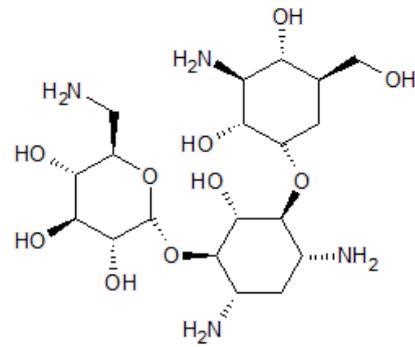
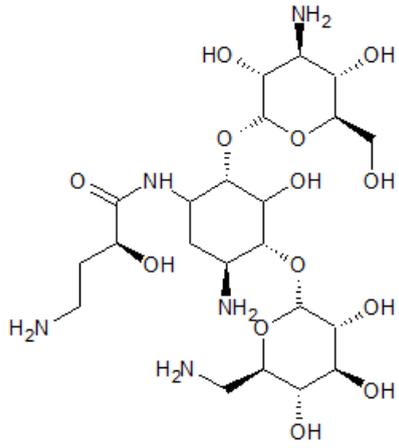
Nome do fármaco	Estrutura 2D	Mecanismo de ação
Rifampicina	 <p>The image shows the chemical structure of Rifampicin, a complex molecule consisting of a rifamycin core with a side chain containing a piperazine ring and a methyl group.</p>	Inibição da enzima RNA polimerase (FIOCRUZ, 2016).
Isoniazida	 <p>The image shows the chemical structure of Isoniazid, which consists of a pyridine ring attached to a hydrazide group (-CONHNH2).</p>	Inibição da síntese do ácido micólico (FIOCRUZ, 2016).
Pirazinamida	 <p>The image shows the chemical structure of Pyrazinamide, which consists of a pyrazine ring attached to an amide group (-CONH2).</p>	Acidificação do citoplasma (LIMA <i>et al.</i> , 2011).

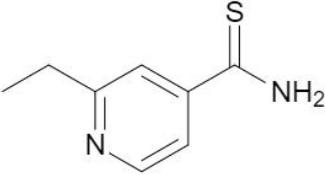
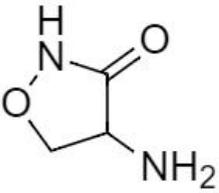
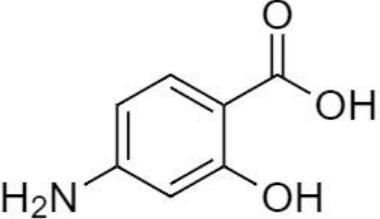
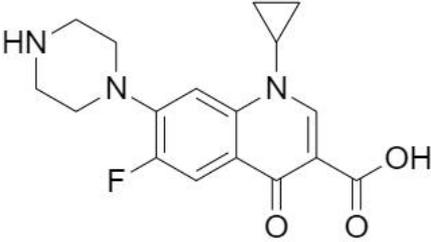
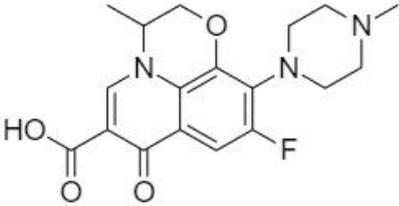
Etambutol		Inibição da síntese de metabólitos (FIOCRUZ, 2016).
-----------	--	---

\*Estruturas criadas no *software ChemDraw*®.

Além dos fármacos de primeira linha, também existem os fármacos de segunda linha, onde suas estruturas químicas estão ilustradas na Tabela 3. Esses fármacos são utilizados em casos especiais, onde há resistência ou alguma intolerância a um ou mais fármacos do esquema básico (EB), como será discutido no item seguinte.

**Tabela 3 Estrutura química dos principais fármacos de segunda linha para o tratamento de tuberculose.**

<p><b>1 Capreomicina</b></p> 	
<p><b>2 Canamicina</b></p> 	<p><b>3 Amicacina</b></p> 

<p><b>4 Etionamida</b></p> 	<p><b>5 Cicloserina</b></p> 
<p><b>6 Para-aminosalicílico (PAS)</b></p> 	<p><b>7 Ciprofloxacino</b></p> 
<p><b>8 Ofloxacino</b></p> 	

Fonte: Adaptado de LIMA, *et al.* 2011.

\*Estruturas by ChemDraw<sup>®</sup> (1, 4-8) e Chemskech<sup>®</sup> (2 e 3).

### 1.1.7. Tuberculose Resistente

Os maiores desafios hoje, em relação ao controle da doença no mundo, são 1- Tratamento da tuberculose droga resistente (TB DR), sendo as principais a tuberculose multirresistente (TB MDR) e a tuberculose resistência extensiva (TB XDR), 2- Tratamento do paciente com tuberculose em associação com HIV. Ambos necessitam de um esquema especial de tratamento, e além disso, justificam a necessidade pela busca de uma terapia mais eficiente e com menos efeitos adversos (DALCOLMO, 2012; BRASIL, 2019).

Como já citado anteriormente, a atenção primária é a “porta de entrada” para o paciente com tuberculose, onde ele receberá o esquema básico, mas em casos mais complexos de tuberculose, como a tuberculose resistente, o paciente deve ser encaminhado a atenção secundária ou a atenção terciária. Sendo que, a atenção secundária é responsável por atender: co-infecção HIV-TB; pacientes com reações adversas ao tratamento, como por exemplo: hepatotoxicidade, por outro lado a atenção terciária é voltada ao cuidado do paciente

infectado por uma linhagem que não responde ao esquema básico, assim como aqueles que desenvolvem as formas mais graves da doença (Bartholomay *et al.*, 2016).

O Ministério da Saúde (MS) classifica a tuberculose droga resistente de duas formas, a primeira é em relação ao microrganismo e a segunda diz respeito ao fármaco, dessa forma temos:

1- Resistência Natural: Como o próprio nome diz, é obtida naturalmente através do processo de multiplicação do microrganismo (BRASIL, 2011).

2- Resistência Primária: Trata-se do paciente que foi infectado com um bacilo resistente (BRASIL, 2011).

3- Resistência Secundária ou adquirida: Trata-se de um paciente que foi infectado com um bacilo sensível, mas após um período o mesmo para de responder ao tratamento, tornando-se resistente. A principal causa dessa resistência é a interrupção do tratamento (BRASIL, 2011).

Classificação de acordo com os fármacos:

a- Mono resistência: O bacilo é resistente a apenas um fármaco do EB (BRASIL, 2011).

Após a comprovação da resistência, devem ser feitas alterações no EB. Por exemplo: Se o bacilo for resistente a rifampicina (TR RR), o paciente receberá, durante os dois meses da fase intensiva, uma combinação dos fármacos HZES, e a fase de manutenção será prolongada para 10 meses, onde serão administrados os fármacos HE. Por outro lado, se o paciente for contaminado com uma cepa resistente a Isoniazida, o tratamento intensivo terá como politerapia os seguintes fármacos: rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina. Já na fase de manutenção, será administrado somente rifampicina e etambutol (BRASIL, 2011\*).

b- Poliressistência: O bacilo é resistente à dois fármacos anti TB, exceto a associação RH (BRASIL, 2011).

c- Multirresistência (MDR) : Resistência à combinação RH. Essas cepas são motivos de muita preocupação, pois contribuem para o aumento do número de mortes por TB e estão frequentemente associadas aos casos de TB com HIV (BRASIL, 2011; ROSETTI *et al.*, 2002).

d- Resistência Extensiva (XDR - em inglês: *extensively drug resistant* ): Além da resistência à combinação RH, o bacilo também é resistente a pelo menos uma fluoroquinolona e a um injetável de segunda linha (BRASIL, 2011).

Os medicamentos utilizados para os casos de tuberculose RR, MDR e XDR estão descritos na tabela 4, o tempo de duração do tratamento é maior do que o utilizado no esquema básico, sendo este de cerca de 18 meses. No caso da TB RR e MDR, recomenda-se o uso do fármaco estreptomicina (S), somente após teste de sensibilidade (TS), se o paciente nunca fez o uso do mesmo anteriormente. Se o paciente já fez o uso ou, se o TS é ausente, o fármaco S não deve ser adotado no esquema especial de tratamento (BRASIL, 2011).

**Tabela 4: Medicamentos que podem ser utilizados para tratar TB MDR, TB XDR e TB , disponíveis no SUS.**

GRUPOS		MEDICAMENTOS
<b>Grupo A</b> Fluoroquinolonas	TB MDR - Pelo menos uma fluoroquinolona.	Levofloxacino
		Moxifloxacino
<b>Grupo B</b> Injetáveis (INJ) de segunda linha	TB MDR - usar 1 INJ e, pelo menos, 4 novos fármacos (nunca usados antes no tratamento do paciente).	Amicacina
		Capreomicina
		Estreptomicina*
<b>Grupo D</b> Fármacos Adicionais	<b>Grupo D1</b> - Paciente com Tuberculose (TB) resistente que só foi tratado anteriormente com medicamentos do esquema básico (EB).	<b>D1</b>
		Pirazinamida
		Etambutol
		Isoniazida em altas doses
	<b>Grupo D2 e D3</b> - Grupo de fármacos reservados para caso onde não é possível associar 4 novos fármacos na composição esquema ou quando houver a possibilidade de resistência cruzada entre fluoroquinolonas e os injetáveis de segunda linha.	<b>D2</b> - Não estão disponíveis no Brasil.
		<b>D3</b>
		Ácido paraminossalicílico
		Imipenem-cilastatina <sup>4</sup> (disponível localmente)
		Meropenem <sup>4</sup> (disponível localmente)
		Amoxicilina + clavulanato de potássio (disponível localmente)

\* A estreptomicina é um fármaco anti TB de primeira linha, por conta disso, não poderá ser prescrita para pacientes com TB XDR<sup>1</sup>, sendo condicionada apenas aos pacientes com TB MDR<sup>2</sup> e TB RR<sup>3</sup>, desde que não tenham feito uso anteriormente e apresenta resultados positivos no Teste de Sensibilidade.

<sup>1</sup> TB XDR - Tuberculose com resistência extensiva às drogas;

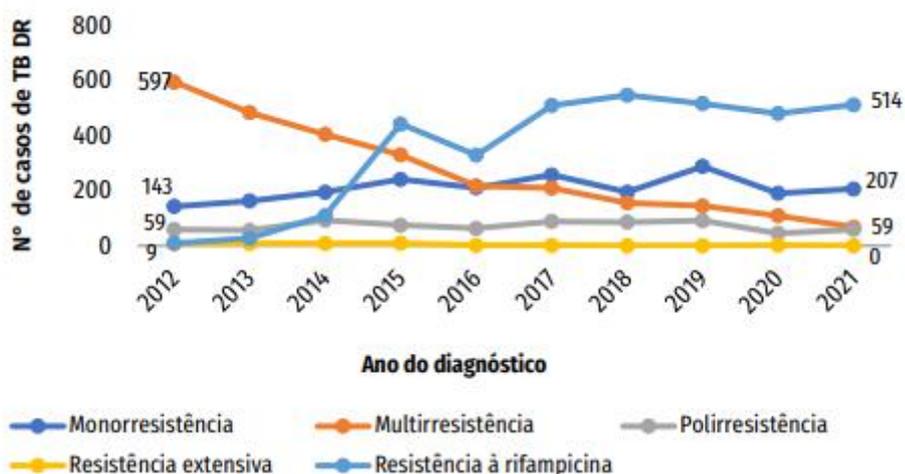
<sup>2</sup> TB MDR - Tuberculose multidroga resistente.

<sup>3</sup> TB RR - Tuberculose resistente à rifampicina

<sup>4</sup> O uso de carbapenêmicos e clavulanato de potássio (associado com amoxicilina) sempre devem ser em conjunto.

Fonte: Tabela baseada no Manual de recomendações para o controle de tuberculose. MS, 2019.

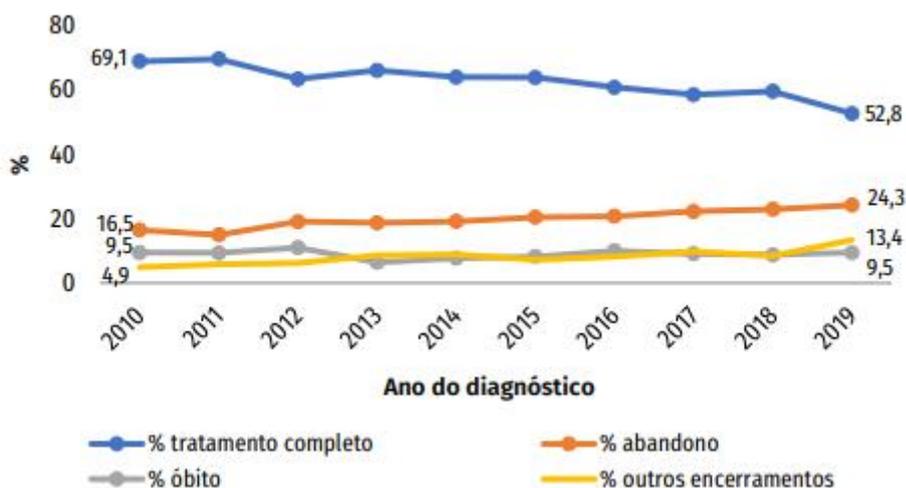
O Boletim Epidemiológico da Tuberculose, 2022, relatou que entre os anos de 2015 - 2021 foram relatados cerca de 6.698 novos casos de TB DR no país, sendo que 97,8% apresentaram a forma pulmonar, 848 casos TB DR foram diagnosticados em 2021. A figura 1 ilustra os casos diagnosticados de tuberculose resistente no Brasil, também ressalta que após a implementação do Teste rápido molecular de Tuberculose (TRM TB), em 2015, houve uma melhora no diagnóstico dos casos de TB DR, demonstrando a importância da utilização de uma terapia adequada e do uso de TRM TB no diagnóstico de novos casos (BRASIL, 2022).



**Figura 1: Dados preliminares sobre o padrão de resistência inicial dos casos de tuberculose no Brasil, 2012 a 2021.**

Fonte: MS, 2022.

Em relação ao desfecho do tratamento de tuberculose resistente à rifampicina, nos últimos anos vemos um aumento em relação ao percentual de abandono, outros encerramentos e óbitos, além de uma diminuição do percentual de tratamento completo, figura 2 (BRASIL, 2022).



**Figura 2: Desfecho do tratamento de TB MDR e TB RR no Brasil, entre os anos de 2010- 2019.**  
 Fonte: MS, 2022.

Ilustrando a necessidade por uma terapia que cause menos efeitos adversos ao paciente, seja capaz de tratar essas novas linhagens resistentes aos tratamentos existentes, e além disso, que tenha um período de tratamento mais curto. Ademais, os produtos naturais podem ser o caminho para solucionar esse problema, especialmente através do estudo de microrganismos, os quais são fontes promissoras na busca de produtos bioativos, sobretudo com atividade antimicrobacteriana e antitumoral (BRASIL, 2022; MOORE *et al.*, 2017).

## 1.2.PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE PRODUTOS BIOATIVOS

Os produtos naturais são fontes para a obtenção de moléculas produzidas por organismos vivos, as quais possuem uma alta diversidade estrutural e atividades biológicas ou farmacológicas, devido à seleção natural e aos processos evolutivos. Além disso, essa diversidade estrutural excede a capacidade dos compostos orgânicos sintetizados dentro do laboratório, por conta disso, são muito utilizados na medicina tradicional e moderna para o tratamento de doenças (ABOZENADAH *et al.* 2017).

Para a indústria farmacêutica são uma das fontes principais para a descoberta de substâncias com atividade biológica, sendo utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos. Especialmente os derivados de microrganismos, os quais ocupam um importante lugar histórico na descoberta e no desenvolvimento de fármacos (WRIGHT, 2017; XUE *et al.*, 2022).

Pasteur deu início a investigação de microrganismo como fonte para a busca de produtos bioativos através da sua descoberta sobre os processos fermentativos. Posteriormente, a descoberta da penicilina também impulsionou os estudos com

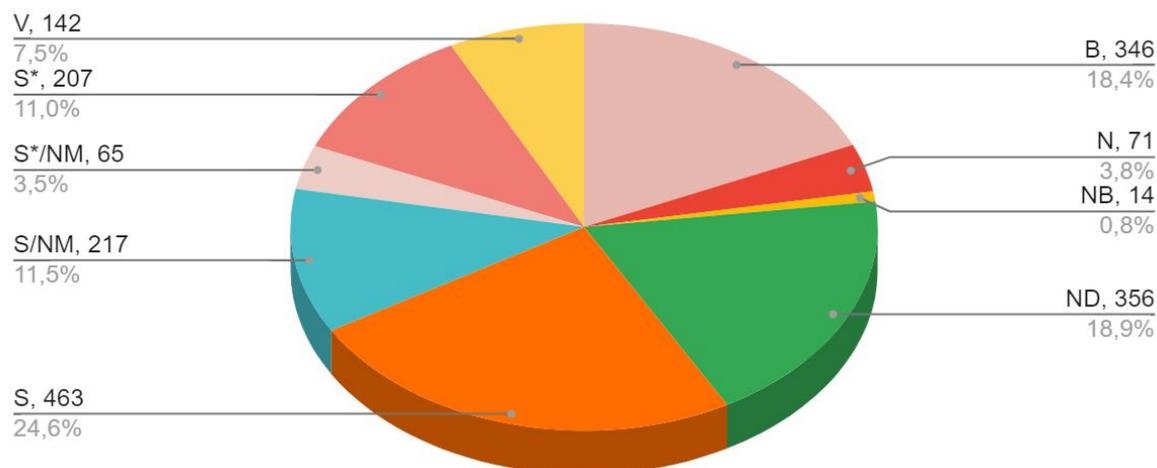
microrganismos, além de ser o marco que deu início à "era de ouro" na descoberta de antibióticos, como são conhecidos os anos de 1940-1960 (STROBEL *et al*, 2004).

Entretanto, após a descoberta da estreptomicina, que foi isolada em 1944, do *Streptomyces griseus*, um microrganismo encontrado no solo, uma busca mundial foi iniciada. Onde todos os esforços estavam direcionados ao estudo dos microrganismos do solo de todos os cantos do globo, embora os recursos fossem limitados na época, a farmacêutica Eli Lilly pede aos missionários cristãos para que enviassem uma amostra de solo de cada lugar exótico que eles visitassem, e em 1952, uma amostra do Bornéu (Ilha do Sudeste Asiático) foi analisada, e dela cresceu o *Streptomyces orientalis*, desse microrganismo foi extraída a vancomicina, qual ficou disponível para uso em pacientes a partir de 1958 e é utilizada atualmente para tratar infecções graves causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à beta lactâmicos (GOULD, 2016; WRIGHT, 2017).

Apesar de ser um tema muito alarmante ainda hoje para a saúde mundial, nessa época a resistência antimicrobiana já estava presente, se tornando cada vez mais evidente, onde vimos, por exemplo o uso de politerapia para o tratamento de TB, com intuito de evitar a seleção natural de cepas mutantes. Em 1959, ocorreu a descoberta do primeiro antibiótico beta lactâmico resistente à penicilinase, a meticilina, por Beecham (GOULD, 2016; MIGLIORI *et al.*, 2022).

Um estudo de revisão feito por Newman e Cragg, entre janeiro de 1981 a setembro de 2019, demonstrou a importância do uso de produtos naturais na busca e desenvolvimento de novos medicamentos. De todos os fármacos aprovados entre janeiro de 1981 a setembro de 2019, 3,8% são exclusivamente produtos naturais (n=1881), 0,8% droga vegetal, 18,9% derivados de produtos naturais, 11% produtos sintéticos derivados de produtos naturais, 3,5% possuem farmacóforo de PN, 7,5% são vacinas e somente 24,6% totalmente sintéticos, como ilustra o gráfico 1. Em relação aos antibióticos, relataram que dos 162 aprovados, 4 (2,5%) eram biológicos, ou seja, peptídeos ou proteínas isoladas de organismos ou fragmentos celulares, assim como produzidos biotecnologicamente, 11 (6,8%) são produtos naturais, 78 (48,14%) são derivados de produtos naturais; 36 (22,20%) são drogas totalmente sintéticas, 1 (0,61%) é uma droga sintética, porém seu farmacóforo é um produto natural e 32 (19,75%) são vacinas (NEWMAN; CRAGG, 2020).

## Origem dos medicamentos aprovados entre janeiro de 1981 e setembro de 2019



**Gráfico 1: Relação quanto a origem dos medicamentos aprovados entre janeiro de 1981 e setembro de 2019.**

B= Macromoléculas biológicas; N= Produto Natural; NB= Droga vegetal; S= Sintético; S/NM = Sintético/ Mimetiza produto natural; S\* = Sintético (Farmacóforo de produto natural);\*S/NM - Sintético Mimetiza produto natural e farmacóforo de produto natural; ND= Derivados de produtos naturais; V = Vacinas.

Fonte: Baseado em Newman; Cragg, 2020.

### 1.3. Microrganismos endofíticos

A primeira definição de microrganismos endofíticos foi feita por De Bary, em 1886, que os definiu como microrganismos que colonizam o interior do tecido vegetal e diferem dos epífitos, microrganismos que vivem na superfície do tecido vegetal. Após 100 anos, Carroll (1986) propôs uma nova definição para esses microrganismos, Microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior do tecido vegetal, sem lhe causar danos visíveis, e mantém uma relação mutualística com a planta, dessa forma foram excluídos os microrganismos patogênicos. Em 1991, Petrini complementou a definição de Carroll, definindo os endofíticos como aqueles que colonizam o interior do tecido vegetal, em algum momento do seu ciclo de vida, sem causar infecção sintomática na planta, dessa forma, patógenos latentes também são classificados como endófitos, ocupando regiões intra e intercelular (UNTERSEHER; SCHNITTLER, 2010; RIBEIRO; PAMPHILE, 2017; XIA *et al.* 2022).

Dentro da classificação de microrganismos endofíticos, podemos encontrar fungos e bactérias, onde sua associação pode ser obrigatória ou facultativa e exibem interações complexas com o hospedeiro, que envolvem mutualismo. Esses microrganismos produzem diversos compostos que promovem o crescimento da planta e as ajudam a se adaptarem

melhor no meio ambiente, de forma a manter a relação simbiótica estável (NAIR; PADMAWATHY, 2014).

Essas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, e não são essenciais para a sobrevivência do microrganismo, mas desempenham papéis importantes na defesa do vegetal contra estresses bióticos e abióticos. Já foram relatados diversas classes de metabólitos secundários produzidos por esses MOs, como alcaloides, flavonoides, compostos fenólicos, terpenoides, policetídeos entre outros, os quais são utilizados para tratar doenças humanas, como câncer, infecções fúngicas e bacterianas, entre outras (RAIME; ADELEKE, 2021).

Os endófitos podem ser encontrados em qualquer parte interna da planta, em relação a ocorrência da infecção assintomática, existe uma classificação que os diferencia, em endófitos verdadeiros, aqueles que são transmitidos verticalmente, ou seja, através das sementes de uma planta para outra e nunca irão aparecer fora do tecido vegetal. Por outro lado, a maioria dos endofíticos são transmitidos horizontalmente, através de esporos aéreos, e portanto, são definidos como não verdadeiros, uma vez que também podem ser encontrados fora do tecido vegetal (HARTLEY; GANGE, 2009).

Pesquisas com endofíticos são vantajosas, uma vez que os compostos bioativos de origem natural possuem estruturas químicas complexas, o que dificulta sua síntese através de reações químicas. Dessa forma, se faz necessário conhecer melhor sobre a importância e o papel deles na natureza (NAIR; PADMAWATHY, 2014).

Os endofíticos e as plantas hospedeiras possuem um relacionamento harmonioso que é benéfico para ambos. Uma forma de explorar os diversos componentes bioativos desses microrganismos é entendendo as interações do endófito com a planta, mas além disso, também se faz necessário conhecer mais sobre as interações entre microrganismos endofíticos e outros organismos vivos, como com o meio ambiente. Uma vez que todas essas interações são relevantes na produção dos metabólitos secundários (RAIME; ADELEKE, 2021).

### **1.3.1. Produtos naturais de fungos endofíticos**

Fungos endofíticos são promissores na busca de novas substâncias bioativas. Geralmente, são os microrganismos endofíticos mais isolados. Costumam aparecer como filamentos finos crescendo a partir do material vegetal na superfície do meio sólido de ágar, os comumente isolados são do grupo *Fungi imperfecti*, ou seja, aqueles que não possuem estado sexual conhecido em seu ciclo de vida, se reproduzem apenas através da

multiplicação dos esporos por mitose (VOLK, 2001; STROBEL *et al.*, 2004; ALY *et al.*, 2013).

O número de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos é maior do que comparado a outras classes de endófitos, provavelmente, uma consequência em se isolar mais fungos de plantas do que outros microrganismos. Os produtos naturais de fungos endofíticos possuem um amplo espectro de atividade biológica, e são encontrados metabólitos secundários de diferentes classes, como: alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quininas, fenilpropanoides, lignanas, ácido fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, entre outros (ZHANG *et al.*, 2006; QIU *et al.*, 2010).

Uma das maiores descobertas na terapia do câncer, foi o Paclitaxel, originalmente produzido pela planta *Taxus brevifolia*. Posteriormente, conseguiram isolar essa substância de um fungo endofítico da planta, ademais cerca de 200 fungos endofíticos, pertencentes a mais de 40 gêneros, já foram descritos como Taxol<sup>®</sup>. Dentre eles podemos citar o fungo endofítico associado à *Taxus longifolia*, que foi identificado como *Taxomyces andreanae*, descoberto em 1993. Outros fungos endofíticos também ficaram conhecidos por produzirem substâncias antitumorais. Tais como os isolados da planta *Taxus chinensis* var. *mairei*, *Podophyllum hexandrum*, *Camptotheca acuminata* e *Catharanthus roseus*, que produziram taxol, podofilotoxina, camptotecina e vincristina, respectivamente (GALLEGO-JARA *et al.*, 2020; PRAJAPATI *et al.*, 2021).

Recentemente foi realizado um estudo com o objetivo de caracterizar fungos endofíticos produtores de substâncias bioativas da planta aquática *Nelumbo nucifera*. Para isso, foi utilizado todas as partes da planta, que passaram por processos de esterilização, então o material vegetal foi colocado em meio sólido de PDA para isolamento dos fungos endofíticos. Após o isolamento, os fungos foram investigados por método de triagem, a fim de testar suas atividades antimicrobianas contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, DMST20561 (MRSA). Então o perfil químico dos extratos foi determinado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Ao total, conseguiram isolar 6 fungos endofíticos da planta *N. nucifera*. O melhor resultado contra a MRSA foi do fungo endofítico codificado como ST9.1, que foi identificado como *Aspergillus cejipi*. Os resultados demonstraram que a extração com acetato de etila obteve frações mais ativas, com concentração mínima inibitória (MIC) de 2,5 mg/mL e a concentração mínima bactericida (MBC) de 50 mg/mL. O componente majoritário do extrato bruto do fungo endofítico foi o 4-(Indolina-1-yl)-1,3,5-triazina-2-amina (C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>) (TECHAOEI *et al.*, 2020).

Além de metabólitos secundários, esses microrganismos têm sido explorados quanto a sua capacidade de sintetizar enzimas que são utilizadas pelas indústrias alimentícias, indústrias têxteis, indústrias químicas, como por exemplo na degradação de materiais lignocelulósicos e na produção de detergentes. Dentre as enzimas isoladas, as mais relatadas são: proteases, amilases, lipases, celulasas e xilanasas. É importante salientar essa importância para processos industriais sustentáveis que não afetam a saúde humana, assim como para o tratamento e desintoxicação de efluentes (BEZERRA *et al.*, 2021).

Substâncias produzidas por fungos endofíticos também possuem importância para agricultura, pois promovem o crescimento da planta, assim como melhoram sua tolerância contra estresses bióticos e abióticos do meio. Em um estudo onde foi observado que a presença de 3 fungos endofíticos do gênero *Aspergillus*, conseguiu aumentar a concentração de fósforo (um dos principais minerais necessários para o desenvolvimento e crescimento das plantas) em raízes e brotos, em sua fase inicial (JING *et al.*, 2022).

Embora a capacidade dos fungos endofíticos de produzirem substâncias bioativas seja bem conhecida, esses microrganismos ainda não foram extensivamente explorados, talvez pelo fato de que a ciência está começando a entender sua distribuição e biologia, estudos de revisões têm demonstrado a importância de realizar triagens para a busca de substâncias bioativas e novos fármacos (CORRÊA *et al.*, 2014).

#### **1.4. Estratégias biotecnológicas que induzem a produção de metabólitos secundários**

No geral, os metabólitos secundários são produzidos por enzimas, que por sua vez são codificadas por genes co-localizados, os quais são denominados de “*biosynthetic gene clusters*” BGC’s, em português, agrupamentos gênicos biossintéticos. Baseando-se no sequenciamento dos genes, foi possível notar que os microrganismos possuem vários BGC’s crípticos. Dessa forma, estima-se que eles possuem capacidade para produzir mais metabólitos secundários do que aquelas que são produzidos através de técnicas tradicionais de cultivo, pois muitas vezes esses genes estão silenciados nessas condições. Como exemplo, o microrganismo endofítico *Streptomyces coelicolor*, o qual era capaz de produzir, inicialmente, 13 classes diferentes de metabólitos secundários, mas com o sequenciamento do gene, após análise realizada em 2002, revelou-se a presença de 16 BGC’s, quais provavelmente produzem moléculas com estruturas inéditas. Diante disso, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para ativar esses genes e aumentar a quimiodiversidade desses microrganismos (ROMANO *et al.*, 2018; MAIMONE *et al.*, 2021).

Essas vias metabólicas podem ser acessadas no laboratório através de técnicas moleculares ou abordagens baseadas em cultivos diferenciados. O número de pesquisas que utilizam abordagens dependentes de cultivo têm aumentado desde que esse método foi formalizado há duas décadas, o responsável por isso foi Bode e seus colaboradores (2002), que postularam a seguinte abordagem, “*One strain-Many Compounds (OSMAC)*” (Em português: Uma cepa-muitos compostos). De acordo com o postulado de Bode (2002), cada linhagem de microrganismo tem potencial para produzir diversos compostos, mas somente são produzidos em condições específicas de cultivo, dessa forma, essa abordagem explora mudanças nas condições de cultivo, como nutrientes, temperatura, salinidade, aeração, ou até mesmo o formato dos frascos, que podem estimular a produção e a descoberta de novos produtos naturais (BODE *et al.*, 2002 *apud* PINEDO-RIVILLA *et al.* 2022; PINEDO-RIVILLA *et al.* 2022).

Dentre as estratégias para a descoberta de novos metabólitos secundários, temos aquelas que se enquadram na abordagem OSMAC, e podem ser divididas em 5 grupos. 1- Cocultivo; 2- Eliciação; 3- Alterações físicas; 4- Alterações químicas e 5- Uso de enzimas inibidoras. Além da abordagem que explora alterações nas condições de cultivo, também existem os modificadores epigenéticos, uma abordagem molecular, que podem ser divididos em inibidores de histonas deacetilases e inibidores de DNA metiltransferases (DNMT) (PINEDO-RIVILLA *et al.*, 2022).

#### **1.4.1. Cocultivo**

O Cocultivo, também chamado de fermentação mista, é uma técnica onde dois ou mais microrganismos são inoculados juntos, com intuito de mimetizar o habitat natural, no qual as interações simbióticas ou competitivas entre microrganismos são simuladas e/ou aprimoradas. No habitat natural, o acesso aos nutrientes pode ser limitado, assim como pode ocorrer troca de metabólitos entre organismos. A competição entre microrganismos é provocada por fatores de estresse indutores, que estimulam a ativação dos BGC's silenciados, (CAUDAL *et al.*, 2022).

Do Nascimento e colaboradores (2020) realizaram um estudo, onde duas linhagens de fungos endofíticos, identificados como *Talaromyces purpurogenus* H4 e *Phanerochaete* sp. H2, foram cultivados em fermentação mista e culturas axênicas. O meroterpenoide austino foi detectado somente nos extratos do co-cultivo. Então a substância isolada teve resultados promissores na inibição de *Trypanosoma cruzi*, em sua forma de epimastigotas, onde a concentração inibitória média foi de  $36,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ . Esse resultado demonstrou a

importância do cocultivo de fungos endofíticos para a obtenção de produtos bioativos naturais. Além disso, também melhoram o conhecimento a respeito das interações que podem ocorrer entre essa classe de microrganismos (DO NASCIMENTO *et al.*, 2020).

#### **1.4.2. Modulação Epigenética**

A modulação epigenética é uma técnica biotecnológica que realiza processos em torno do DNA e modulam a atividade gênica através de alterações na cromatina, resultando na acessibilidade transcricional dos genes que codificam enzimas biossintéticas (CHAPLA, 2014; LI *et al.*, 2020).

A cromatina é um complexo de DNA e proteínas, está presente no núcleo celular de eucariotos, sendo que as histonas são as principais proteínas encontradas. A subunidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, composto por uma unidade de DNA de 146 pares de bases nitrogenadas, que se envolvem em torno de um disco proteico, composto por 4 unidades de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) e a compactação dos nucleossomos formam uma fibra, no momento da transcrição essa fibra se desdobra, por meio de modificações pós-traducionais, como acetilação da cauda terminal da histona central e, fica disponível. Modificações na estrutura da cromatina podem desencadear mudanças na expressão gênica, o que altera uma variedade de processos celulares, incluindo a biossíntese de metabólitos (ZHANG; REINBERG, 2001; RUTLEDGE; CHALLIS, 2015).

As modificações da cromatina mais empregadas hoje, na modulação epigenética de fungos endofíticos, estão relacionadas com a alteração das histonas, através de acetilação e desacetilação e, a metilação do DNA. A acetilação das histonas é através da adição de um radical acetil nos resíduos de lisina, essa reação é catalisada pelas enzimas Histonas Acetiltransferases (HATs), por outro lado, as Histonas Desacetilases removem esse radical acetil, quando as histonas encontram-se hipoacetiladas, ocorre o silenciamento gênico, pois elas estão ligadas ao DNA, ou seja, a cromatina está compactada, e isso impede o acesso da RNA polimerase, e a transcrição não ocorre, o oposto quando as mesmas encontram-se hiperacetiladas, onde o DNA encontra-se disponível e pode ocorrer a transcrição gênica. A outra técnica envolve a metilação do DNA, como o próprio nome diz, é adicionada uma metila na subunidade 5' do DNA, essa reação é carregada pela enzima DNA metiltransferase. Ao todo são 3 metiltransferases responsáveis por regular a metilação do DNA (AKONE, *et al.*, 2019; GUPTA *et al.*, 2020).

Os moduladores epigenéticos são inibidores dessas enzimas. Inibidores de histonas desacetilases (HDAC), como exemplo: butirato de sódio, ácido hidroxâmico de

suberoilânida (SAHA), ácido suberohidroxâmico (SBHA), tricostatina A, entre outros. Enquanto que em relação aos inibidores da DNA metiltransferase, podemos citar a 5-azacitidina, hidralazina, sinefuginas, entre outras (GUPTA *et al.*, 2020).

Em um estudo foi utilizado 500 µM de 5-azacitidina no meio de cultura do fungo *Pestalotiopsis crassiuscula*, isolado da planta *Fragaria chiloensis*, o que resultou em uma alteração do perfil metabólico, levando ao isolamento de uma nova cumarina, além de outros 6 compostos, através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas foi visto que desses 6 compostos, 3 são novos metabólitos secundários induzidos (YANG *et al.*, 2014).

A cultura do fungo *Aspergillus sydowii* foi tratada com um inibidor de DNA metiltransferase, 5-azacitidina, resultando no isolamento de 3 metabólitos secundários novos, além de 8 compostos conhecidos. Também foi analisada a atividade antidiabética e anti-inflamatória dessas substâncias isoladas e, descobriram que o (*S*)-(+)-sidonol, um dos compostos induzidos, conseguiu aumentar o consumo de glicose e impediu o acúmulo de lipídeos em **3T3-L1** adipócitos (Modelo *in vitro* de adipócitos brancos) (MORRISON; MCGEE, 2015; AKONE, *et al.*, 2019).

### 1.4.3. Eliciação

A eliciação é uma das estratégias biotecnológicas mais eficazes para a indução da produção de novos metabólitos secundários. Elicidores são definidos como biofatores ou moléculas químicas capazes de desencadear uma resposta similar aos estresses ambientais de microrganismos e vegetais, alterando suas atividades fisiológicas ou metabólicas, o que pode levar a ativação de vias biossintéticas de metabólitos secundários, otimizando sua produção (NETALA *et al.*, 2016; HALDER, *et al.*, 2019).

Os metabólitos secundários são biossintetizados em reações em cascata, quando plantas e microrganismos estão expostos a uma infinidade de estresses abióticos e bióticos, como parte do seu sistema de defesa. O uso de elicidores, na agricultura, tem como objetivo induzir a defesa da planta, sendo uma alternativa para fungicidas. Por outro lado, na indústria farmacêutica o objetivo é extrair esses metabólitos para fins terapêuticos e dietéticos, além disso, também são de interesse para a produção de cosméticos (HAEL-CONRAD *et al.*, 2015; CHAMKHI *et al.*, 2021).

Os elicidores são classificados em bióticos e abióticos. Dentro dos bióticos existem dois grupos, o grupo 1 trata-se do uso de moléculas com estruturas conhecidas, enquanto que o grupo 2 é composto por misturas onde sua composição não é conhecida, como exemplo temos o uso de extratos de fungos, vegetais e bactérias. E os abióticos, são todos aqueles que

não são de origem biológica, ou não são seres vivos, como exemplo temos: íons metálicos, reguladores osmóticos, sais, esses são representados como eliciadores químicos, e os físicos, são alterações de temperatura, raios ultravioleta, etc. (NAMDEO, 2007; PESSANHA, 2016).

#### 1.4.3.1. Elicidores Bióticos

Os eliciadores biológicos, como o próprio nome diz, tem origem biológica. E incluem microrganismos, polissacarídeos de parede celular, como quitina, pectina e celulose, além de enzimas e fragmentos celulares, tabelas 5 e 6 (CHAMKHI *et al.* 2021).

O uso de ácido poligalacturônico aumentou significativamente o conteúdo de saponinas de células suspensas de *Panax ginseng*. Assim como a aplicação de quitina induziu a produção de fluoroquinolona, cumarina e alcaloides em culturas de ápice caulinares de *Ruta graveolens* (SAIFI *et al.*, 2020).

#### 1.4.3.2. Elicidores Abióticos

Abióticos são todos os eliciadores que não são de organismos vivos, como por exemplo os íons de metais pesados, luz ultravioleta, que induzem respostas fisiológicas ao estresse, seus efeitos não são específicos (PATEL, *et al.* 2020). A tabela 5 traz alguns exemplos.

**Tabela 5: Classificação dos eliciadores.**

1. Classificação básica dos eliciadores		
a. Bióticos	São extratos brutos ou parcialmente purificados de leveduras, fungos, bactérias e plantas.	
	Composição definida:	Polissacarídeos purificados, glicoproteínas, glicanos, quitosana, pectinas, alginato, xantanas, lectinas, enzimas inativas, etc.
	Composição indefinida:	Extrato de leveduras, bactérias, fungos, etc.
b. Abióticos	Químicos:	
	Sais e metais pesados	$Ag_2S_2O_3$ , $AgNO_3$ , $CdCl_2$ , $CuCl_2$ , $CuSO_4$ , $VOSO_4$ , $NiSO_4$ , etc.
	Estressores osmóticos	Manitol, sorbitol, NaCl, etc.
	Gases	Etileno, NO, etc.
	Físicos:	Radiação ultravioleta, mudanças na temperatura, etc.

Fonte: Adaptado de HALDER *et al.*, 2019.

**Tabela 6:** Classificação dos eliciadores quanto à origem:

2.Classificação quanto à origem	
Exógenos	Estão presentes fora da célula: glicoproteínas, poliaminas, celulose, ácido araquidônico, etc.
Endógenos	Estão presentes no interior da célula: ácido jasmônico, ácido salicílico, jasmonato de metila, etc.

Fonte: Adaptado de HALDER *et al.*, 2019.

## 2.JUSTIFICATIVA

A tuberculose continua sendo um problema de saúde pública mundial e o aumento do número de casos de TB resistente tem preocupado os órgãos de saúde, ademais, os tratamentos disponíveis causam muitos efeitos adversos, muitas vezes acarreta o abandono do tratamento e a seleção de cepas mutantes. Desta forma existe a necessidade pela busca de novos fármacos antituberculose que possuem menos efeitos colaterais e tenham atividade antimicrobiana contra as diferentes cepas resistentes (MOORE *et al.*, 2017; WHO, 2021).

Os microrganismos endofíticos, principalmente fungos, demonstraram ser fontes promissoras de substâncias bioativas. São definidos como microrganismos que em determinado momento colonizam o interior do tecido vegetal de forma simbiótica, o que resulta na produção de diversos metabólitos secundários com atividades farmacológicas distintas, como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, imunossupressoras, dentre outras (AZEVEDO, 1998; CHAPLA *et al.*, 2013; SPECIAN *et al.*, 2014).

Estudo realizado por nossa equipe demonstrou que o fungo codificado como TB3, isolado da planta *Tocoyena bullata*, obteve resultados promissores de atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória, onde, o extrato do mesmo apresentou 80% de inibição do crescimento da cepa atenuada, *M. bovis* BCG, sendo esse resultado obtido na concentração inibitória mínima de 2 µg/mL, com MIC<sub>50</sub> de 1,4 ± 0,4 µg/mL. Além disso, também teve atividade em uma cepa de *M. tuberculosis*, baixa virulência, cepa H37Rv, onde apresentou 90% de inibição, em sua maior concentração testada 500 µg/mL e contra uma cepa hipervirulenta, cepa M299, onde apresentou mais de 75% de inibição do crescimento, também na maior concentração testada, 500 µg/ml (CALIXTO, 2016; CALIXTO *et al.*, 2022).

Devido a esses resultados promissores, esse trabalho busca utilizar a eliciação biológica do fungo endofítico TB3, isolado da planta *Tocoyena bullata*, oriunda do Parque

Nacional Restinga de Jurubatiba, como estratégia biotecnológica para a otimização da síntese de metabólitos secundários ativos e comparar com o cultivo tradicional.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1.Objetivo geral**

Comparar o perfil químico dos extratos do fungo endofítico TB3, obtidos através do cultivo tradicional e na presença de um eliciador biológico, lisado de *Mycobacterium bovis*, por meio de técnicas cromatográficas e espectrométricas. Visando observar se houve a produção de substâncias eliciadas.

#### **3.2.Objetivos específicos**

- Cultivar o fungo endofítico TB3 em condições tradicionais e eliciadas, usando como eliciador o lisado de *M. bovis*.
- Obter os extratos etanólicos dos cultivos em arroz.
- Pré-fracionar os extratos etanólicos por partição líquido-líquido.
- Analisar as frações hexânicas, acetato de etila e butanólicas, por cromatografia em camada delgada.
- Analisar as frações acetato de etila, butanólicas e aquosas, por cromatografia de alta eficiência acoplada a detector de arranjo diodos (CLAE - DAD).
- Analisar as frações acetato de etila e hexânicas, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).
- Analisar os resultados obtidos a fim de avaliar se a estratégia de cultivo empregada alterou a quimiodiversidade do fungo.

### **4.MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1.MATERIAL**

##### **4.1.1.Material biológico**

O fungo codificado como TB3, foi isolado da planta *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae), figura 3, oriunda do Parque Nacional Restinga de Jurubatiba, e faz parte da

micoteca do laboratório de produtos bioativos da UFRJ- campus Macaé, qual segue o método Castellani de preservação (CASTELLANI, 1939).

\*



\*\*



**Figura 3: Planta *Tocoyena bullata* e fungo endofítico TB3.**

\*À esquerda temos a foto da planta *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae), no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, imagem tirada pela equipe do Laboratório de Produtos Naturais da UFRJ-Macaé.

\*\* À direita ilustra o fungo endofítico TB3, isolado da planta *Tocoyena bullata*, em meio sólido ágar após 7 dias de crescimento estático, em 30° C.

O lisado da *Mycobacterium bovis*, cepa atenuada, da vacina BCG, foi gentilmente preparado pela doutoranda Juliana Givisiéz Valente, do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFRJ, orientada pela professora Dr<sup>a</sup>. Michelle Frazão Muzitano. Em uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL, conforme especifica o item 4.2.2.

#### 4.1.2. Meio de cultura

O ágar batata dextrose utilizado é da marca KASVI<sup>®</sup> e o arroz parboilizado foi da marca *Uncle Ben 's Original*<sup>®</sup>.

#### 4.1.3. Solventes

Os solventes utilizados para a extração e pré-fracionamento, grau PA, foram das marcas: NEON, Biograde, J.T.Baker. Os solventes utilizados para as técnicas analíticas, com exceção da cromatografia em camada delgada, foram grau HPLC, sendo estes da marca TEDIA<sup>®</sup>.

#### 4.1.4. Equipamentos

Autoclave vertical cs Primatec<sup>®</sup>. Balança Analítica Marte<sup>®</sup> Modelo: AY220; Capela de Exaustão de gases, fluxo laminar trox-modelo: Flu, série 506, estufa de secagem e

esterilização (Nova ética), incubadora shaker refrigerada SL-223 Solab®, placa de aquecimento Kasvi®, estufa incubadora B.O.D SL-200.

#### **4.1.5. Vidrarias**

Béqueres de volumes variados, balão de Erlenmeyer 500 mL, balão fundo redondo, placas de petri, vidro Roni Alzi® 500 mL, funil de vidro liso, pipetas graduadas, frascos reagente boro incolor graduado com tampa rosca azul, vidro relógio, tubos de ensaio, provetas, funil de vidro, frasco ampola de penicilina, pipetas volumétricas e funil de separação.

#### **4.1.6. Outros**

Béquer de plástico, PVC, microtubos, tubos de transferência (*transfer tubes*), palito de madeira, alça calibrada loop.

### **4.2. MÉTODOS**

#### **4.2.1. Preparo do meio de cultura**

Para o meio sólido de ágar batata dextrose foram utilizadas as concentrações e preparo descritos pelo próprio fabricante. O meio fermentativo sólido arroz foi preparado da seguinte forma: Em frascos, tipo erlenmeyer de 500 mL, foram adicionados 90 g de arroz parboilizado da marca *Uncle Ben's original*® e 90 mL de água destilada então foram esterilizados em autoclave, por 40 minutos, na temperatura de 121° C e pressão 1 atm.

#### **4.2.2. Preparo do lisado autoclavado de *Mycobacterium bovis***

Para o preparo do eliciador biológico foi utilizada a cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (BCG). A mesma foi previamente crescida em meio ágar Middlebrook 7H10, específico para o crescimento de micobactérias, para isso foram utilizados 4,2g de meio ágar 7H10, para 200 mL de meio de cultivo, 1,1 mL de glicerol e foi suplementado com soro fisiológico 10%. Após crescimento, transferiu-se para o meio líquido 7H9, sendo este preparado com 1,09g de meio 7H9 e polisorbato 80, novamente suplementado com soro fisiológico, 10%. Então, observou-se o crescimento da bactéria até alcançar a fase *lag*. Posteriormente, autoclavou por 45 minutos, à 121°C e 1 atm, obtendo o lisado micobacteriano.

#### 4.2.3. Inoculação do Fungo em diferentes condições de cultivo

Previamente à inoculação do fungo TB3 no meio fermentativo, o mesmo foi inoculado no meio sólido ágar batata dextrose e incubado à 30 °C, por 7 dias, para obtenção dos discos de micélio-ágar (0,5 cm de diâmetro).

Para a fermentação do fungo foram usadas duas condições de cultivos, a condição tradicional e a condição eliciada, com intuito de obter a condição mais promissora e também, avaliar as modificações metabólicas decorrentes do uso do eliciador biológico.

A inoculação do fungo TB3, no meio fermentativo arroz parboilizado, foi realizada dentro do fluxo laminar. Para o preparo do cultivo tradicional (CT), foram transferidos 12 discos de micélio-ágar do fungo TB3, para o frasco tipo Erlenmeyer de 500 mL, contendo meio esterilizado de arroz parboilizado, preparado conforme item 4.2.1. O cultivo eliciado (CE), além de 12 discos de micélio-ágar do fungo TB3, também foi transferido para o frasco tipo Erlenmeyer contendo o meio fermentativo, 10 mL do lisado de *M. bovis*. Ambos os cultivos foram incubados à 30° C, por 21 dias.

Juntamente com os cultivos, preparou-se dois controles, o primeiro foi o controle do meio sólido fermentativo (B), ou branco, composto somente pelo arroz parboilizado esterilizado. E o segundo, o controle do lisado (M), para seu preparo, transferiu-se 10 mL do lisado de *M. bovis*, para o frasco tipo erlenmeyer contendo o meio fermentativo esterilizado. Ambos foram incubados nas mesmas condições, figura 4.



**Figura 4: Frascos de erlenmeyer contendo os CT, CE, B e M, em incubadora tipo B.O.D**

CT - Cultivo tradicional, CE - Cultivo eliciado, B- Controle do meio fermentativo, branco e M- Controle do lisado de *Mycobacterium bovis*.

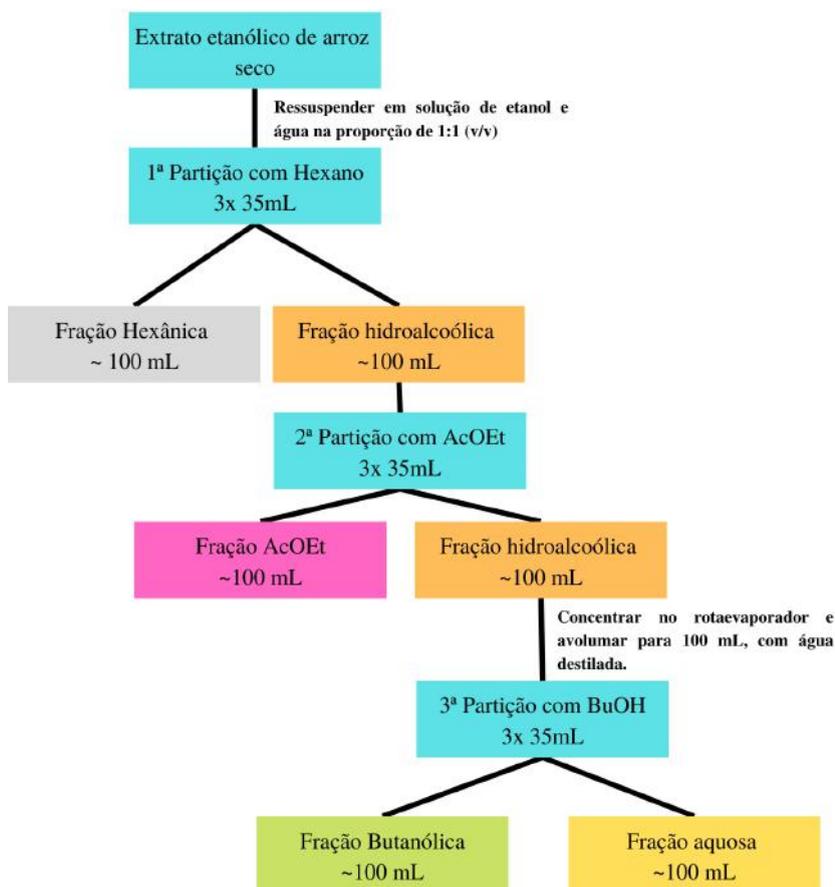
#### 4.2.4.Extração através de maceração estática

Após o período de 21 dias, foi realizada a extração por maceração estática, em cada ensaio e controle foi adicionado etanol absoluto, 99,5% (NEON), até cobrir totalmente o meio sólido de arroz, cerca de 200 mL, então, as amostras foram mantidas na temperatura de 30° C por mais 48 horas, após esse período, realizou-se a filtração e obteve-se os extratos etanólicos de arroz, os micélios foram descartados. Os extratos etanólicos de arroz foram secos no rota evaporador e calculados os rendimentos.

#### 4.2.5.Fracionamento dos extratos: partição líquido-líquido

A ressuspensão de cada extrato bruto foi realizada em uma solução de etanol e água destilada, proporção de 1:1 (v/v). Onde foram utilizados 50 mL de água destilada e 50 mL de etanol absoluto.

Então a partição foi dividida em 3 etapas, iniciando-se com hexano (3 x 35 mL cada), depois acetato de etila (3 x 35 mL cada) e finalizando com butanol (3 x 35 mL cada), obtendo as frações hexânicas, acetato de etila, butanólicas e aquosas (Figura 5).



**Figura 5: Fluxograma da partição líquido-líquido a partir dos extratos etanólicos de arroz.** AcOEt- Acetato de etila; BuOH- Butanol.

## **4.2.6. Análise do perfil químico através de técnicas analíticas**

### **4.2.6.1. Cromatografia em camada delgada**

As frações hexânicas, acetato de etila e butanólica de cada extrato foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Para as frações hexânicas, usou-se dois eluentes, hexano: acetato de etila, em duas proporções 9:1 e 1:1 (v/v). Para as frações de acetato de etila, foram utilizados os mesmos eluentes, porém nas proporções de 7:3; 6:4; 1:1; 3:7(v/v). Para as frações butanólicas usou-se as seguintes fases móveis: *BAW*, em inglês: *Butanol/Acetic Acid/Water*, na proporção de 4:1:5 (v/v/v), respectivamente (HARBONE, 1973) e Acetato de etila/metanol/ácido acético, 8:1:1 (v/v/v). Elas foram visualizadas sob incidência de luz UV em 254 e 365 nm. Para a revelação química utilizou-se vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento. A análise foi feita em placa de sílica de fase normal, em suporte de alumínio.

### **4.2.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)**

Através desta técnica foram analisadas as frações acetato de etila, butanólicas e aquosas, obtidas através da partição líquido-líquido, descrita no item 4.2.5. As amostras foram preparadas pesando-se aproximadamente 1 mg de cada fração, os quais foram redissolvidos em 300 µL de uma solução de água ultrapura e acetonitrila, preparada na proporção de 1:1 (v/v).

O equipamento empregado é da marca Shimadzu, figura 6, localizado no Laboratório de Produtos Bioativos da UFRJ-Macaé. O qual possui uma bomba de gradiente quaternário LC-20AT, um auto injetor modelo SIL-20A, um detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, uma controladora, modelo CBM-20A, um forno, modelo CTO-20A, um degaseificador, modelo DGU-20A5 (Shimadzu) e um sistema de aquisição de dados com software LC solution® versão 1.25 SP1. As análises foram realizadas utilizando a coluna C18 *endcapped*, dimensões 250 x 4,6 mm, tamanho da partícula de 5 µ e tamanho do poro 100 Å, marca Phenomenex. A fase móvel foi do tipo gradiente, onde utilizou soluções de acetonitrila e água acidificada com ácido trifluoroacético (0,05%), (Tabela 7). A vazão foi de 1 mL/ min, a temperatura do forno foi de 40 °C e o volume da injeção de 50 µL.



**Figura 6: Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos no LPBio.**

**Tabela 7: Gradiente de concentração de acetonitrila na fase móvel por tempo de eluição.**

Tempo de análise (min)	Concentração de Acetonitrila (%)
0.01	15
7.00	20
27.00	35
30.00	50
32.00	90
34.00	90
35.00	15
37.00	15
40.01	<i>Final da aquisição de dados</i>

As condições do DAD foram entre 190 a 800 nm.

#### **4.2.6.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**

O equipamento empregado também é da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), localizado na Central Analítica da Farmácia da UFRJ Campus da Ilha do Fundão, onde as técnicas foram aplicadas pelo mestre Marcos Vinicius Toledo e Silva, o gás arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1,1 mL /min, a coluna capilar modelo RTX-5Ms (L=30 m; d=0.25 $\mu$ m), o injetor tipo split e sua temperatura utilizada foi de 270 °C, a temperatura do forno possui característica linear durante a separação, aumentando 10 °C /min, sendo que a temperatura inicial foi de 60

°C e a temperatura máxima atingida de 290 °C; Condições do detector de massas: Fonte de ionização – 200 °C; Interface-230 °C. Através da CG-EM foram analisadas as frações hexânicas e acetato de etila, na concentração de 1 mg/mL.

A identificação dos compostos foi através da comparação dos espectros obtidos com a biblioteca NIST 05s.LIB e WILEY7.LIB do equipamento. Foram considerados como identificados compostos com índice de similaridade (SI) > 90 % .

## 5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1.Rendimentos dos extratos etanólicos brutos

A partir dos ensaios e controles foram obtidos 4 extratos etanólicos brutos, dos quais os rendimentos, em gramas, estão descritos na Tabela 8.

### 5.2.Rendimentos dos fracionamentos por partição líquido-líquido

Para a realização das partições foram utilizados 1,643 g do extrato etanólico de arroz (EEA) do cultivo tradicional, 1,106 g do EEA do cultivo eliciado, 1,435 g do EEA do controle do meio fermentativo e 1,45 g do EEA controle do lisado. A Tabela 8 descreve os valores de rendimento de cada fração, para cada extrato etanólico de arroz.

**Tabela 8: Rendimento após partição dos extratos etanólicos de arroz:**

	EEA	Fr. HEX		Fr. AcOET		Fr. BuOH		Fr. H2O		R
	(g)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(%)
C.T 1,643 <sup>1</sup>	9,76	18	1,02	50	3,04	326	19,84	877	53,84	77,35
C.E. 1,106 <sup>1</sup>	2,74	3	0,27	62	5,61	150	13,56	611	55,24	74,6
C.M 1,435 <sup>1</sup>	2,08	52	3,62	93	6,48	123	8,57	807	56,24	74,91
C.L. 1,45 <sup>1</sup>	2,21	80	5,51	48	3,31	150	10,34	332	22,9	42,0

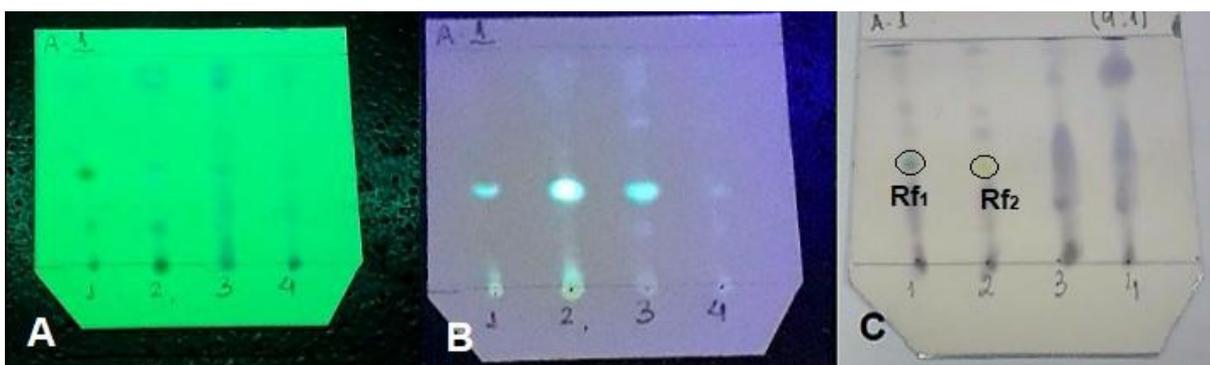
EEA - Extrato etanólico de arroz. Fr HEX- Fração Hexânica; Fr. AcOET - Fração Acetato de etila; Fr. BuOH - Fração butanólica; Fr. H2O - Fração Aquosa. <sup>1</sup> Massa do EEA utilizada para cada partição líquido-líquido, em gramas. C.T -Cultivo Tradicional; C.E. - Cultivo Eliciado; C.M. - Controle do meio fermentativo de arroz; C.L. - Controle do Lisado micobacteriano. R - Rendimento percentual total após partição.

### 5.3.Cromatografia em Camada Delgada:

#### 5.3.1.Frações Hexânicas

Inicialmente, usou-se uma fase móvel mais apolar, sendo esta uma solução de hexano: acetato de etila, 9:1 (v/v).

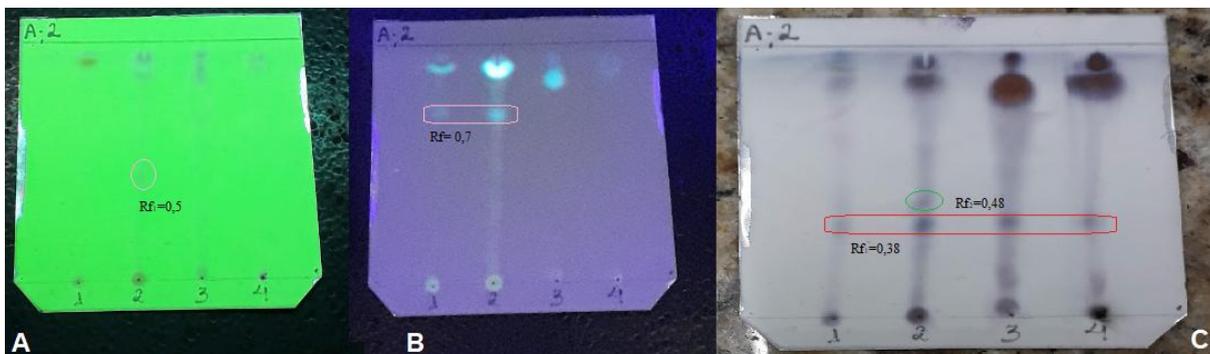
Na figura 7, item C, podemos ver que as frações hexânicas tanto do cultivo tradicional, quanto do cultivo eliciado apresentaram duas bandas diferentes, de acordo com seu perfil químico obtido por CCD, ao ser revelado com vanilina sulfúrica e aquecida. Onde o cultivo tradicional apresentou uma banda esverdeada com  $Rf_1$  0,45, enquanto que no cultivo eliciado é possível visualizar uma banda amarelada, de  $Rf_2$  0,36, o que sugere a presença de substâncias diferentes, também é importante notar que elas não estão presentes nos controles.



**Figura 7 Cromatografia em Camada Delgada das frações hexânicas**, sílica em fase normal, fase móvel: HEX/ AcOEt na proporção de (9:1). A- Visualização em UV 254 nm; B- Visualização em UV 365 nm; C- Revelação química com Vanilina Sulfúrica aquecida. 1- Fração hexânica cultivo tradicional; 2- Fração hexânica cultivo eliciado; 3- Fração hexânica branco; 4- Fração hexânica controle do lisado.  $Rf$ = fator de retardamento.  $Rf_1$  : 0,45 e  $Rf_2$  : 0,36.

Por outro lado, na segunda eluição, aumentou-se a polaridade da fase móvel, alterando a concentração dos eluentes para 1:1 (v/v). Resultando no perfil cromatográfico ilustrado na figura 8, o qual traz bandas em comum em todas as frações analisadas, sugerindo ser substâncias provenientes do meio de cultivo. Quando visto no comprimento de onda UV de 254 nm, item A, surgiu uma banda com fator de retardamento = 0,5 na Fr. Hex do cultivo eliciado, que por sua vez não foi vista no cultivo tradicional e nem nos controles. O que sugere a detecção de uma substância eliciada. No item C, desta mesma figura, quando revelada com vanilina sulfúrica e aquecida, surge uma banda, circulada em verde, seu  $rf$  = 0,48, provavelmente é a mesma substância vista no comprimento de onda de 254 nm. Ainda

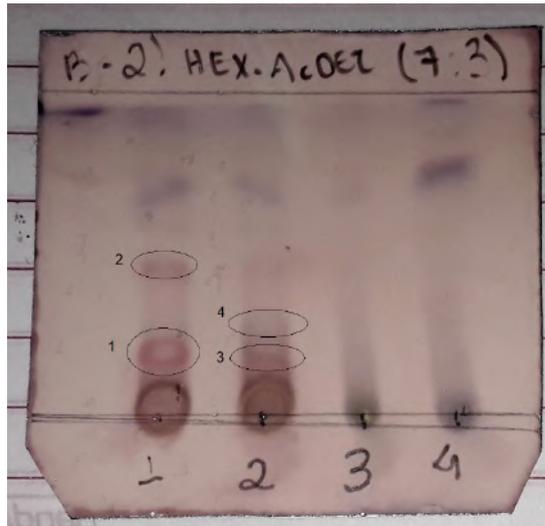
com a cromatoplaça C, há duas bandas com os mesmos índices de retenção, 0,70, uma da Fr. C.T e a outra na Fr. C.E. Demonstrando a importância de utilizar o controle do meio sólido, no item C, também foi possível observar bandas com coloração e rfs iguais, 0,38, provavelmente essa substância é do meio de cultura fermentativo utilizado.



**Figura 8 Cromatografia em Camada Delgada das frações hexânicas**, sílica em fase normal, fase móvel: HEX/ AcOEt (1:1). A- Visualização UV 254 nm; B- Visualização no UV 365 nm; C- Revelação química com vanilina sulfúrica. 1- Fração hexânica cultivo tradicional; 2- Fração hexânica cultivo eliciado; 3- Fração hexânica branco; 4- Fração hexânica controle do lisado. \* Rf: fator de retenção.

### 5.3.2. Frações Acetato Etila:

Na figura 9, temos a cromatoplaça das frações acetato de etila, sílica em fase normal, eluídas em hexano: acetato de etila, proporção de 7: 3 (v/v), onde existem 4 bandas que não estão presentes nos controles, sendo que dessas, a banda 1 e 3 apresentam a mesma coloração, apesar de possuírem Rfs diferentes, podendo ser a mesma substância, pois a interação da banda 3 com a banda 4 pode ter prejudicado sua eluição, por conta de interações intermoleculares que podem ter ocorrido.



**Figura 9: Cromatoplaça das frações acetato de etila**, eluídas em hexano/AcOEt (7: 3) (v/v), revelado com vanilina sulfúrica e aquecida. 1- Fração acetato de etila do cultivo tradicional; 2- Fração acetato de etila do cultivo eliciado; 3- Fração acetato de etila do controle do arroz; 4- Fração acetato de etila do controle do lisado.

### 5.3.3. Frações Butanólicas

Para as frações butanólicas utilizou a fase móvel constituída de Acetato de etila/metanol/ácido acético na proporção de 8:1:1 (v/v/v) (Figura 11), na qual não observamos diferenças entre elas.



**Figura 10: Cromatoplaça das frações butanólicas.**  
Fase móvel: Acetato de etila/metanol/ácido acético, 8:1:1. (v/v/v), visualizadas em espectro de UV 254 nm. 1- Fração butanólica do cultivo tradicional; 2- Fração butanólica do cultivo eliciado; 3- Fração butanólica do controle do arroz; 4- Fração butanólica do controle do lisado.

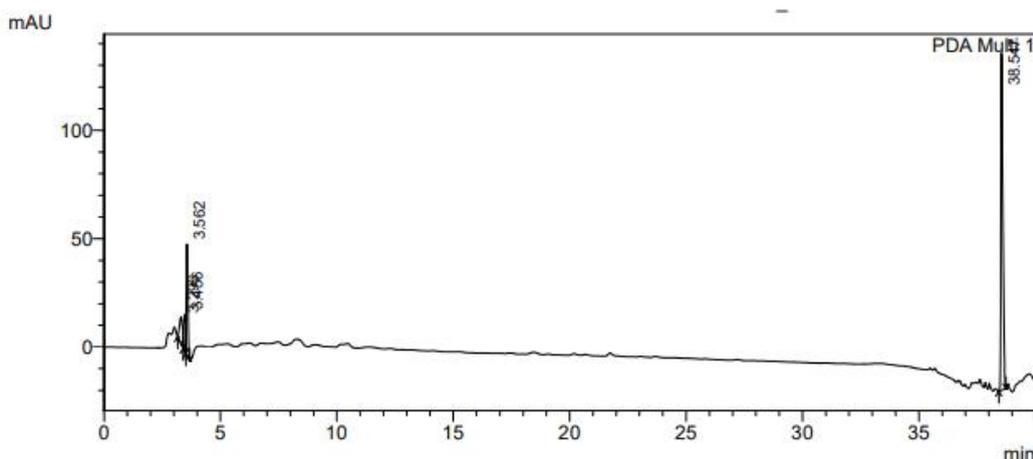
## 5.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector Arranjo de Diodos

Para o preparo das amostras, pesou-se cerca de 1 mg de cada extrato etanólico bruto seco e suas frações, conforme ilustra a tabela 6, então foram ressuspensos em uma solução de

água ultrapura com acetonitrila, na concentração de 1:1 (v/v). Cada amostra foi filtrada ao serem transferidas para os vials. A concentração final foi de aproximadamente 3 mg/ mL .

A água acidificada com TFA, foi preparada usando uma proporção de 0,05g TFA em 999,95 mL de água ultrapura, chegando em uma concentração de 0,05% (p/v) de TFA em água, o pH foi analisado usando a tira de pH, onde obteve o resultado de aproximadamente 3,0.

As análises foram realizadas em fase reversa, sendo empregada a coluna Phenomenex C18 *endcapped*. Inicialmente foram injetadas 20 µL da amostra. O gradiente de concentração da fase móvel foi baseado em estudos anteriores realizados pela nossa equipe, para separação das frações obtidas do extrato bruto de outra linhagem de fungo endofítico, também isolado da planta *Tocoyena Bullata*. Conforme Figura 11, podemos ver que a quantidade de amostra foi insuficiente, então testou-se a injeção de 50 µL, a qual demonstrou melhores resultados e foi utilizada como volume para todas as análises seguintes.

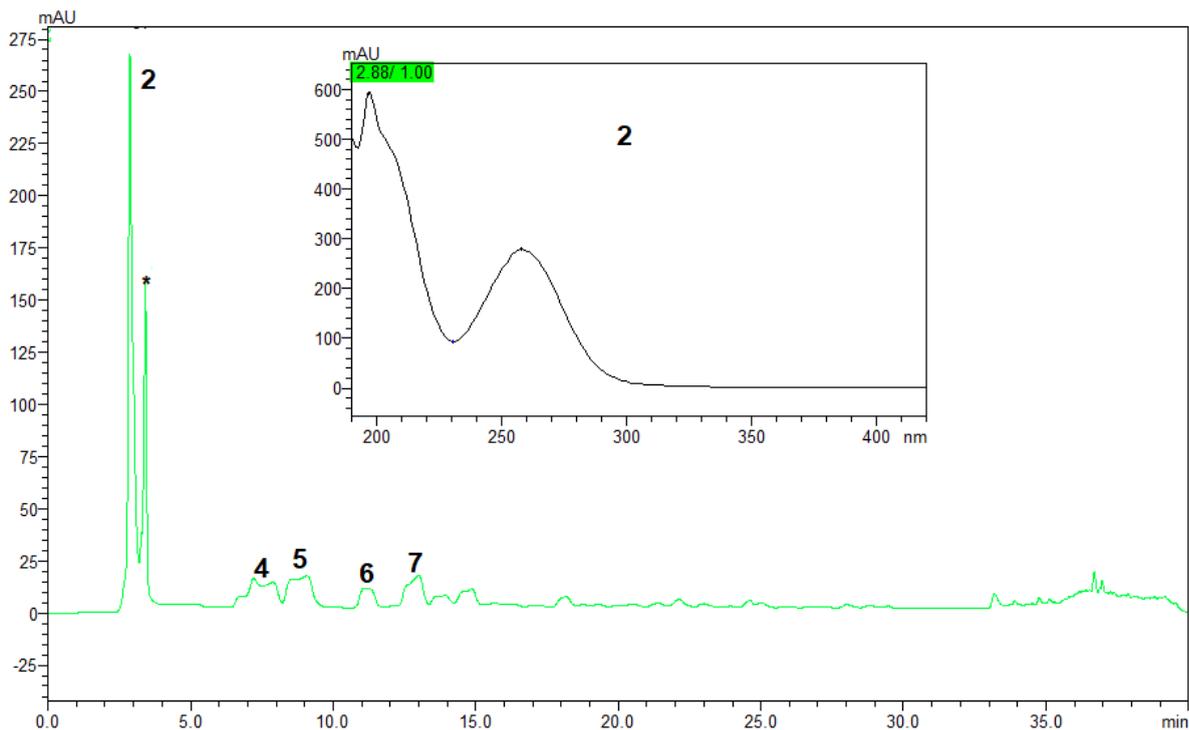


**Figura 11: Cromatograma da Fração 2-B-TB3, injeção de 20µL, 225 nm.**  
2-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo tradicional.

#### 5.4.1.1. Frações Acetato de Etila

Ao total foram detectados 15 picos nas frações em acetato de etila, em 254 nm. Inicialmente discutiremos os picos detectados nas frações acetato de etila dos controles para posterior apresentação dos picos das frações AcOEt dos cultivos do fungo TB3. Os picos foram numerados de forma crescente, de acordo com o seu tempo de retenção, ou seja, o primeiro pico 1 é o com menor tempo de retenção, o primeiro a ser detectado, e assim sucessivamente.

A fração em acetato de etila do controle do meio fermentativo apresentou 6 picos, em 254 nm, conforme ilustra a figura 12, sendo o pico 2 de maior concentração, 63,735 %.

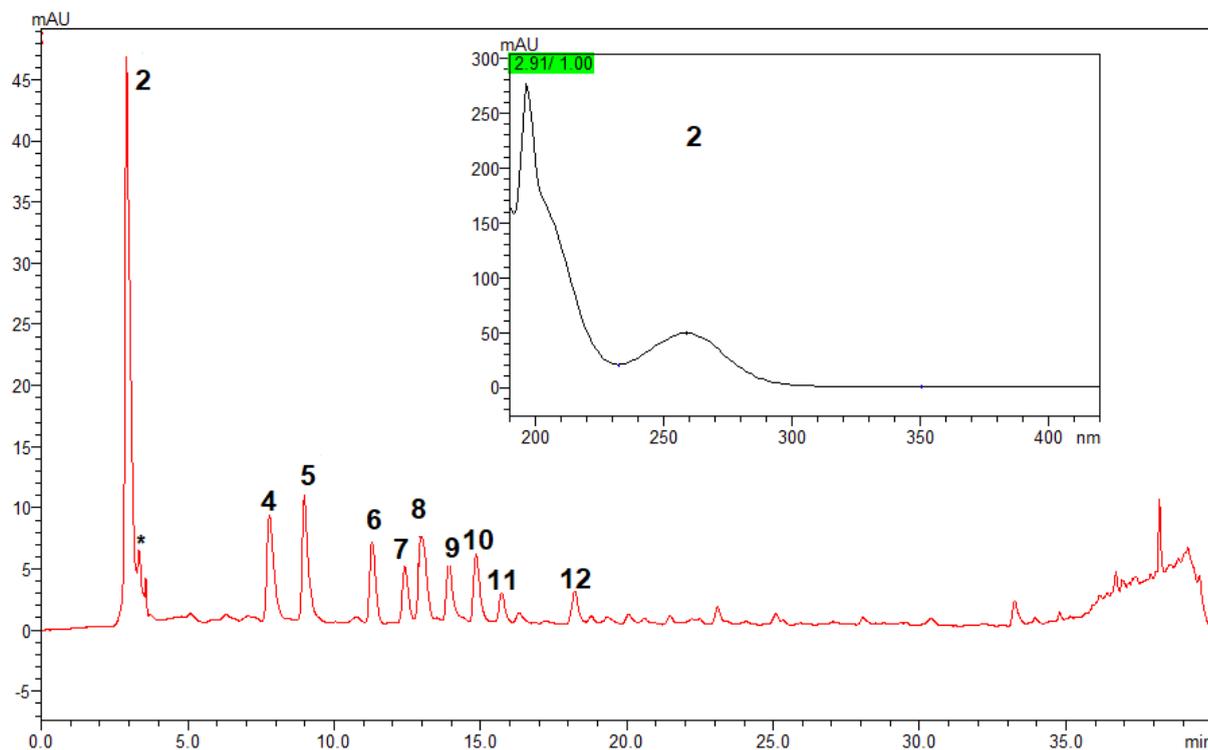


**Figura 12: Cromatograma da Fração 3-B-B\* em 254 nm.**

3-B-B\* - Fração acetato de etila do controle do meio fermentativo. Tr: Tempo de retenção.

Picos: 2- Tr: 2.882 min. e área=63,735 % ; 4- Tr: 7.218 min. e área= 12,452% ; 5- Tr: 9.060 min. e área=12,013 % ; 6- Tr: 11.133 min. e área= 4,427 % 7- Tr: 12.987 min. e área= 7,374 % . \*

Conforme ilustra a figura 13, foram detectados 9 picos na fração acetato de etila do controle com o lisado, sendo que seu pico majoritário também foi o 2, assim como foi visto na fração 3-B-B, sugerindo assim uma substância majoritária proveniente do meio de cultivo. Além desse pico, os picos 4,5,6 e 7 também foram em comum com a fração 3-B-B.

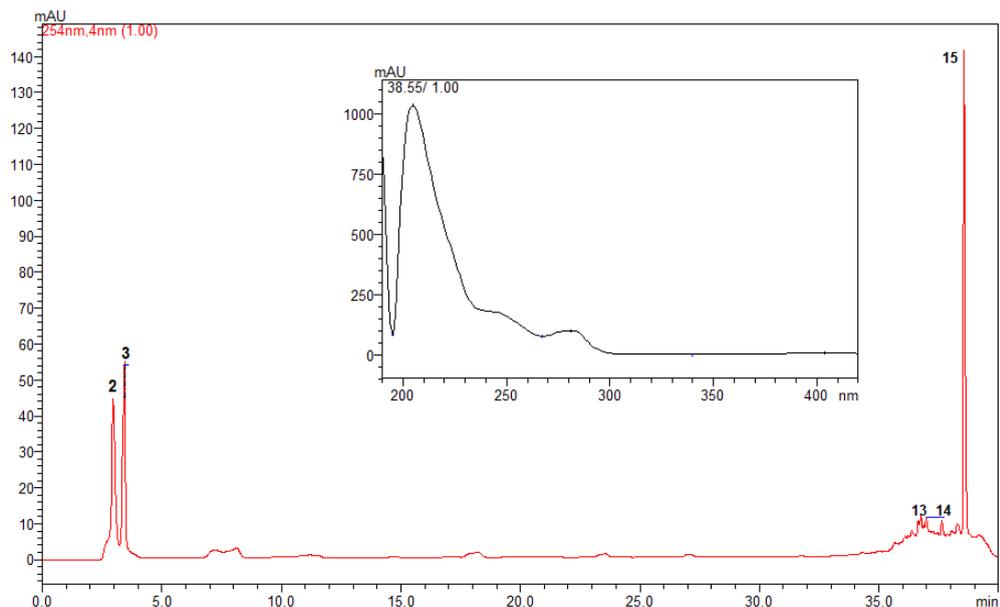


**Figura 13: Cromatograma da fração 4-B-M\* em 254nm.**

4-B-M - Fração acetato de etila do controle do lisado. Tr: Tempo de retenção.

Picos: 2- Tr= 2.913 min. área=44,339 % ; 4- Tr= 7.794 min. área= 9,563 % ; 5- Tr: 8.984 min. área=10,211 % ; 6- Tr:11.301 min. área=6,177 % ; 7- Tr: 12.415 min área=4,567 % ; 8- Tr:12.985 min área=9,119 % ; 9- Tr:13.924 min área=5,411 % ; 10- Tr: 14.847 min área=5,838 % ; 11- Tr: 15.726 min área=2,208 % e 12- Tr: 18.219 min. área=2,208 %.

Através da análise da fração em acetato de etila do cultivo do fungo TB3, em condições tradicionais, obteve-se 5 picos, conforme ilustra a figura 14.

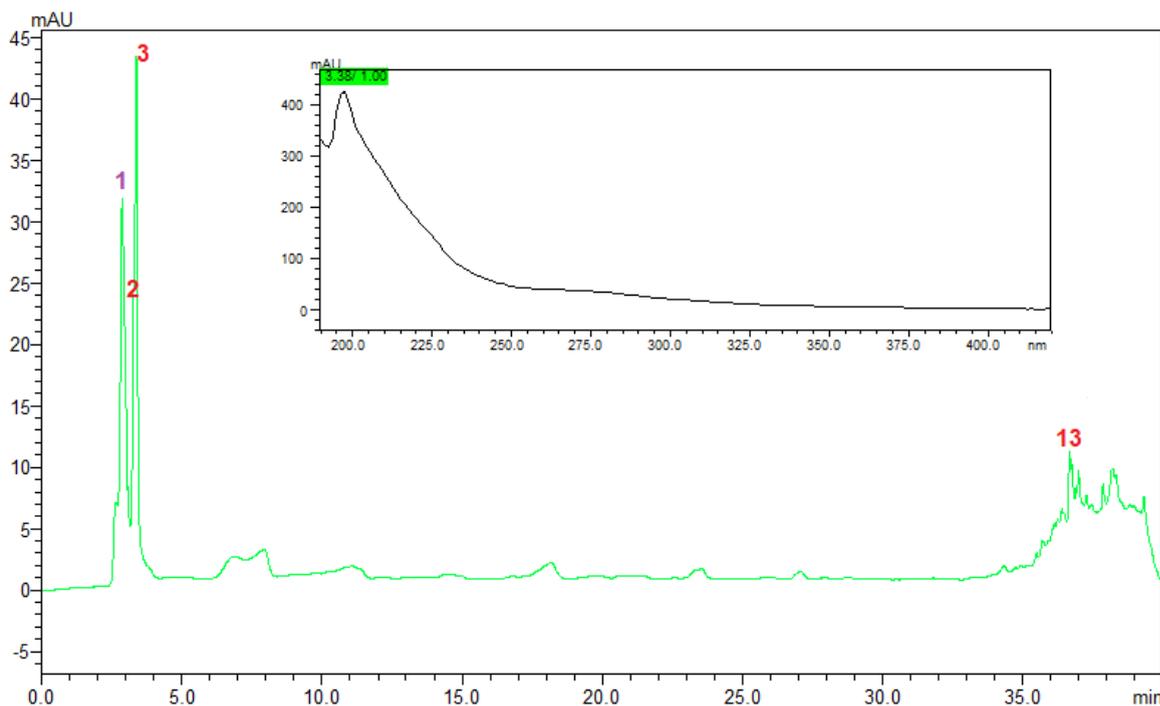


**Figura 14: Cromatograma da fração 1-B-TB3, em 254nm.**

1-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo tradicional. Tr: Tempo de retenção.

2- Tr: 2.950 min. e área= 22,139 % ; 3- Tr: 3.429min e área= 25,552 % ; 13- Tr: 36.752 min e área= 3,224 % ; 14- Tr: 36.992 min. e área=2,118 % e 15- Tr: 38.555 min. e área= 46,967 %.

Através da análise da fração acetato de etila do cultivo eliciado foi possível detectar o pico 1, Tr= 2.613 min e área= 7,608%, o qual não é o pico majoritário dessa fração, sendo o majoritário o pico 3, com 44,580 %, mas uma vez que o mesmo não esteve presente na fração 1-B-TB3, e nem nos controles, sugere-se que é uma possível substância eliciada, ademais foram detectados 4 picos, em 254 nm, figura 15.



**Figura 15: Cromatograma da Fração 2-B-TB3, em 254nm.**

2-B-TB3 - Fração Acetato de etila do cultivo eliciado. Tr: Tempo de retenção.

1- Tr =2.613 min e área= 7,608% 2- Tr= 2.865 min e área = 43,279 %; 3- Tr= 3.380 min e área = 44,580 %  
13- Tr= 36.674 min e área = 4,533 %.

Os cromatogramas sobrepostos no comprimento de onda de 225, 254 e 265nm, assim como os espectros de UV referentes aos picos majoritários de cada fração em acetato de etila estão ilustrados no Anexo I. A tabela 9 ilustra o tempo de retenção (min) e os picos majoritários das frações em acetato de etila, obtidos através de CLAE-DAD, condições descritas no item 4.2.6.2 A tabela 9 ilustra o pico majoritário de cada fração analisada e seus respectivos comprimentos de ondas:

**Tabela 9:** Picos majoritários das frações acetato de etila, cromatograma sobreposto em 225, 254 e 365nm.

Fração	Tr	Área	Comprimento de onda :
3-B-B	3,412 min.	44,723 %	225 nm
3-B-B	12,999 min.	25,608%	225 nm
4-B-M	2,913 min.	44,339%	254 nm
4-B-M	8,984 min.	10,211%	254 nm
1-B-TB3	3,429 min.	25,552 %	254 nm
1-B-TB3	38,555 min.	46,967%	254 nm
2-B-TB3	2,721 min.	23,168 %	225 nm
2-B-TB3	3,378 min.	63,870%	225 nm

Tr= tempo de retenção. 1-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo tradicional; 2-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo eliciado; 3-B-B- Fração acetato de etila do controle do meio; 4-B-M- Fração acetato de etila do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*. Tr: Tempo de retenção;

Através da técnica, foi possível separar substâncias com baixa e alta polaridade, sendo as de baixa polaridade, aquelas que foram detectadas no final da análise, enquanto que as substâncias de alta polaridade foram detectadas no início.

A tabela 10 descreve todos os picos detectados no comprimento de onda de 254 nm, o qual não difere muito dos encontrados em 225 nm e 365 nm (Anexo I). E resume tudo o que foi discutido anteriormente, onde o Pico 1, sugere a presença de uma substância eliciada. O pico 2, foi detectado em todas as frações analisadas, dessa forma subentende-se que é uma substância proveniente do arroz. O pico 3 está presente tanto no cultivo em condições normais, quanto no cultivo em condições eliciadas, dessa forma poderíamos citar que a mesma foi produzida pelo fungo, entretanto se observarmos nas figuras 14 e 15, no tempo de retenção em que foi detectado o pico 3, existe o pico, marcado com \* em ambos os cromatogramas. Ademais, os picos 4-12 foram detectados somente nos controles, provavelmente não foram detectados nos cultivos, pois o microrganismo deve ter consumido esses nutrientes, e sua concentração tornou-se baixa, não sendo suficiente para detecção pelo equipamento. Por outro lado, os picos 13-15, sendo o 13 detectado em ambos os cultivos e os 14-15, somente no cultivo tradicional, sugerem substâncias produzidas pelo fungo.

**Tabela 10 : Tempo de retenção das substâncias detectadas no comprimento de 254nm**

Picos	1-B-TB3		2-B-TB3		3-B-B		4-B-M	
	Tr (min)	Área (%)						
1			2.613	7.608				
2	2.950	22,139	2.865	43,279	2.882	63,735	2.913	44,339
3	3.429	25.552	3.380	44.580				
4					7.218	12.452	7.794	9.563
5					9.060	12.013	8.984	10.211
6					11.133	4.427	11.301	6.177
7					12.987	7.374	12.415	4.567
8							12.985	9,119
9							13.924	5.411
10							14.847	5.838
11							15.726	2.208
12							18.219	2.208
13	36.752	3.224	36.674	4.533				
14	36.992	2.118						
15	38.555	46.967						

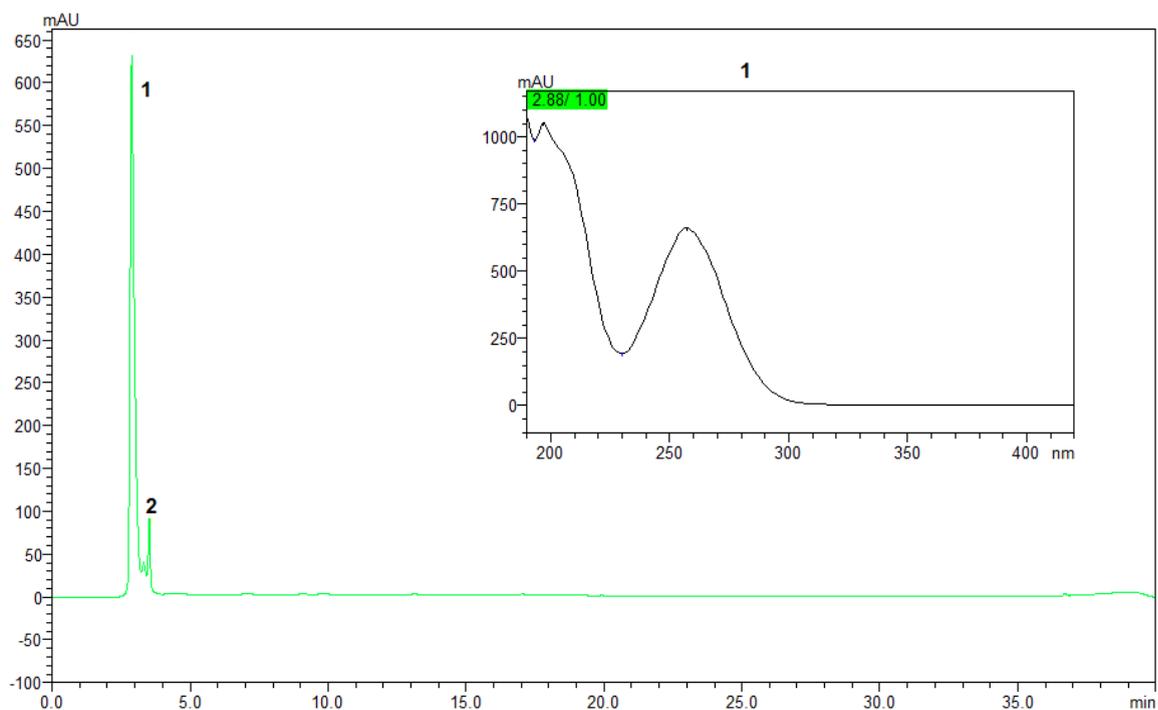
1-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo tradicional; 2-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo eliciado; 3-B-B- Fração acetato de etila do controle do meio; 4-B-M- Fração acetato de etila do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*. Tr: Tempo de retenção.

#### 5.4.2. Frações Butanólicas

As frações BuOH também foram analisadas em 225, 254 e 365 nm. Os respectivos cromatogramas sobrepostos podem ser visualizados no Anexo I. A discussão será baseada no perfil obtido em 254 nm, o qual obteve o melhor perfil de separação.

Ao total foram detectados 11 picos, sendo destes: 3 foram detectados em todas as frações analisadas, 8 foram detectados no cultivo em condições tradicionais do fungo endofítico TB3, como discutiremos a seguir:

Na fração BuOH do controle do meio foram observados dois picos, o qual está sendo ilustrado na Figura 16. O pico majoritário foi o 1, de Tempo de retenção = 2.882 min. e Área= 88,862% ,na mesma figura também é possível visualizar seu respectivo espectro. Assim como com as frações acetato de etila, os picos serão numerados de acordo com a ordem de detecção.

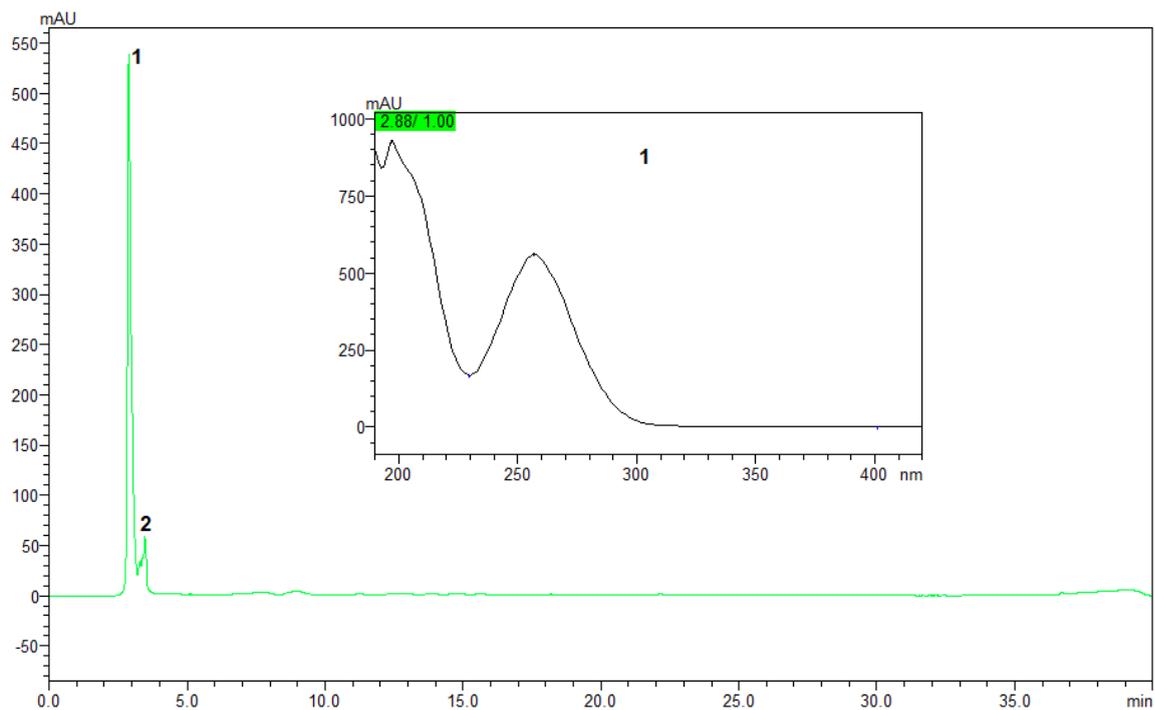


**Figura 16: Cromatograma da Fração 3-C-B, em 254 nm.**

3-C-B- Fração butanólica do controle do meio fermentativo.

1- Tr=2.882 min. e Área= 88,862 % ; 2- Tr= 3,552 min. e Área= 11,138 % .

Assim como visto para a fração 3-C-B, a fração 4-C-M também obteve os mesmos 2 picos, em 254 nm , conforme podemos ver na figura 16 e 17, além da grande semelhança entre o cromatograma das duas frações, também é importante observar os espectros do pico majoritário, o que também corrobora com a sugestão de que é uma substância do próprio meio fermentativo. A concentração do pico majoritário, 1, para essa fração, foi de 63,246 % .

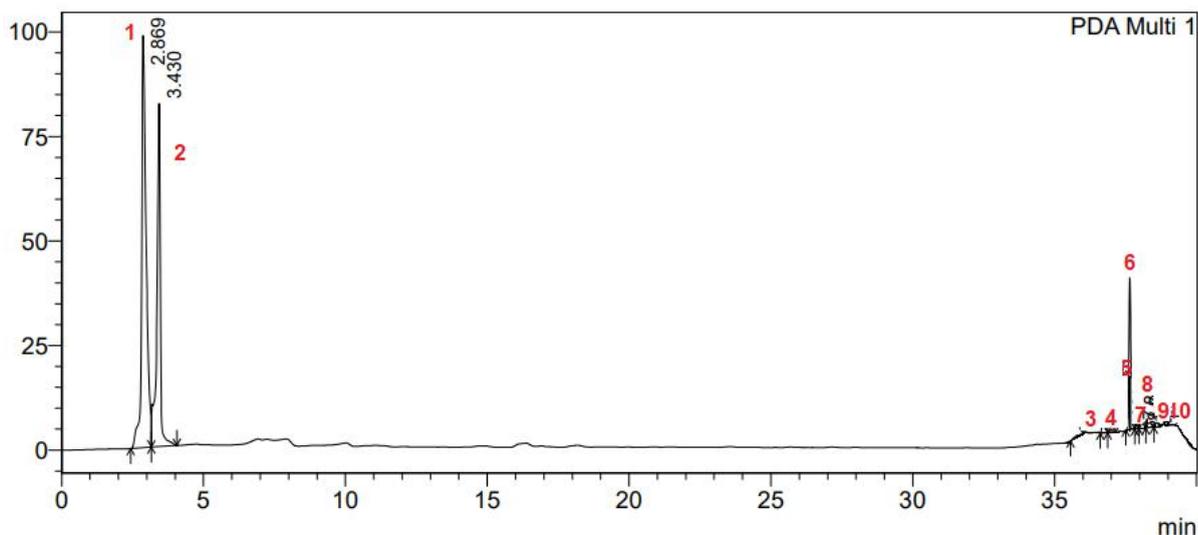


**Figura 17: Cromatograma da Fração 4-C-M, em 254 nm.**

4-C-M- Fração butanólica do controle do lisado de *M.bovis*.

1- Tr=2.880 min. e Área= 63,246 % ; 2- Tr= 3.479 min. e Área= 36.754 %.

Na fração 1-C-TB3 foram detectados 10 picos, entretanto como ilustra a figura 18, os picos entre 3-10 foram em baixíssimas concentrações, com exceção do pico 6, qual obteve área de 9,464 % nesse comprimento de onda. O pico majoritário dessa fração foi o pico 1, tr= 2,869 min, com área de 51,858%, segue o mesmo perfil de substância majoritária que os controles.

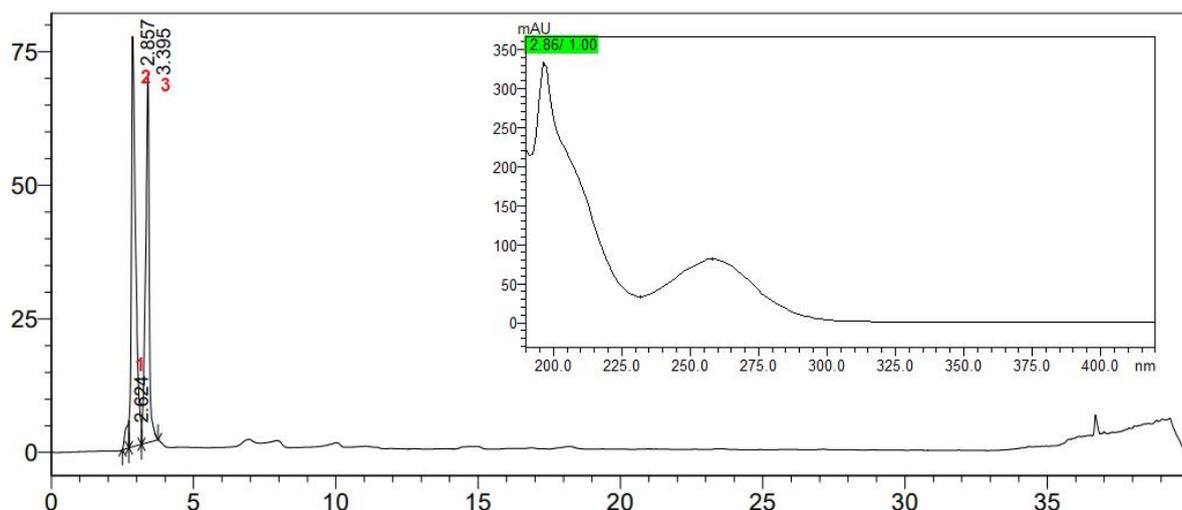


**Figura 18: Cromatograma da fração 1-C-TB3, em 254 nm.**

1-C- TB3 - Fração butanólica do cultivo tradicional.

Picos: 1- Tr= 2.869 min. e área = 51,858 % 2- Tr= 3.430 min. e área =32,546 % 3- Tr= 35.776 min. e área= 0,329 %; 4- Tr=36.697 min. e área= 1,269 %; 5- Tr= 0,233 min. 36.997e área= ;6- Tr= 37.641 min. e área = 9,464 % 7- Tr= 37.868 min. e área=0,974% ; 8- Tr= 38.037 min. e área=0,936%; 9- Tr= 38.292 min. e área= 1,749% e 10 -Tr= 38.571 min. e área= 0,641 % .

A fração 2-C-TB3 apresentou 3 picos, em 254 nm, sendo que o majoritário foi o de  $t_r=2.857$  min; e área de 55,03%, novamente se repete o pico majoritário entre as frações butanólicas, porém o espectro observado para essa fração é diferente do que o visto para a fração 3-C-B e 4-C-M, provavelmente por conta do pico 3, que é detectado logo em seguida, fig. 19.



**Figura 19: Cromatograma da Fração 2-C-TB3, em 254 nm.**

2-C-TB3 - Fração butanólica do cultivo eliciado.

Picos: 1- Tr= 2.624min, área= 2,939 %; 2- 2.857 min e área= 55,036 % ; 3- 3.395 min e área = 42,025 %

A tabela 11 descreve os principais picos detectados em 225 e 254 nm, das frações butanólicas, como podemos ver não existem muitas diferenças entre eles. E todos sugerem

substâncias provenientes do meio fermentativo de arroz, uma vez que foram detectadas em todas as frações BuOH.

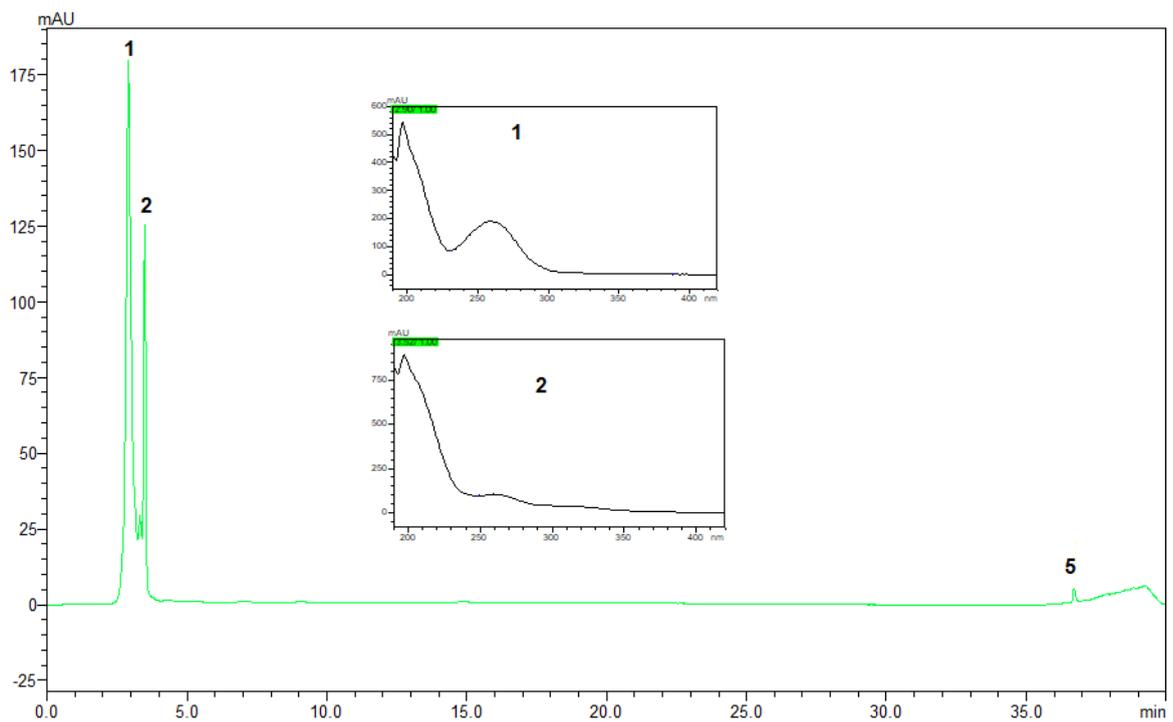
**Tabela 11 - Picos majoritários detectados em 225 e 254 nm das frações butanólicas.**

Picos	1-C-TB3		2-C-TB3		3-C-B		4-C-M	
	Tr (min)	Área (%)						
225 nm								
1	2.863	19	2.853	18.866	2.878	54.258	2.883	63
2	3.263	10.722	3.395	81	3.324	8.527	3.479	37
354 nm								
3	2.869	52	2.857	55	2.882	89	2.883	87.493
4	3.430	33	3.395	42.025	3.552	11.138	3.478	12.507

1-C-TB3 - Fração butanólica do cultivo tradicional; 2-C-TB3- Fração butanólica do cultivo eliciado; 3-C-B- Fração butanólica do controle do meio fermentativo; 4-C-M- Fração butanólica do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*. Tr: Tempo de retenção.

#### 5.4.3. Frações aquosas:

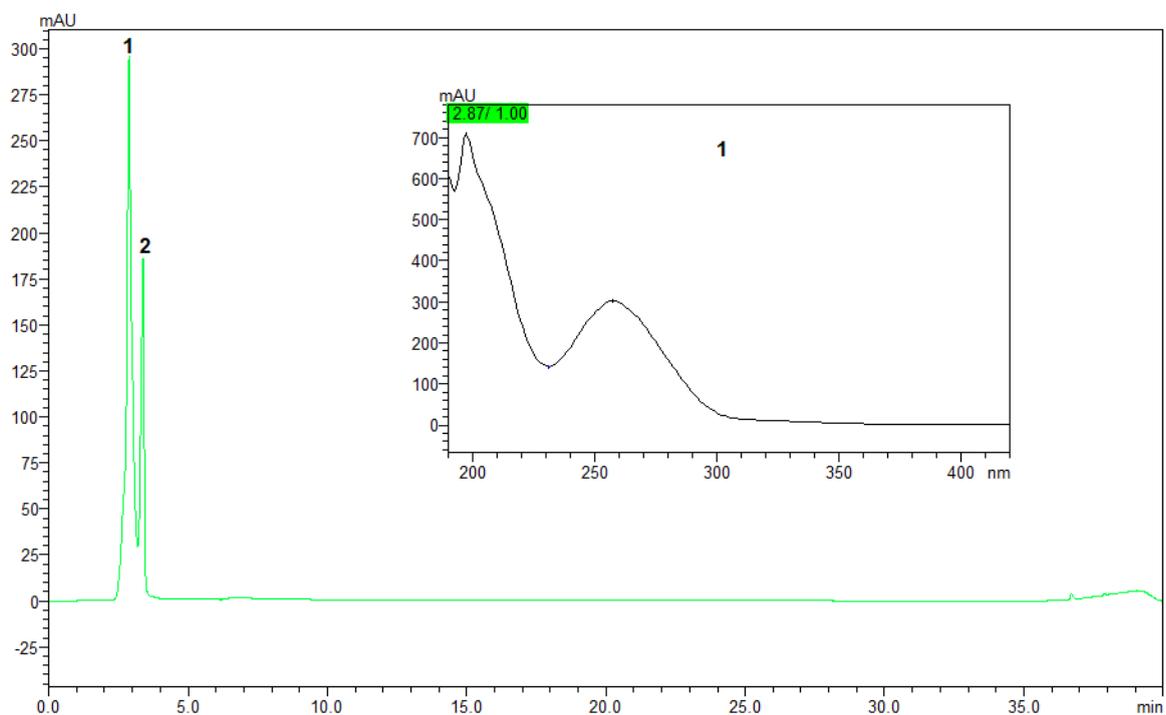
Assim como para as frações butanólicas, os controles obtiveram os mesmos picos, desta vez, para as frações aquosas. Onde o Pico 1 - Tr= 2.903 min e área de 73,480 % para a fração 3-D-B e Tr= 2,875 min e área de 60,988 % na fração 4-D-M, e Pico 2 Tr= 3.520 min e área de 25.709 % para a fração 3-D-B e Tr= 3.381 min e área de 39.012 % na fração 4-D-M. Entretanto, o controle do meio, figura 20, obteve o pico 5, em 36.702min e área de 0,811%, que não foi detectada na fração 4-D-M, figura 21.



**Figura 20: Cromatograma da Fração 3-D-B, em 254nm.**

3-D-B - Fração aquosa do controle do meio fermentativo. Tr= Tempo de retenção.

Picos: 1- 2.903 min. (Área: 73,48%) 2- 3.52 min. (Área= 27,709%) 5- 36.702 min. (Área= 0,811 %).

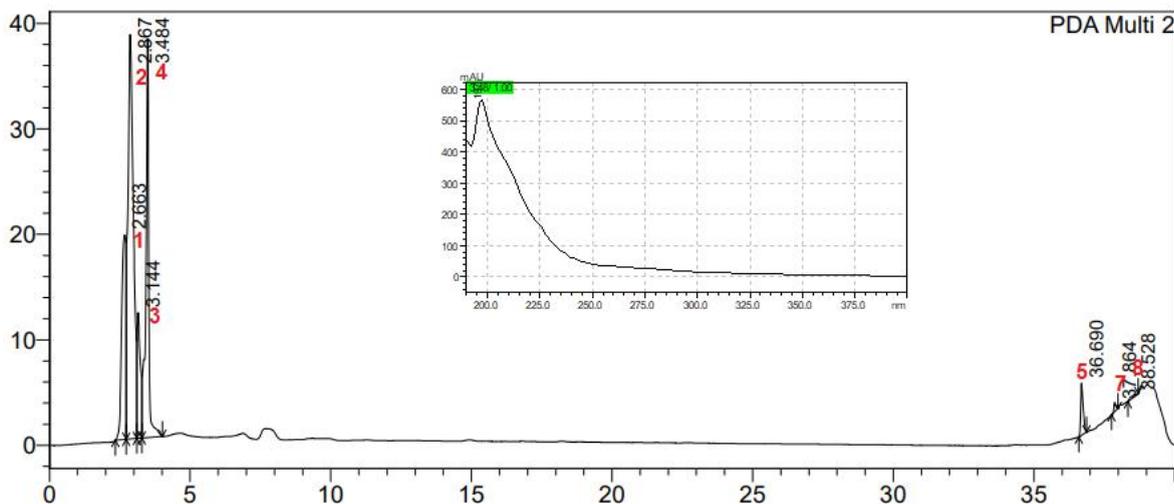


**Figura 21: Cromatograma da fração 4-D-M.**

4-D-M- Fração aquosa do controle do lisado. Tr= Tempo de retenção.

Picos: 1- 2.875 min (área = 60,988 %) ; 2- 3.381 min (área= 39,012%).

A fração aquosa do cultivo tradicional demonstrou 7 picos, em 254 nm. Sendo seu pico majoritário o de tempo de retenção= 2.867 min e área de 45,899%, a figura 22 ilustra os demais picos dessa fração.

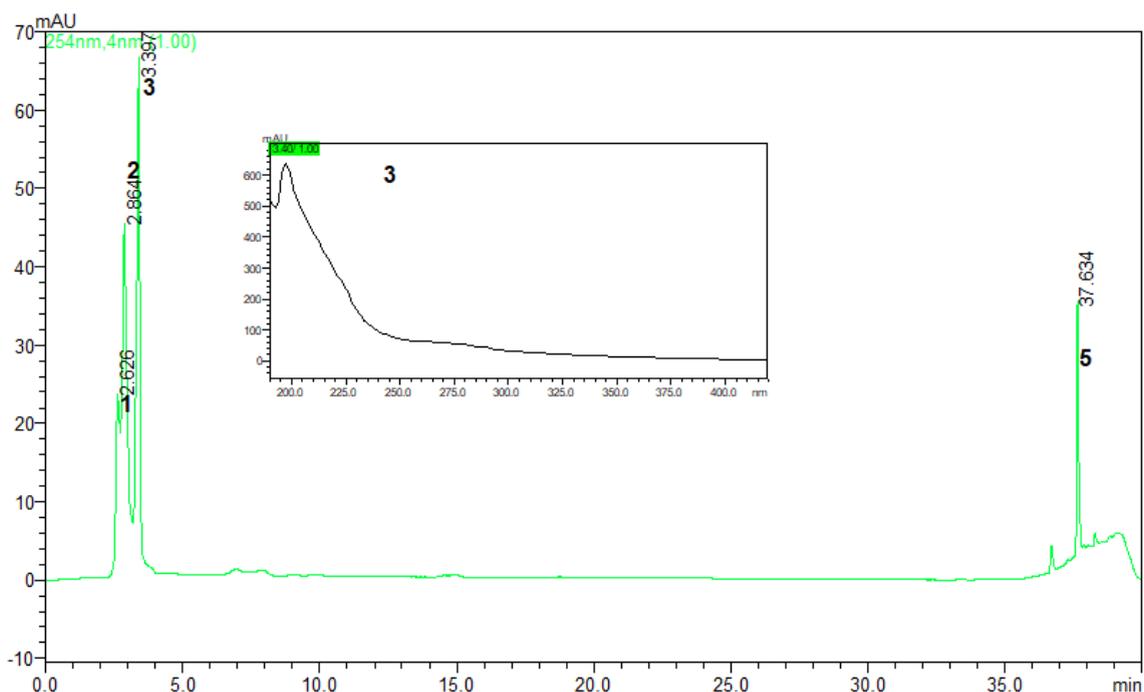


**Figura 22: Cromatograma da Fração 1-D-TB3.**

1-D-TB3 - Fração aquosa do cultivo tradicional. Tr= Tempo de retenção.

Picos: 1- 2.663 min (Área = 18,242%) 2- 2.867 min (área= 45,899% ) 3-3.144 (Área = 8,317%) 4- 3.484 min. (área= 24,292 %) 5- 36.690 min. (área = 2,662 %) 6- 37.864 min (área = 0,347%) 7- 38.528 min (área =0,240%).

Já a fração aquosa do cultivo eliciado obteve 4 picos, em 254 nm, o pico 1 e 2 esteve presente em todas frações aquosas analisadas, sendo o segundo o pico majoritário prevalente, nessa fração não foi diferente, sua concentração foi de 37,954%, conforme ilustra figura 23.



**Figura 23: Cromatograma da fração 2-D-TB3.**

2-D-TB3- Fração aquosa do cultivo eliciado. Tr= Tempo de retenção.

Picos: 1- Tr= 2.626 min. (área= %); 2- Tr= 2.864min (área = %); 3- Tr= 3.397 min. (área= %) e 5 - Tr= 37.634 min.

A tabela 12 traz os picos majoritários das frações aquosas em 254 e 225 nm, nela é possível observar uma similaridade entre os tempos de retenção dos picos detectados, sendo que dos 9 picos com maiores áreas, para cada fração, 4 foram detectados tanto nos cultivos do fungo TB3 e nos controles, 4 foram detectadas na fração 1-D-TB3 e 2-D-TB3 e 1 pico detectado apenas na Fr. 1-D-TB3. Dessa forma, essa análise demonstrou apenas a diferença do perfil químico do meio fermentativo de arroz, com o perfil químico do fungo, não sendo relatada alteração metabólica nas frações aquosas.. Ademais, os cromatogramas sobrepostos estão no Anexo I.

**Tabela 12: Principais picos detectados em 225 e 254 nm das frações aquosas.**

Picos	1-D-TB3		2-D-TB3		3-D-B		4-D-M	
	Tr (min)	Área (%)						
225 nm								
1	2,761	38,871	2,709	31,718	2,891	50,218	2,856	51,306
2	3,176	15,436						
3	3,48	31,189	3,395	55,432	3,488	49,782	3,382	48,694

4	37,616	1,279	37,635	9,236				
5	37,859	3,061	37,877	3,614				
254 nm								
1	2,663	18,242	2,626	14,664	2,903	73,480	2,875	71,179
2	2,867	45,899	2,864	37,954	3,520	25,709	3,381	28,821
3	3,144	8,317	3,397	36,298				
4	37,864	0,347	37,634	11,084				

1-D-TB3 - Fração aquosa do cultivo tradicional; 2-D-TB/3- Fração aquosa do cultivo eliciado; 3-D-B- Fração aquosa do controle do meio fermentativo; 4-D-M- Fração aquosa do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*. Tr: Tempo de retenção.

Através da técnica de CLAE-DAD, foi possível distinguir as substâncias que foram produzidas pelo fungo endofítico TB3, daquelas que eram provenientes do meio de cultivo, ademais, em relação a confirmação da otimização e indução da produção de metabólitos secundários, se faz necessário a aplicação de técnicas mais eficientes, como Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.

### 5.5. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

Os resultados descritos a seguir basearam-se no maior índice de similaridade, e os picos descritos como não identificados referem-se aos compostos que não estão presentes no banco de dados do equipamento. Para melhor compreensão, foram divididos as análises em: frações hexânicas e frações acetato de etila.

#### 5.5.1. Frações Hexânicas

Ao total, foram identificados 12 compostos nas frações hexânicas, os quais foram divididos em 4 grupos: Alcanos lineares, ácidos graxos, silil ésteres e ésteres graxos. A fração 1-A-TB3, obteve 4 picos identificados, e um pico não identificado. A fração 2-A-TB3 obteve 10 picos, destes somente 8 foram identificados. A fração 3-A-B obteve 3 picos, todos identificados e, por fim, a fração 4-A-M obteve 3 picos identificados e 1 pico não identificado, como podemos ver nos cromatogramas ilustrados nos Anexo II. A tabela 13 descreve os compostos majoritários de cada fração analisada, dessa forma temos que, os hidrocarbonetos lineares, em geral, representam o pico majoritário presente no cultivo tradicional, uma vez que todos obtiveram IS = 96, em cada pico detectado, com exceção do pico 5, qual o composto Heneicosano obteve IS= 97. O pico majoritário do cultivo eliciado, por sua vez, foi o Trimetilsilil palmitato, em uma concentração de 71,83% . Em relação aos controles, o controle do meio fermentativo (3-A-B), teve como composto majoritário o ácido

graxo, ácido esteárico, sua concentração foi de 41,17%, enquanto que o controle do lisado (4-A-M) teve o ácido palmítico, concentração de 52,03% .

**Tabela 13: Compostos Identificados nas frações HEX e concentração:**

Frações Hexânicas					
Constituintes	Fórmula	Concentração (%)			
		1-A-TB3	2-A-TB3	3-A-B	4-A-M
<b>Ácidos Graxos</b>					
ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	8,0 %	2,41 %	35,78 %	52,03 %
Ácido mirístico	$C_{17}H_{36}O_2$	-	0,83 %	-	-
Ácido esteárico	$C_{21}H_{40}O_2$	-	6,66 %	41,17 %	32,66%
<b>Hidrocarbonetos lineares</b>					
Heneicosano	$C_{21}H_{44}$	29,95%	-	-	-
Nonacosano	$C_{29}H_{60}$	20,34%	-	-	-
Tetratetracontano	$C_{44}H_{90}$	11,63%	-	-	-
Hexacosano	$C_{26}H_{54}$	24,87%	-	-	-
<b>Silil Éster</b>					
ácido trans-9-octadecenoico	$C_{21}H_{42}O_2Si$	-	3,98 %	23,05 %	15,21%
Trimetilsilil pentadecanoato	$C_{17}H_{36}O_2Si$	-	2,85%	-	-
Trimethylsilyl palmitate	$C_{19}H_{40}O_2Si$	-	71,83 %	-	-
<b>Ésteres graxos</b>					
linoleato de etila	$C_{20}H_{36}O_2$	-	0,98%	-	-
oleato de etila	-	-	5,18%	-	-

1-A-TB3 - Fração hexânica do cultivo tradicional; 2-A-TB3- Fração hexânica do cultivo eliciado; 3-A-B- Fração hexânica do controle do meio fermentativo; 4-A-M- Fração hexânica do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*.

### 5.5.2. Frações Acetato de Etila

Ao total, foram identificadas apenas 3 compostos nas frações acetato de etila, sendo que destas, 1 foi identificada nas frações hexânicas. Dessa forma temos: A fração 1-B-TB3

apresentou 2 picos, todos identificados. A fração 2-B-TB3 também apresentou 2 picos, ambos foram identificados. A fração 3-B-B apresentou 2 picos, mas somente um foi identificado e por fim, a fração 4-B-M, apresentou 2 picos identificados. A tabela 14, nos mostra a concentração de cada composto identificado.

**Tabela 14: Compostos Identificados nas frações AcOEt e concentração**

<b>Frações Acetato de Etila</b>					
<b>Constituintes</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Concentração :</b>			
		1-B-TB3	2-B-TB3	3-B-B	4-B-M
<b>Ácidos Graxos</b>					
ácido hexadecanoico	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	31,61%	-	-	52,03 %
Di (2 - etilhexil) ftalato	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	68,39%	91,81%	93,72 %	76,92%
<b>Organossulfurados</b>					
Dimetil sulfona	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	-	8,19 %	-	-

1-B-TB3 - Fração Acetato de etila do cultivo tradicional; 2-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo eliciado; 3-B-B - Fração acetato de etila do controle do meio fermentativo; 4-B-M - Fração acetato de etila do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*.

**Tabela 15: Todos os compostos identificados e tempo de retenção (min).**

	1-A-TB3	2-A-TB3	3-A-B	4-A-M	1-B-TB3	2-B-TB3	3-B-B	4-B-M
ácido hexadecanoico	44.615	42.899	44.520	44.587	44.576	-	-	44.575
di (2 - etilhexil) ftalato	-	-	-	-	58.699	58.692	58.700	58.685
Dimetil Sulfona	-	-	-	-	-	4.305	-	-
Ácido mirístico	-	38.184	-	-	-	-	-	-
9-12 Ácido octadecadienóico	-	49.512	49.526	49.520	-	-	-	-
Heneicosano	62.247	-	-	-	-	-	-	-
Nonacosano	64.927	-	-	-	-	-	-	-
Tetratetracontano	59.802	-	-	-	-	-	-	-
Hexacosano	68.204	44.574	-	-	-	-	-	-
ácido trans-9-octadecenoico	-	49.647	49.675	49.661	-	-	-	-
Trimetilsilil palmitato	-	44.574	-	-	-	-	-	-
Trimetilsilil pentadecanoato	-	41.436	-	-	-	-	-	-

linoleato de etila	-	48.011	-	-	-	-	-	-
oleato de etila		48.176						

1-A-TB3 - Fração Hexânica (HEX) do cultivo tradicional; 2-A-TB3 - Fr. HEX do cultivo eliciado 3-A-B - Fr. HEX do controle do meio fermentativo; 4-A-M- Fr. Hex do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*; 1-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo tradicional; 2-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo eliciado; 3-B-B - Fração acetato de etila do controle do meio fermentativo; 4-B-M - Fração acetato de etila do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*.

## 5.6.Substâncias encontradas:

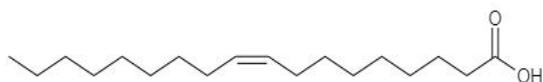
### 5.6.1.Ácidos Graxos

Já foram relatados mais de 300 compostos voláteis isolados de fungos endofíticos, eles podem ser originados da via biossintética dos metabólitos primários ou secundários, mas também da oxidação metabólica da glicose. As principais classes químicas são: hidrocarbonetos simples, terpenos, aldeídos, cetonas, ésteres (MORAES *et al.* 2020).

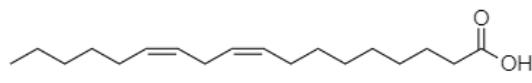
A produção de ácidos graxos está relacionada a um mecanismo de defesa de microrganismos. Anisha e Radhakrishnan (2017) isolaram várias espécies de fungos endofíticos, dentre elas seis produziram os seguintes ácidos graxos: o ácido linoléico, ácido oléico, ácido mirístico, ácido n-hexadecanoico, éster metílico de ácido palmítico e linoleato de metila (ANISHA; RADHAKRISHNAN; 2017 *apud* TANVIR, *et al.* 2018), cuja respectivas estruturas estão ilustradas na figura 24.

Através das análises por CG-EM, foi possível identificar 3 compostos diferentes da classe dos ácidos graxos, sendo que dois representaram os picos majoritários de duas frações analisadas. Dessa forma, temos que: Ácido hexadecânico, qual tem sido relatado quanto sua atividade antimicobacteriana, foi o composto majoritário da fração 4-A-M, e sua concentração obtida foi de 52,03 %. Por outro lado, o composto identificado como ácido 9-12 Ácido octadecadienóico, foi o majoritário da fração 3-A-B, 41,17 %, e também tem sua atividade biológica descrita, como: atividade anti-inflamatória, hepatoprotetora, anti acne, anti-histamínica, entre outras (KANJANA, *et al.*, 2019).

1 Ácido oleico

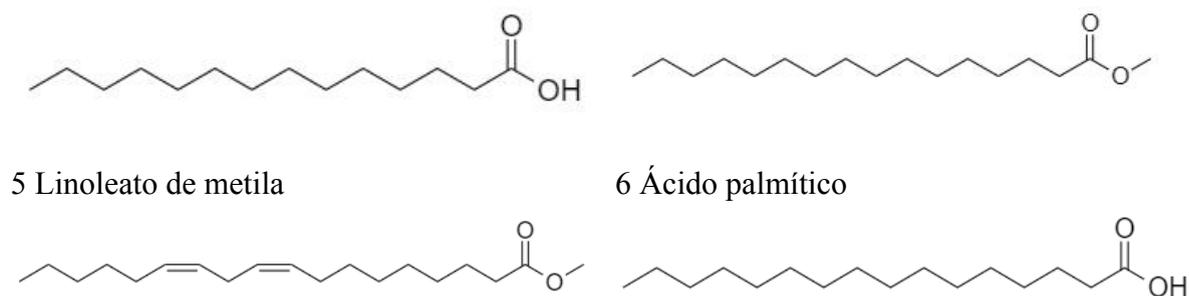


2 Ácido linoleico



3 Ácido mirístico

4 Metil palmitato



**Figura 24: Estruturas de ácidos graxos produzidos por fungos endofíticos.**  
Estrutura by ChemDraw®

### 5.6.2. Hidrocarbonetos lineares

Os fungos endofíticos possuem a capacidade de produzir misturas de substâncias à base de carbono, as quais são conhecidas como compostos orgânicos voláteis (COVs), alguns estudos têm destacado dos COVs como agente antimicrobiano. O heneicosano é um exemplo de COV e foi identificado na fração 1-A-TB3, sendo este o composto majoritário com concentração de 29,95%, e IS de 97%, o qual já foi descrito quanto à sua atividade antimicrobiana. Esses compostos estão sendo estudados quanto a sua capacidade pesticida, uma solução para agricultura sustentável (HARADA *et al.*, 2002; KADDES *et al.*, 2019).

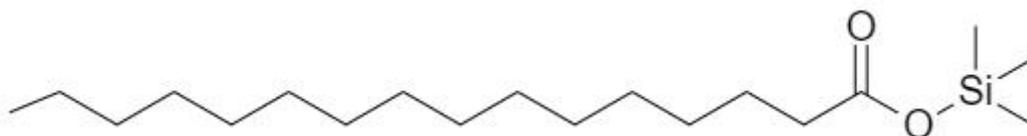
Um estudo isolou o composto heneicosano e realizou teste contra várias cepas de bactérias e fungos patogênicos, e demonstraram que esse hidrocarboneto possui excelente atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae* e *Aspergillus fumigatus*, na concentração de 10 µg / mL (VANITHA *et al.*, 2020).

Por outro lado, na fração HEX do cultivo eliciado não foram identificados hidrocarbonetos, o que sugere que o eliciador biológico utilizado pode ter inibido a produção dessa classe de compostos químicos pelo fungo ou, a concentração da amostra era muito baixa e, portanto, não foi suficiente para detecção pelo equipamento, vale frisar aqui que através da partição líquido-líquido foi obtido apenas 0,003g de fração HEX do cultivo eliciado, e mesmo realizando a pesagem da amostra por diluição, é difícil garantir que ao final foi alcançado a concentração de 1 mg/ mL desejada.

### 5.6.3. Ésteres de silil

A identificação de ésteres silil sugere uma reação das amostras com a fase estacionária, ou pela presença de algum contaminante. A presença de grupamentos silanóis livres na superfície da fase estacionária são os responsáveis pela interação do analito com a fase estacionária (BORGES, 2015).

O Trimetilsilil éster de ácido palmítico (Figura 25) composto identificado na Fr. 2-A-TB3, sendo o de maior concentração, 71,83 %, sua fórmula química é  $C_{19}H_{40}O_2Si$ , é formado por um grupamento trimetilsilil  $C_3H_9Si$ , qual provavelmente provêm de um efeito reativo da amostra com a fase estacionária, ligado ao Ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), qual já foi descrito como sendo um agente antibacteriano (HARADA *et al*, 2002; PUBCHEM; KANJANA, *et al.*, 2019).



**Figura 25: Estrutura do Trimetilsilil éster de ácido palmítico**  
Estrutura by ChemDraw®

Através das técnicas de CG-EM, foram identificados 8 compostos produzidos pelo fungo endofítico TB3, desses 4 foram identificados apenas no cultivo tradicional, sendo os compostos químicos da classe dos hidrocarbonetos lineares, tendo como composto majoritário o heneicosano, que possui atividade antimicrobiana descrita. Os outros 4 compostos foram identificados no cultivo eliciado, o composto de concentração majoritária identificado foi o ácido palmítico, o qual já foi relatado quanto sua atividade antimicrobiana (MONA, 2018; KANJANA, *et al.* 2020).

A tabela 16 relaciona as substâncias que estão sendo sugeridas como eliciadas com suas propriedades já descritas na literatura, quando produzidas por fungos.

**Tabela 16: Substâncias (S) eliciadas produzidas pelo fungo TB3 suas propriedades.**

S. Eliciada:	Fungo:	Propriedade relatada:	Referência:
Ácido palmítico	<i>Aspergillus fumigatus</i>	antimicobacteriana	(YAHAYA <i>et al.</i> 2017)
	<i>A. arcoverdensis</i>	anti-inflamatório	(SKANDA <i>et al.</i> 2021)
	<i>Penicillium janthinellum</i>	antioxidante e antifúngico.	(KANJANA <i>et al</i> 2019)
Ácido mirístico	<i>P. janthinellum</i>	Antioxidante	(KANJANA <i>et al</i> 2019)
Linoleato de etila	<i>A. arcoverdensis</i>	Anti-inflamatório	(SKANDA <i>et al.</i> 2021)

#### 5.6.4. Organossulfurados

Os fungos são capazes de produzir uma ampla variedade de moléculas com estruturas complexas e atividade farmacológica. Além da produção de todos os compostos aqui citados, também produzem os organossulfurados. Esses são compostos orgânicos, ou seja, possuem uma cadeia carbônica e, pelo menos um carbono está ligado a um enxofre. De acordo com suas características químicas, ainda podem ser divididos em peptídeos, dissulfetos, policetídeos, híbridos e terpenoídeos (FAN *et al.*, 2022).

Não foram encontrados relatos da produção de dimetil sulfona (DMSO<sub>2</sub>) por fungos, composto identificado através do CG-EM da Fração 2-A-TB3. Provavelmente, trata-se de um contaminante, uma vez que é um bom solvente, por conta de suas características físicas (CLARK *et al.*, 2008).

#### 5.6.5

Através das técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), foi sugerida a presença de duas substâncias eliciadas na fração hexânica e duas substâncias nas frações acetato de etila, à respeito das frações hexânicas, os resultados estão de acordo com os resultados obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a qual foram identificadas 4 substâncias eliciadas, sendo o ácido palmítico o composto majoritária na Fr. HEX do cultivo eliciado. Assim como nas CCDs, o perfil químico das frações aquosas e butanólicas, analisadas através de CLAE-DAD, demonstraram as substâncias produzidas pelo fungo endofítico, as diferenciando daquelas provenientes do meio fermentativo de arroz. E, por fim, por meio de CCD, como já citado, foi possível sugerir a presença de duas substâncias eliciadas, nas frações AcOEt, e foi possível sugerir uma substâncias através da CLAE-DAD, sendo necessário a aplicação de técnicas mais sensíveis e eficientes, como Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas. Diante disso, vemos que as técnicas analíticas foram satisfatórias e os resultados obtidos foram homogêneos.

### 6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o lisado de *Mycobacterium bovis* conseguiu eliciar o fungo endofítico TB3, uma vez que através das técnicas analíticas aplicadas notou-se modificações metabólicas entre o cultivo tradicional e o cultivo eliciado.

Das substâncias eliciadas, por cromatografia em camada delgada foi possível sugerir a presença de 4 substâncias eliciadas, 2 na fração HEX e 2 na fração AcOEt. Através da CLAE-DAD, só foi possível detectar uma substância e, através do CG-EM, foram identificados 4 compostos induzidos, na fração HEX, sendo o ácido palmítico, o composto de concentração majoritária.

A perspectiva futura deste trabalho será dar continuidade através da análise das substâncias isoladas, onde serão realizados testes quanto sua atividade biológica e, elucidação estrutural das substâncias que obtiverem os resultados mais promissores.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, A.M.; BEHR , M.A.; Evolution and Strain Variation in BCG. **Adv Exp Med Biol.** 2017;1019:155-169. doi: 10.1007/978-3-319-64371-7\_8. PMID: 29116634.

ABOZENADAH, H. *et al.* Consumer Chemistry: How Organic Chemistry Impacts Our Lives. Chapter 6: A Brief History of Natural Products and Organic Chemistry. CC.BY-NC.SA. 2017. Disponível em: <https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch105-consumer-chemistry/ch105-chapter-6-hydrocarbons/>. Acesso em agosto de 2022.

ABULFATHI, A.A. *et al.*, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rifampicin in Human Tuberculosis. *Clin Pharmacokinet.* 2019 Sep;58(9):1103-1129. doi: 10.1007/s40262-019-00764-2. PMID: 31049868.

AKONE, S. H. *et al.*, (2019). Epigenetic modification, co-culture and genomic methods for natural product discovery. **Physics. Sci. Rev.** Vol. 4, 4<sup>a</sup>ed. doi: 10.1515/psr-2018-0118.

ALY, A.H. *et al.*, Fungal endophytes - secret producers of bioactive plant metabolites. **Pharmazie.** 68(7). p. 499-505. 2019. PMID: 23923629.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Farmacopéia brasileira, 6<sup>a</sup> edição. Volume 2. Brasília- DF. Brasil. 2019.

ARBEX, M.A. *et al.*, Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. **J Bras Pneumol.** 2010;36(5):626-640.

BARTHOLOMAY, P. *et al.*, Qualidade da assistência à tuberculose em diferentes níveis de atenção à saúde no Brasil em 2013. **Rev Panam Salud Publica.** 2016;39(1):3–11.

BERTRAND, S. *et al.*, Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**. Vol. 32. 6<sup>a</sup>ed. p. 1180-1204. 2014.

BEZERRA, V.H.S. *et al.*, Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. **Molecules**. 2021 Nov 22;26(22):7062. doi: 10.3390/molecules26227062. PMID: 34834154; PMCID: PMC8623497.

BISHOP, P.J; NEUMANN, G.; The history of the Ziehl-Neelsen stain. Occasional survey. **Tubercle**. Volume 51, Issue 2, 1970, p. 196-206. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0041-3879\(70\)90073-5](https://doi.org/10.1016/0041-3879(70)90073-5)>.

BLOOM, B.R. *et al.*, Tuberculosis. Major Infectious Diseases. 3rd ed. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2017 Nov 3. Chapter 11. PMID: 30212088.

BODE, H.B. *et al.*, Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chembiochem**. Vol. 3. pp. 619-627. 2002. Alemanha. PMID: 12324995.

BOIRE, N.A. *et al.*, Tuberculosis: From an Untreatable Disease in Antiquity to an Untreatable Disease in Modern Times. **J Anc Dis Prev Rem**. 2013. doi:10.4172/2329-8731.1000106.

BORGES E.M., Silica, Hybrid Silica, Hydride Silica and Non-Silica Stationary Phases for Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 53, Issue 4, April 2015, Pages 580–597.

BRENNAN, P.J; NIKAIDO, H.; The envelope of mycobacteria. **Annu Rev Biochem**. 1995;64:29-63. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333. PMID: 7574484.

BRASIL \*. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Tratamento Diretamente Observado (TDO) Da Tuberculose Na Atenção Básica. 1<sup>a</sup> edição. Brasília- DF. 2011. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tratamento\\_diretamente\\_observado\\_tuberculose.pd](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tratamento_diretamente_observado_tuberculose.pd). Acesso em agosto de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção à Saúde Básica. Manual técnico para o controle da tuberculose: Cadernos de Atenção Básica. Série Cadernos de Atenção Básica – Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 148. BRASÍLIA / DF – 2002. Disponível

em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno\\_atencao\\_basica.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_atencao_basica.pdf). Acesso em agosto de 2022.

BRASIL. Ministério da saúde. **SI-PNI** (Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunização). c2012. Disponível em: [SI-PNI Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunização \(datasus.gov.br\)](#). Acesso em 12 de agosto de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2ª Edição. Brasília - DF. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 264**, de fevereiro de 2020. Brasília- DF. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Vigilância epidemiológica da tuberculose: Análise de indicadores operacionais e epidemiológicos a partir da base de dados do SINAN versão 5.0. Brasília-DF. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis**. Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica. – Brasília, 2014. 56 p. : il. ISBN 978-85-334-2133-2.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Tuberculose: Como prevenir a tuberculose? [online]. Brasília-DF. 2022. Acesso em agosto de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Tuberculose. Número especial. 2022. ISSN: 9352-7864.

BUDDLE, B.M *et al.*, Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. **Transbound Emerg Dis**. 2013 Nov;60 Suppl 1:136-46. doi: 10.1111/tbed.12092. PMID: 24171859.

BURKE, D.S.; Of postulates and peccadilloes: Robert Koch and vaccine (tuberculin) therapy for tuberculosis. **Vaccine**. 1993;11(8):795-804. doi: 10.1016/0264-410x(93)90354-z. PMID: 8356842.

CAUDAL, F. *et al.*, Impact of Co-culture on the Metabolism of Marine Microorganismos. **Mar drugs**. 2022. PMID: [35200682](#). doi: [10.3390/md20020153](#).

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M., Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. **Clin Microbiol Infect.** 2014 Mar;20(3):196-201. doi: 10.1111/1469-0691.12555. PMID: 24450600.

CHAMKHI, I. *et al.*, Plant-microbial interaction: The mechanism and the application of microbial elicitor induced secondary metabolites biosynthesis in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry.** Vol. 167. p. 267-295. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.001>.

CHO, T. *et al.*, A review of the BCG vaccine and other approaches toward tuberculosis eradication. **Hum Vaccin Immunother.** 2021 Aug 3;17(8):2454-2470. doi: 10.1080/21645515.2021.1885280. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33769193; PMCID: PMC8475575.

CHURCHYARD, G. *et al.*, What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **The Journal of Infectious Diseases**, Volume 216, Issue suppl\_6, 1 October 2017, Pages S629–S635. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix362>.

CLARK, *et al.* Why are dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone such good solvents? **J Mol Model** 14, 689–697 (2008). <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0279-y>.

CORRÊA, R.C. *et al.*, Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 2014 Oct;41(10):1467-78. doi: 10.1007/s10295-014-1496-2. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25117531.

DALCOLMO, M.P.; Treatment of Drug-Sensitive and Drug-Resistant Forms of Tuberculosis. **Pulmão RJ** 2012;21(1):55-59.

DINC, G.; ARIKAN, A.; The interview with Robert Koch held by Huseyin Hulki and the Ottoman delegation on tuberculin therapy. **Vaccine**, Volume 37, Issue 17. 2019. p.2422-2425. ISSN 0264-410X. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.038>.

DO NASCIMENTO, J. S. *et al.*, Natural trypanocidal product produced by endophytic fungi through co-culturing. **Folia Microbiol.** V. 65. p. 323 -328. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00727-x>.

EUZÉBY, J.P.; List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 47. p. 590-592. 1997.; DOI: 10.1099/00207713-47-2-590.

FAN, Y. *et al.*, Sulfur-Containing Compounds from Endophytic Fungi: Sources, Structures and Bioactivities. **J Fungi** (Basel). 2022. 8(6):628. doi: 10.3390/jof8060628. PMID: 35736111; PMCID: PMC9224594.

FATIMA, S. *et al.*, Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. **Life Sci**. 2020 Jul 1;252:117594. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117594. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32305522.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Ministério da Saúde. Farmanguinhos rifampicina-isoniazida - pirazinamida - etambutol. Bula online. 2016. Disponível em: [https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2016/08/rifampicina\\_isoniazida\\_pirazinamida\\_etambutol\\_profissionais.pdf](https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2016/08/rifampicina_isoniazida_pirazinamida_etambutol_profissionais.pdf). Acesso em agosto de 2022.

GALAGAN, J.E. *et al.*, Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**. Vol. 22. pp- 1105-1120. doi: 10.1038/nature04341. PMID: 16372000.

GALLEGO-JARA J. *et al.*, Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. **Molecules**. 2020. Vol. 25 ed.24. doi: 10.3390/molecules25245986. PMID: 33348838; PMCID: PMC7767101.

GRADMANN, C.; Money and microbes: Robert Koch, tuberculin and the Foundation of the Institute for Infectious Diseases in Berlin in 1891. **Hist Philos Life Sci**. 2000;22(1):59-79. PMID: 11258101.

GRADMANN, C.; Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. **Microbes Infect**. 2006 Jan;8(1):294-301. doi: 10.1016/j.micinf.2005.06.004. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16126424.

GUPTA, S. *et al.*, Epigenetic-based developments in the field of plant endophytic. **South African Journal of Botany**. Vol. 134. p. 394-400. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.019>.

GUPTA, R.S. *et al.*, Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four

Novel, Genera. **Microbiol Sec.Evolutionary and Genomic Microbiology**. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>.

GUIMARÃES, D.O.; Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (*Asteraceae*). 208f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP. 2006. Disponível em: [https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde09052007103936/publico/2006\\_dissertacao\\_denise\\_oliveira\\_guimaraes.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde09052007103936/publico/2006_dissertacao_denise_oliveira_guimaraes.pdf). Acesso em junho de 2022.

GODEL,A.; MARCHOU, B.; Rifampicina. **Elsevier Masson SAS**. Tratado de Medicina. Vol. 11. 2a ed. 2007. ISSN 1636-5410. Doi: 10.1016/1636-5410(07)70644-X.

GOULD, K.; Antibiotics: from prehistory to present day. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Vol. 71. ed. 3. 2016. p. 572-575. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>.

HAEL-CONRAD, V. *et al.*, The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. Vol. 241. p. 120-127. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.025>.

HALDER, M. *et al.*, Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. **Eng Life Sci**. 2019; 19:880–895. 2019. Doi: 10.1002/elsc.201900058.

HARADA H, *et al.*, Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. **Anticancer Research**. 2002 Sep-Oct;22(5):2587-2590. PMID: 12529968.

HARBORNE, J.B.; *Phytochemical Methods – A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, **Chapman and Hall**: London, 1984, p. 49, second edition. Acesso em junho de 2022.

HARTLEY, S.E; GANGE, A.C.; Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. **Annu Rev Entomol**. 2009;54:323-42. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090614. PMID: 19067635.

HERZMANN C. *et al.*, Pulmonale Immunität bei Tuberkulose [Pulmonary Immune Mechanisms in Tuberculosis]. **Pneumologie**. 2018 Jul;72(7):493-502. German. doi: 10.1055/s-0043-122961. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29270952.

History of World TB day. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tb/worldtbdays/history.htm>>. Acesso em 31 de julho de 2022.

JING, M. *et al.*, Comparative Genomics of Three Aspergillus Strains Reveals Insights into Endophytic Lifestyle and Endophyte-Induced Plant Growth Promotion. **J Fungi (Basel)**. V. 8. 2022. doi: [10.3390/jof8070690](https://doi.org/10.3390/jof8070690).

KADDES, A. *et al.* Endophytic Fungal Volatile Compounds As Solution For Sustainable Agriculture. **Molecules**. V. 24, n. 6. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24061065>.

KANJANA, M. *et al.* GC-MS Analysis of Bioactive Compounds of Endophytic Fungi Chaetomium globosum, Cladosporium tenuissimum and Penicillium janthinellum. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 2019. 2:1. Disponível em <https://www.omicsonline.org/open-access-pdfs/gcms-analysis-of-bioactive-compounds-of-endophytic-fungi-ichaetomium-globosumi-icladosporium-tenuissimum-andi-penicilliu.pdf>.

KAUFMANN, S.H., Koch's dilemma revisited. **Scand J Infect Dis**. 2001;33(1):5-8. doi: 10.1080/003655401750064004-1. PMID: 11234978.

KEJA, K. *et al.*, Expanded programme on immunization. **World Health Stat Q**. 1988;41(2):59-63. PMID: 3176515.

KOCH, R.; Die aetiologie der tuberkulose. 2010. Disponível em: <<https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/5163/428-445.pdf>>.

KRADIN, R.I. *et al.*, Diagnostic Pathology of Infectious Disease. General Principles in the Diagnosis of Infection. 2ª ed. **Elsevier**. 2018. ISBN 9780323445856.

LARB. Liga Acadêmica de Radiologia da Bahia. Rifampicina. Sanar Yellow-book. p 1-11. Disponível em: <<https://www.sanarmed.com/resumo-de-rifampicina-ligas>>. Acesso em agosto de 2022.

LANGE, C. *et al.*, 100 years of Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin. **Lancet Infect Dis.** 2022 Jan;22(1):e2-e12. doi: 10.1016/S1473-3099(21)00403-5. Epub 2021 Sep 7. PMID: 34506734.

LÁU, H.D.; Teste Intradérmico no Diagnóstico da Tuberculose em Búfalos. **Embrapa Amazônia Oriental.** 2006. Belém - PA. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37707/1/Doc250.pdf>>.

LI, C.Y. *et al.*, Natural products development under epigenetic modulation in fungi. **Phytochem Rev** 19, 1323–1340. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09684-7>.

LIGON-BORDEN, B.L.; Biography: Selman A. Waksman, PhD (1888-1973): pioneer in development of antibiotics and Nobel Laureate. **Semin Pediatr Infect Dis.** 2003 Jan;14(1):60-3. doi: 10.1053/spid.2003.127220. PMID: 12748924.

LIMA, C.H.S. *et al.*, Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose. **Revista Virtual da Química.** 3 (3). p. 159-180. 2011.

MACAÉ. Prefeitura Municipal de Macaé. Secretária Adjunta de Atenção Básica. Protocolo de Enfermagem na Atenção Primária à Saúde no Município de Macaé. Macaé -RJ. 2020. Disponível em: [1636696454.pdf \(macaé.rj.gov.br\)](1636696454.pdf).

MAIMONE, N.M. *et al.*, Elicitation of Streptomyces lunalinharesii secondary metabolism through co-cultivation with Rhizoctonia solani. **Microbiological Research.** Vol. 251. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126836>.

MARTINI, M. *et al.*, The Never-ending story of the fight against tuberculosis: from Koch's bacillus to global control programs. **J. Prev. Med. HYG.** 2018. 59: E241.E247. Itália. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30397682/>.

MIGLIORI, G.B. *et al.*, History of prevention, diagnosis, treatment and rehabilitation of pulmonary sequelae of tuberculosis. **La Presse Médicale.** Volume 51. Issue 3, 2022, 104112, ISSN 0755-4982.

MORAES, G.K.A., *et al.* Compostos Orgânicos Voláteis de Fungos Endofíticos e suas Aplicações Biotecnológicas. **Rev. Virtual da Química.** p. 1498-1510. ISSN 1984-6835.

MORRISON, S.; MCGEE, S.L.; 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. **Adipocyte**. 2015. Vol. 4. p. 295-302. PMID: 26451286. doi: 10.1080/21623945.2015.1040612.

NAGARAJAN, K., *et al.*, Recent Developments in Metabolomics Studies of Endophytic Fungi. **J Fungi** (Basel). 2021 Dec 29;8(1):28. doi: 10.3390/jof8010028. PMID: 35049968; PMCID: PMC8781825.

NAMDEO, A.G.; Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A review. **Pharmacognosy Reviews**. Vol 1, ed<sup>a</sup> 1. 2007. p. 67-69.

NAIR, D.N.; PADMAVATHY, S.; Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **Scientific World Journal**. 2014 Jan 22;2014:250693. doi: 10.1155/2014/250693. PMID: 24587715; PMCID: PMC3920680.

NETT, M., *et al.*, Genomic basis for natural biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Nat. Prod. Rep.** Vol. 26. 2009. pp 1362-1384. DOI: 10.1039/b817069j.

NEWMAN, D.V; CRAGG, G.M.; Natural Products as Sources of New Drugs over Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83. 770-803. 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

Paul Ehrlich – Facts. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2022. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/ehrlich/facts/>>. Acesso em 31 de julho de 2022.

PATEL, Z.M. *et al.*, Role of fungal elicitors in plant defense mechanisms. **Molecular Aspects of Plant Microbes in Agriculture**. 2020. p. 143.-158. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00012-2>

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A.T.; Virtual Screening Of Bioactive Compounds: Concepts And Applications. *Química Nova* [online]. 2018, v. 41, n. 6 , p. 662-677. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170210>. Acesso em junho de 2022.

PINEDO-RIVILLA, C. *et al.*, Cryptic Metabolites from Marine-Derived Microorganisms Using OSMAC and Epigenetic Approaches. **Mar Drugs**. Vol. 20. 2022. doi: 10.3390/md20020084. PMID: 35200614; PMCID: PMC8879561.

PRAJAPATI, J. *et al.*, Endophytic fungi: A treasure trove of novel anticancer compounds. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery** .Vol 2. 2021. ISSN 2590-2571.

QIU, M. *et al.*, Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from Ginkgo biloba L. **Ann Microbiol.** Vol. 60. p. 143–150. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0016-5>.

RABAHI, M.F. *et al.*, Tuberculosis treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2017, v. 43, n. 06. p. 472-486. ISSN 1806-3756. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000388>.

RAIMI, A.; ADELEKE, R.; Bioprospecting of endophytic microorganisms for bioactive compounds of therapeutic importance. **Arch Microbiol.** Vol. 203, p. 1917–1942. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02256-z>

REYES, F. *et al.*, Editorial: Strategies for the Discovery of Fungal Natural Products. **Front Microbiol.** 13: 897756. 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.897756. PMID: 35602085; PMCID: PMC9117758.

RIBEIRO, A.S; PAMPHILE, J.A.; Endophytic microorganisms and their biotechnological potential. **Revista Uningá**. Vol. 29, n<sup>o</sup>3, p. 88-93. 2017.

ROMANO, S. *et al.*, Extending the "One Strain Many Compounds" (OSMAC) Principle to Marine Microorganisms. **Mar Drugs**. 2018. 23;16(7):244. doi: 10.3390/md16070244. PMID: 30041461; PMCID: PMC6070831.

ROSSETTI, M.L.R. *et al.*, Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**. 2002, v. 36, n. 4, p. 525-532. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-89102002000400021>.

RUTLEDGE, P.J.; CHALLIS, G.; Discovery of microbial natural by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Natural Reviews Microbiology**. 2015. doi:10.1038/nrmicro3496.

SAIFI, M. *et al.*, Chapter nine- Transgenic technology to improve therapeutic efficacy of medicinal plants. **Transgenic Technology Based Value Addition in Plant Biotechnology**. 2020. p. 207-226. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818632-9.00009-5>.

SAKULA, A.; Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax** 1982;37:246-251.

SAKULA, A.; Robert Koch (1843-1910): Founder of the Science of Bacteriology and Discoverer of the Tubercle Bacillus. **Can Vet J.** 1983 Apr; 24(4): 124–127.

Selman A. Waksman – Nobel Lecture. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2022. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1952/waksman/lecture/>>.

SIQUEIRA, L.F.G. *et al.*, Tinctorial behavior of Mycobacterium leprae: a historical review. **Revista de Saúde Pública.** 1983, v. 17, n. 4, p. 297-315. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-89101983000400005>> . Epub 03 Out 2005.

STROBEL, G. *et al.*, Natural Products from Endophytic Microorganisms. **J. Nat. Prod.** 67. p. 257-268. 2005. DOI: [10.1021/np030397v](https://doi.org/10.1021/np030397v)

TANG, Yi-Wee.; Molecular Medical Microbiology. 2<sup>a</sup> ed. **Academic Press.** 2015. ISBN 9780123971692.

TANVIR, R. *et al.* Fatty acids and their amide derivatives from endophytes: new therapeutic possibilities from a hidden source, FEMS Microbiology Letters, Volume 365, Issue 12, June 2018, fny114. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fny114>.

TEIXEIRA, H.C. *et al.*, Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **J Bras Pneumol.** 2007;33(3):323-334

TECHAOEI, S. *et al.*, Chemical evolution and antibacterial activity of novel bioactive compounds from endophytic fungi in Nelumbo nucifera. **Saudi Journal of Biological Sciences.** Vol. 27. 11<sup>a</sup>ed. p. 2883-2889. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.037>.

UNTERSEHER, M; SCHNITTLER, M.; Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (Fagus sylvatica). **Fung. Ecol.** Vol. 3, 366–378. 2010. doi: 10.1016/j.funeco.2010.03.001

VALENTE, P. *et al.*, Paul Ehrlich (1854-1915) and His Contributions to the Foundation and Birth of Translational Medicine. **J Innate Immun.** 8:111-120. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000443526>.

VAN, D.A. *et al.*, Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2008 Jan;12(1):108-10. PMID: 18173887.

VILCHÈZE, C.; KREMER, L.; Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative Mycobacterium tuberculosis: The Koch Paradox. **Microbiology Spectrum**. 2017. 5(2):TBTB2-0003-2015. doi:10.1128/microbiolspec.TBTB2-0003-2015.

VILAR, D.A. *et al.*, Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of Bixa orellana L.: A Review. **The Scientific World Journal**. Volume 2014, Article ID 857292, 11 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/857292>. Acesso em junho de 2022.

VOLK, T.J.; Encyclopedia of Biodiversity. IV.B.5. “*Deuteromycetes*,” the *Fungi Imperfecti*. Academic Press. **Elsevier Inc.** 2001. ISBN 978-0-12-226865-6.

XIANG, X. *et al.*, Mycobacterial ethambutol responsive genes and implications in antibiotics resistance. *Journal of Drug Targeting*, 2020. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1853733.

XUE, H.T. *et al.*, Data considerations for predictive modeling applied to the discovery of bioactive natural products. *Drug Discovery Today*. Vol 27. 8 ed. 2022. p. 2235-2243. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.05.009>.

Wanger, A. *et al.* Chapter 5 - Biochemical Tests and Staining Techniques for Microbial Identification. **Elsevier**, 2017, p. 61-73. ISBN 9780128053515.

WIEMANN, P.; KELLER, N.P. Strategies for mining fungal natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 41, ed<sup>a</sup>2. 2014. p. 301-313. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1366-3>.

WILLIAMS, R.B. *et al.*, Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Org Biomol Chem**. Vol. 6. p. 1895–1897. 2008.

WHO. World Health Organization. **The End TB Strategy**. Geneva. 2015.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report 2021**. Geneva. 2021.

WRIGHT, G. D.; Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. **Natural Product Reports**. 2017. DOI: 10.1039/c7np00019g

YAQUB, F.; Historical profile. Selman Abraham Waksman. **Lancet Respir Med**. 2014 Sep;2(9):694-5. doi: 10.1016/s2213-2600(14)70210-3. PMID: 25346965.

YANG, X. *et al.*, Epigenetic modifiers alter the secondary metabolite composition of a plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* obtained from the leaves of *Fragaria chiloensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**. DOI: [10.1080/10286020.2014.881356](https://doi.org/10.1080/10286020.2014.881356).

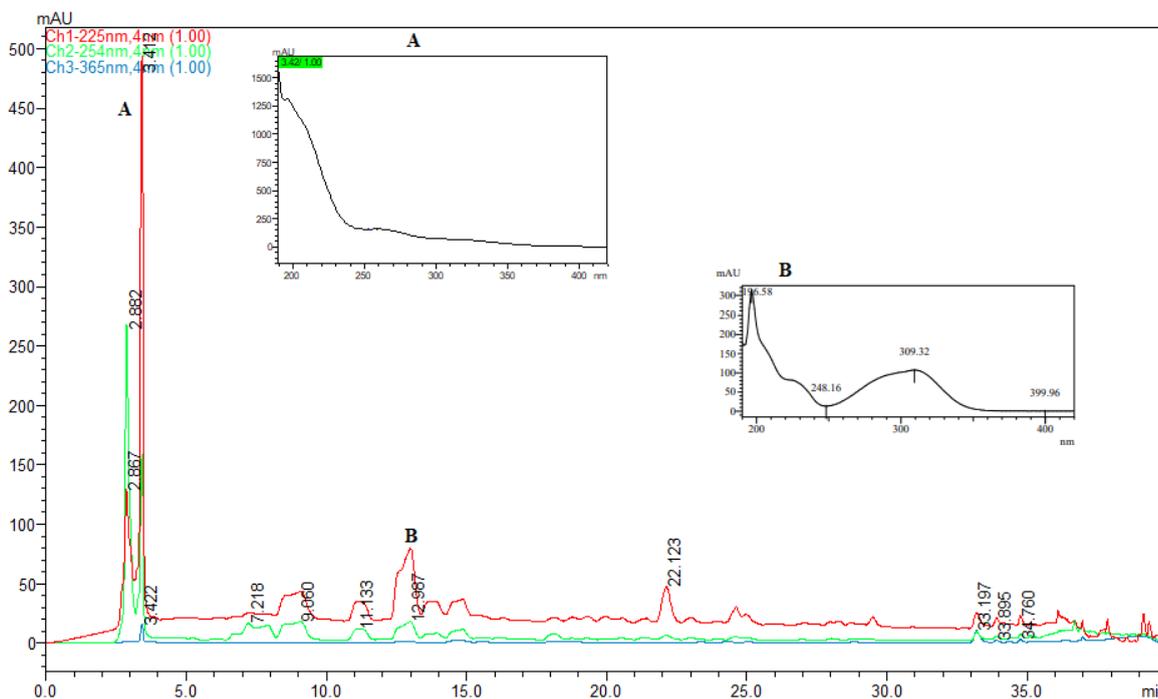
ZHANG, Y.; REINBERG, D.; Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modification of the core histone tails. **Genes & De**. Vol. 15. p. 2343-2360. 2001. doi: 10.1101/gad.927301

ZHANG, H.W. *et al.*, Biology and chemistry of endophytes. **Nat Prod Rep**. 2006 Oct;23(5):753-71. doi: 10.1039/b609472b. Epub 2006 Aug 16. Erratum in: Nat Prod Rep. 2006 Oct;23(5):828-9. PMID: 17003908.

## 8. ANEXO I

### 8.1. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD

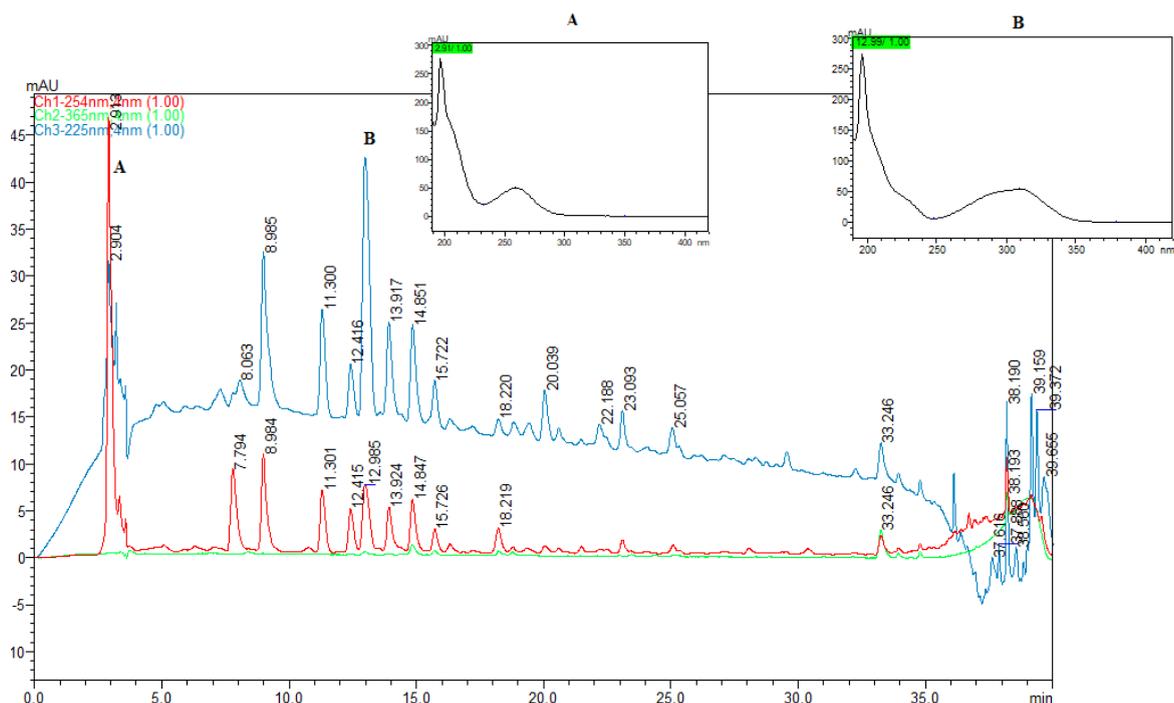
#### 8.1.1. Frações Acetato de etila



**Figura 26: Cromatogramas sobrepostos da Fração 3-B-B - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

3-B-B - Fração acetato de etila do controle do meio fermentativo.

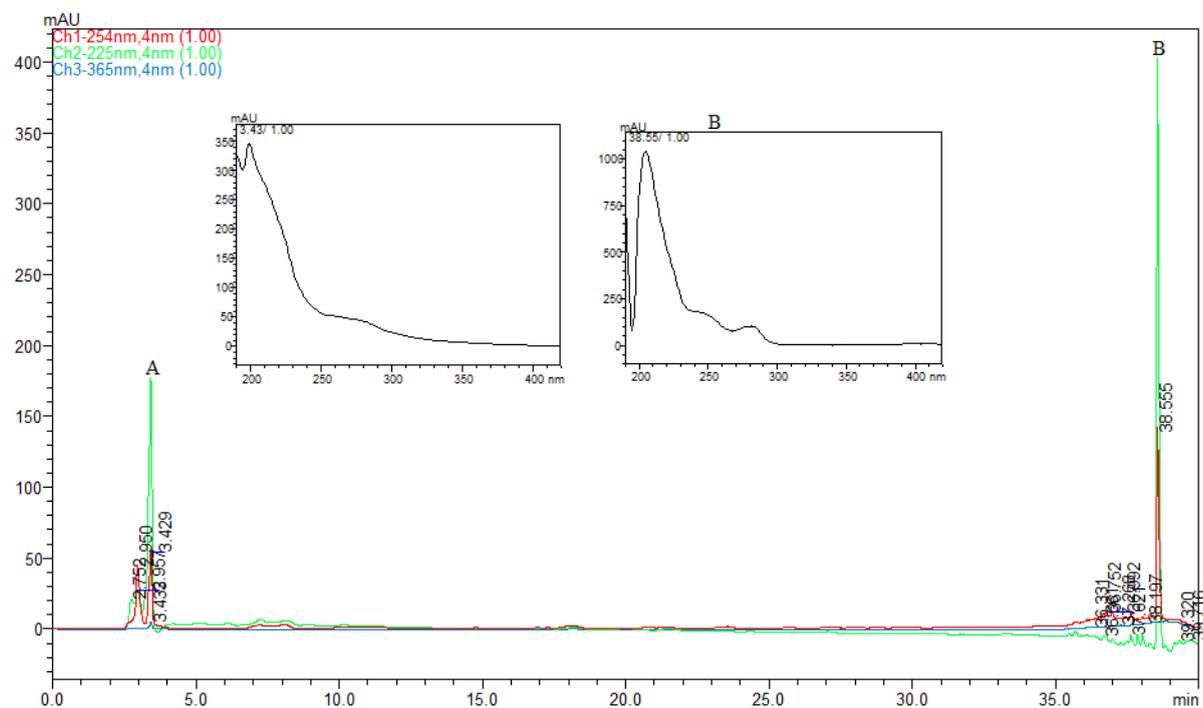
Picos majoritários: (A - 225 nm) Tr= 3,412 min (Área= 44,723 %); (B- 225 nm) Tr:12,999 min (Área=25,608%). Tr - Tempo de retenção.



**Figura 27: Cromatogramas sobrepostos da Fração 4-B-M - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

4-B-M - Fração Acetato de etila do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*.

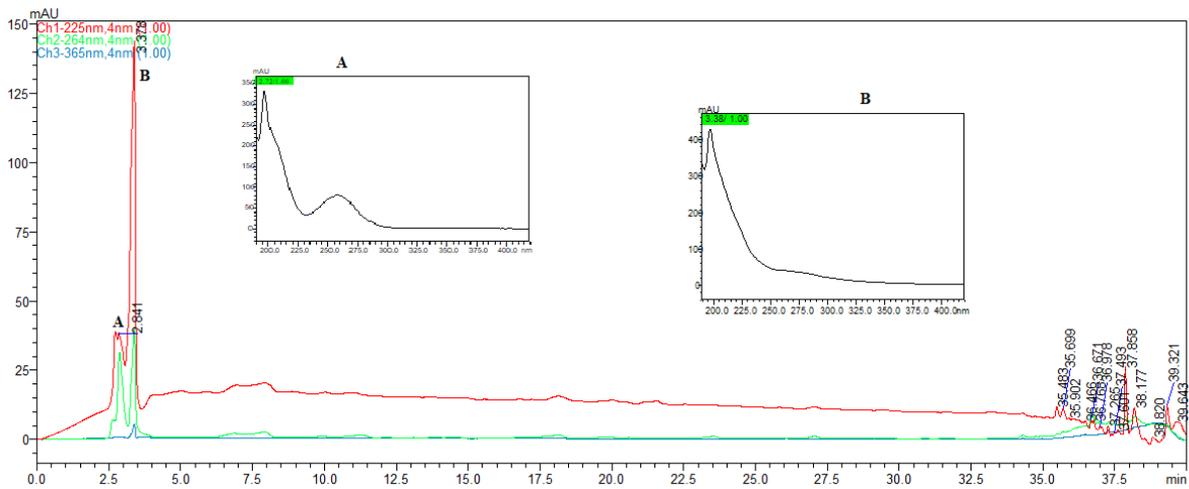
Picos majoritários: (A - 254 nm) Tr= 2,913 min (Área= 44,339%); (B- 254 nm) Tr:8,984 min (Área=10,211%).  
Tr - Tempo de retenção.



**Figura 28: Cromatogramas sobrepostos da Fração 1-B-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

1-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo tradicional

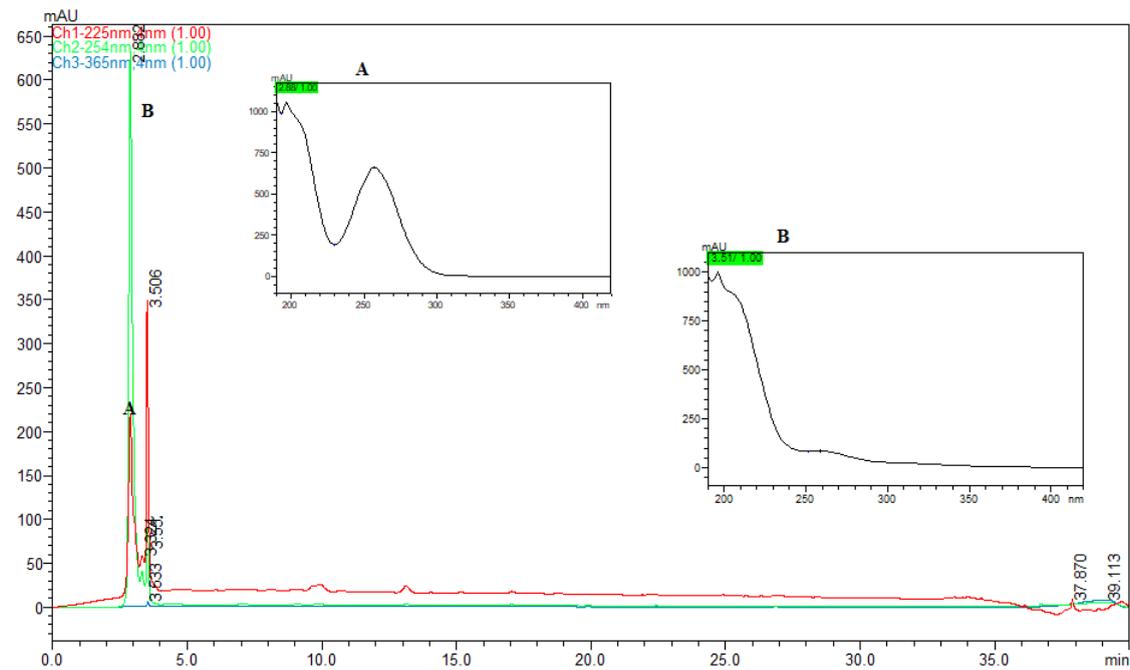
Picos majoritários: (A- 254 nm) Tr= 3,429 min (Área= 25,552 %); (B- 254 nm) Tr: 38,555 min (Área= 46,967%). Tr - Tempo de retenção.



**Figura 29: Cromatogramas sobrepostos da Fração AcOEt 2-B-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm**  
 2-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo elicidado.

Picos majoritários: (A- 225 nm) Tr= 2,721 min (Área= 23,168 %); (B- 225 nm) Tr: 3,378 min (Área= 63,870%).

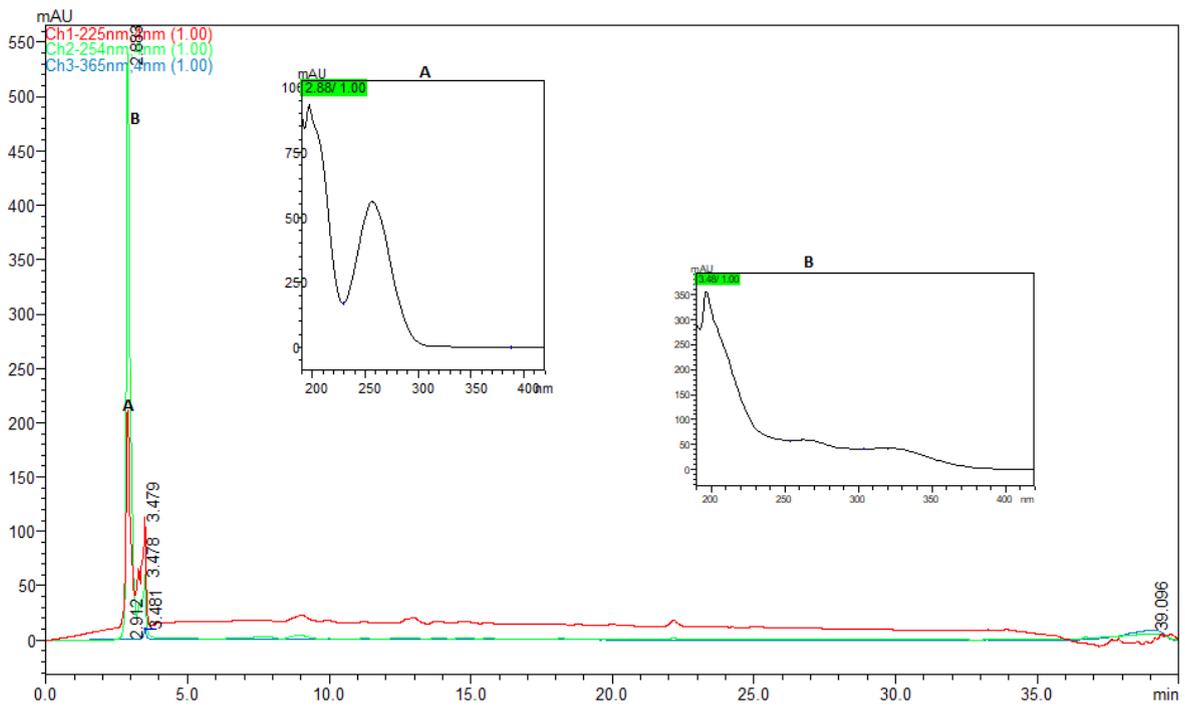
### 8.1.2. Frações Butanólicas



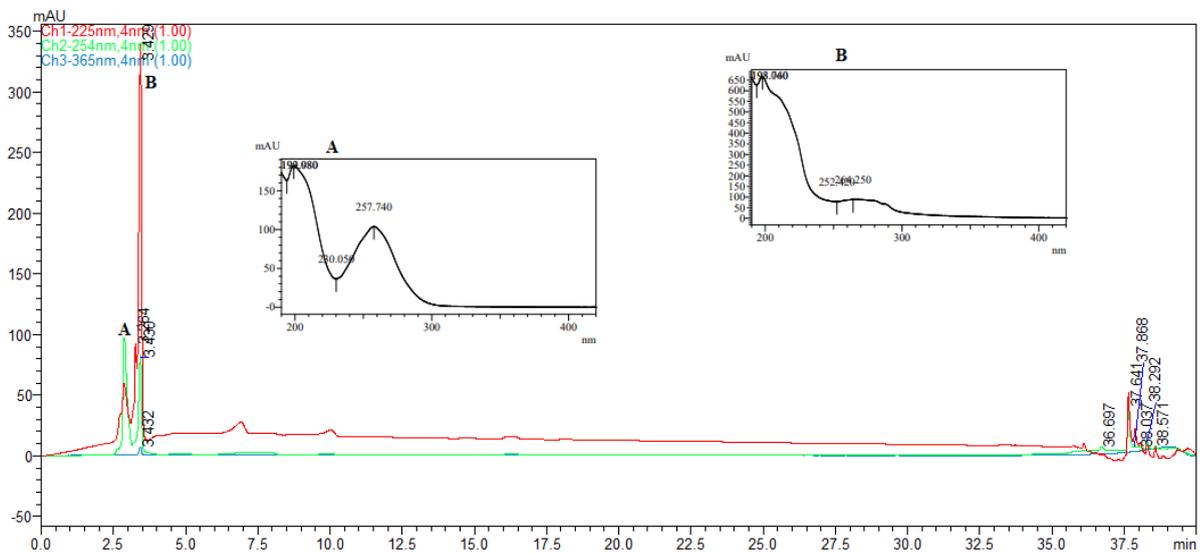
**Figura 30: Cromatogramas sobrepostos da Fração 3-C-B - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

3-C-B - Frações butanólicas do controle do meio fermentativo. Tr - Tempo de retenção.

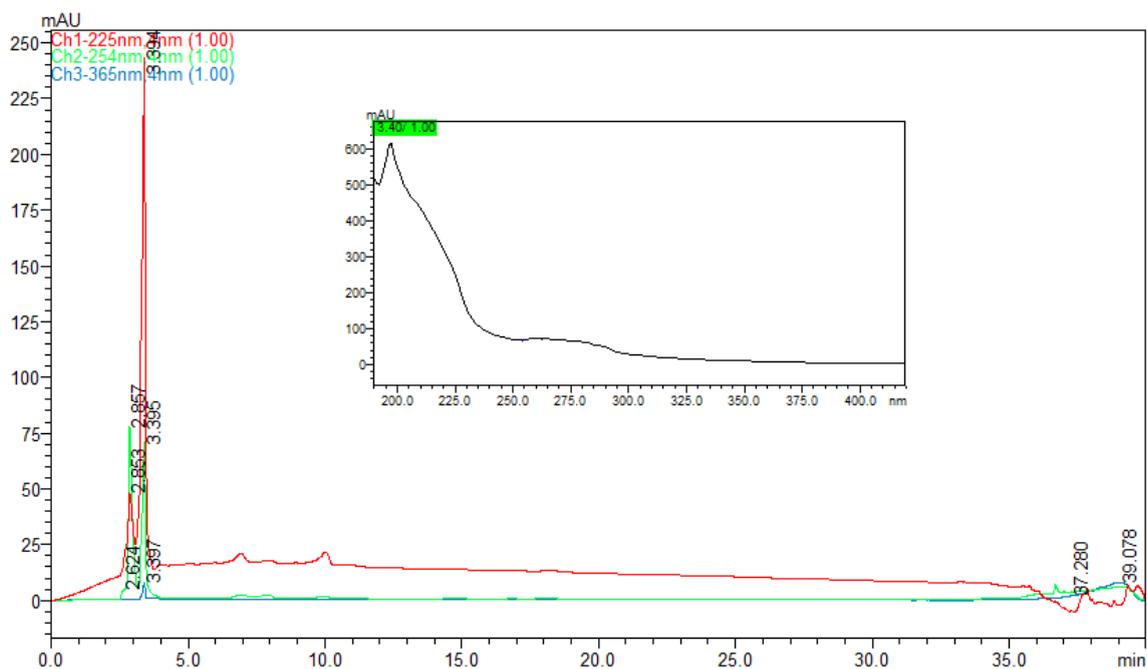
Picos majoritários: (A - 254 nm) Tr= 2,882 min (Área= 88,862%); (B- 225 nm) Tr: 3,506min (Área=36,212%).



**Figura 31: Cromatogramas sobrepostos da Fração 4-C-M - 225 nm, 254 nm e 365 nm.**  
 4-C-M - Fração butanólica do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*. Tr - Tempo de retenção.  
 Picos majoritários: (A- 225 nm) Tr= 2,880 min (Área= 63,246%); (B- 225 nm) Tr:3,479min (Área=36,754%).



**Figura 32: Cromatogramas sobrepostos da Fração 1-C-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm**  
 1-C-TB3 - Fração butanólica do cultivo tradicional.  
 Picos majoritários: (A- 225 nm) Tr= 3,429 min (Área=40,322%); (B-225 nm) Tr:2,863min (Área=51,858%).

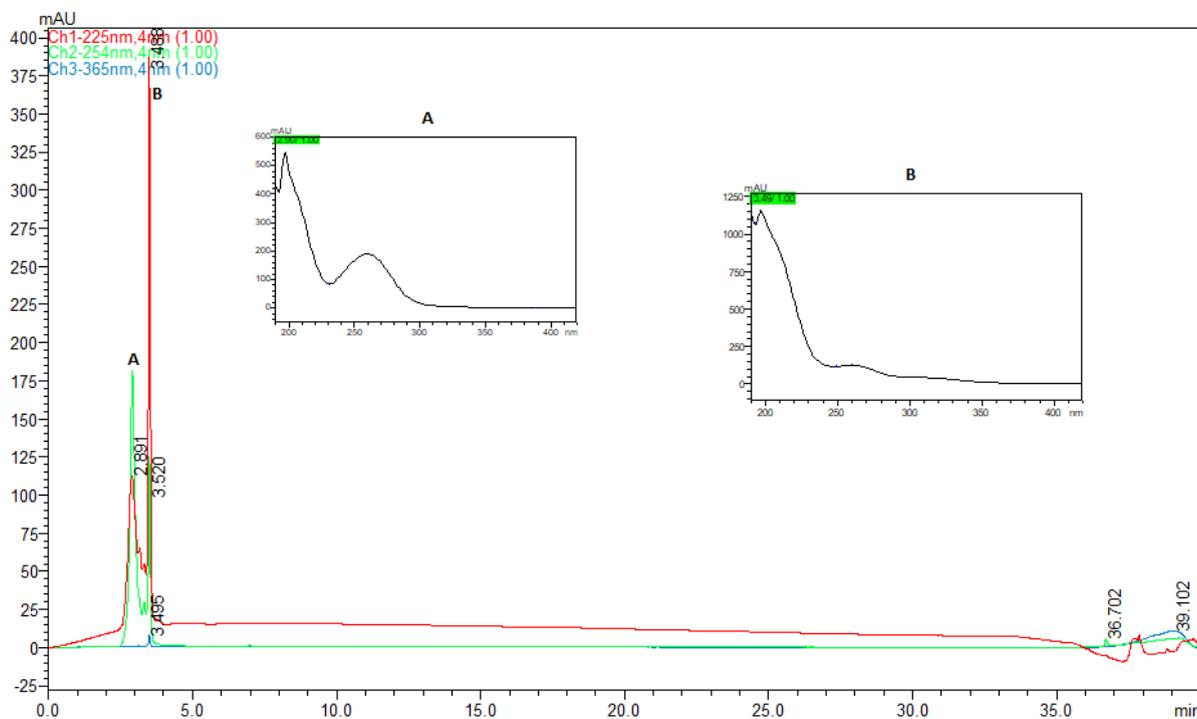


**Figura 33: Cromatogramas sobrepostos da Fração 2-C-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

2-C-TB3 - Fração butanólica do cultivo eliciado. Tr - Tempo de retenção.

Pico majoritário: (A- 225 nm) Tr=3,394 min (Área=81,134%).

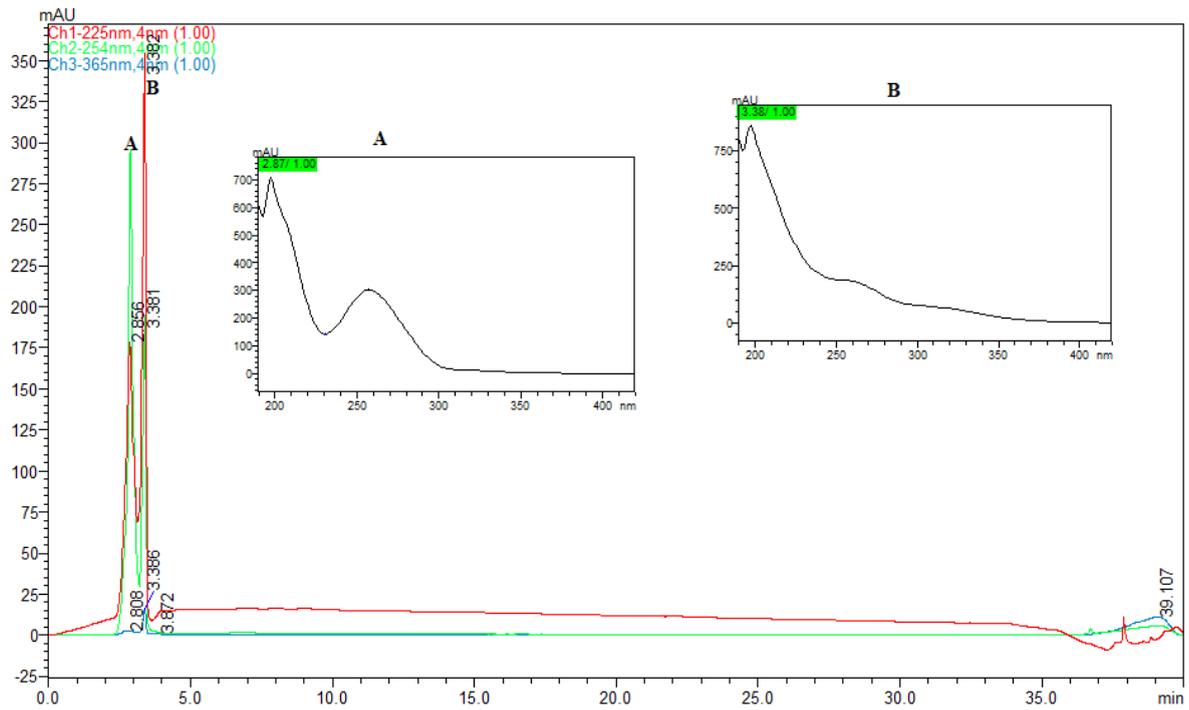
### 8.1.3. Frações Aquosas



**Figura 34: Cromatogramas sobrepostos da Fração 3-D-B - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

3-D-B - Fração aquosa do controle do meio fermentativo. Tr - Tempo de retenção.

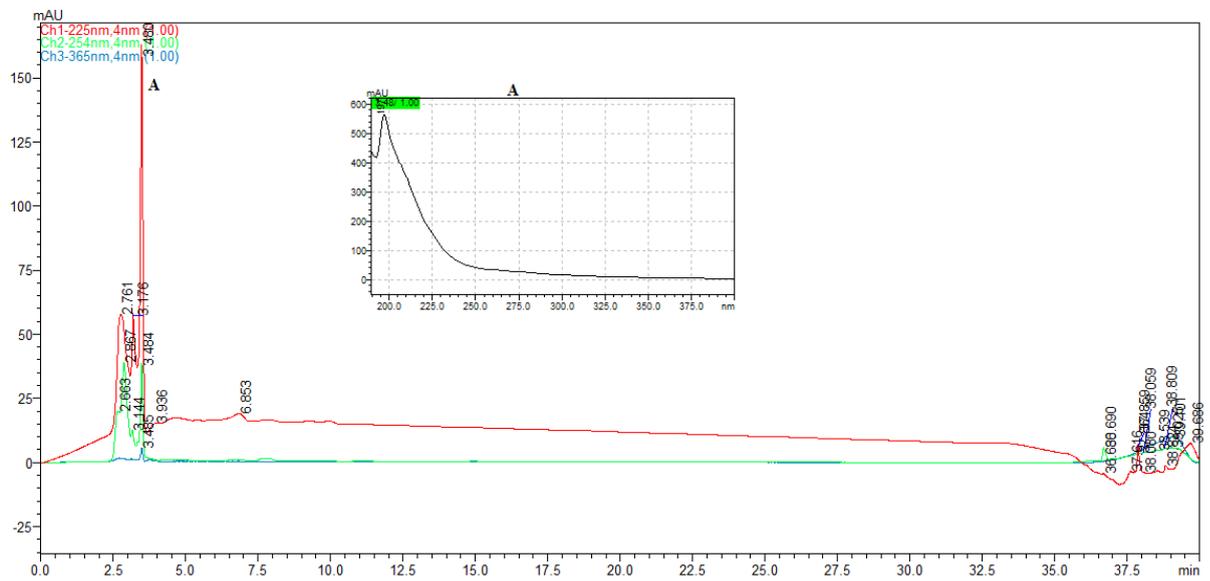
Picos majoritários: (A- 225 nm) Tr= 2,891 min (Área=50,218%); (B- 225 nm) Tr:3,488min (Área=49,782%).



**Figura 35: Cromatogramas sobrepostos da Fração 4-D-M - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

4-D-M - Fração aquosa do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*. Tr - Tempo de retenção.

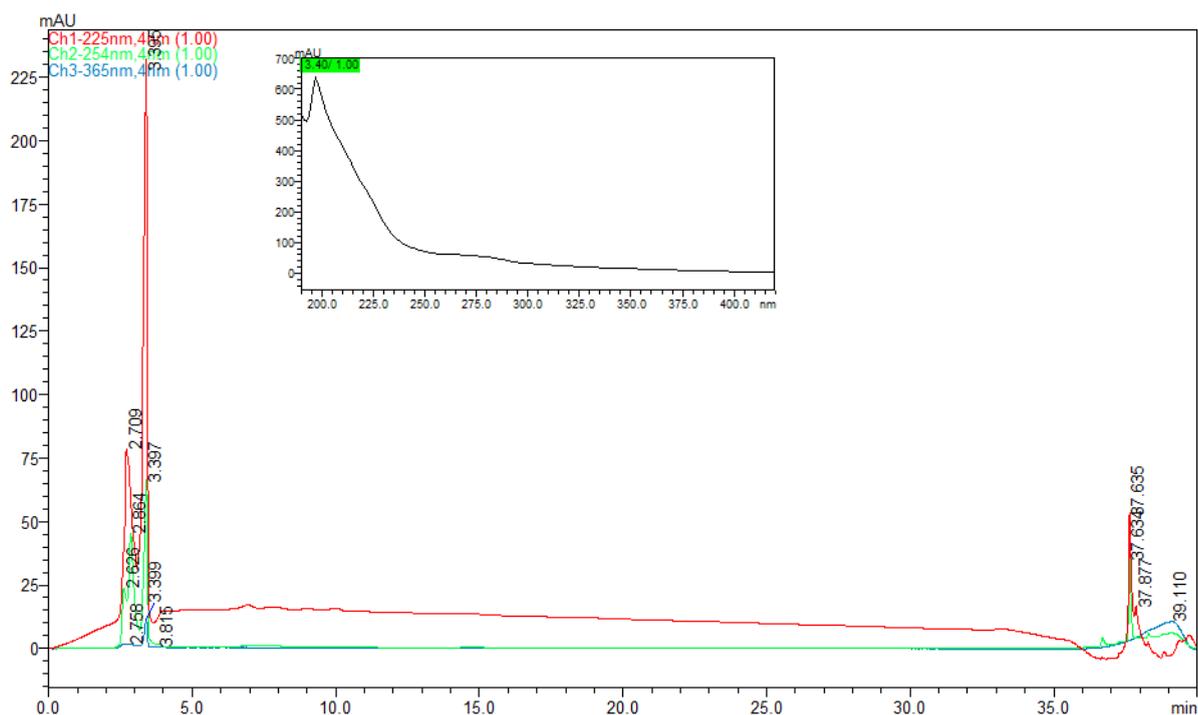
Picos majoritários: (A) Tr= 2,875 min (Área=71,179%); (B) 225 nm) Tr:3,382min (Área=48,694%). 254 nm) Tr:3,381min (Área=28,821%).



**Figura 36: Cromatogramas sobrepostos da Fração 1-D-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm**

1-D-TB3 - Fração aquosa do cultivo tradicional. Tr - Tempo de retenção.

Picos majoritários: (A - 225 nm) Tr= 3,480 min (Área=31,189%).

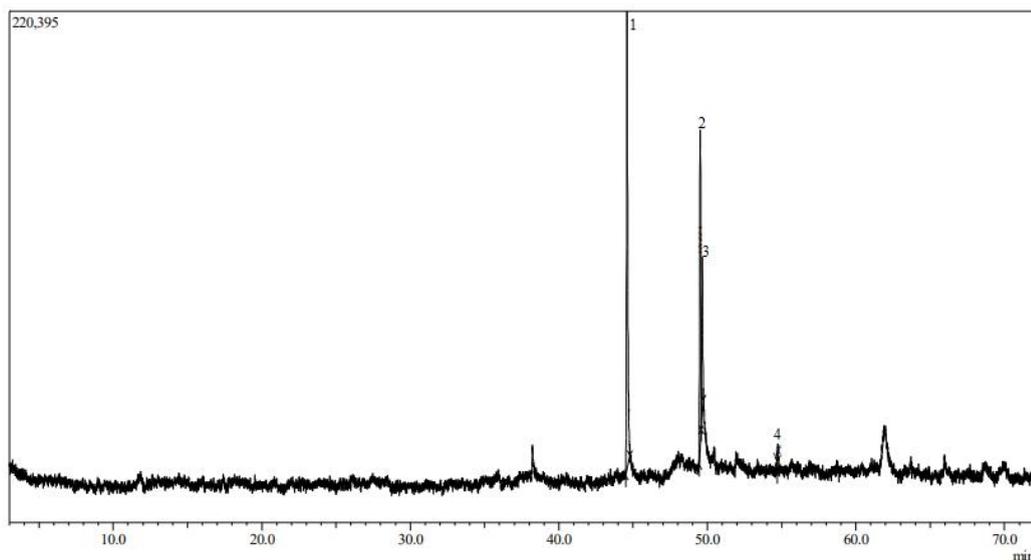


**Figura 37: Cromatogramas sobrepostos da Fração 2-D-TB3 - 225 nm, 254 nm e 365 nm**  
 2-D-TB3 Fração aquosa do cultivo eliciado. Tr - Tempo de retenção.  
 Pico majoritário: (A) 225 nm) Tr= 3,395 min (Área=55,432%). 354 nm) Tr= 3,397 (Área = 36,298%) .

## 9. ANEXO II

### 9.1. Cromatogramas obtidos por CG-EM.

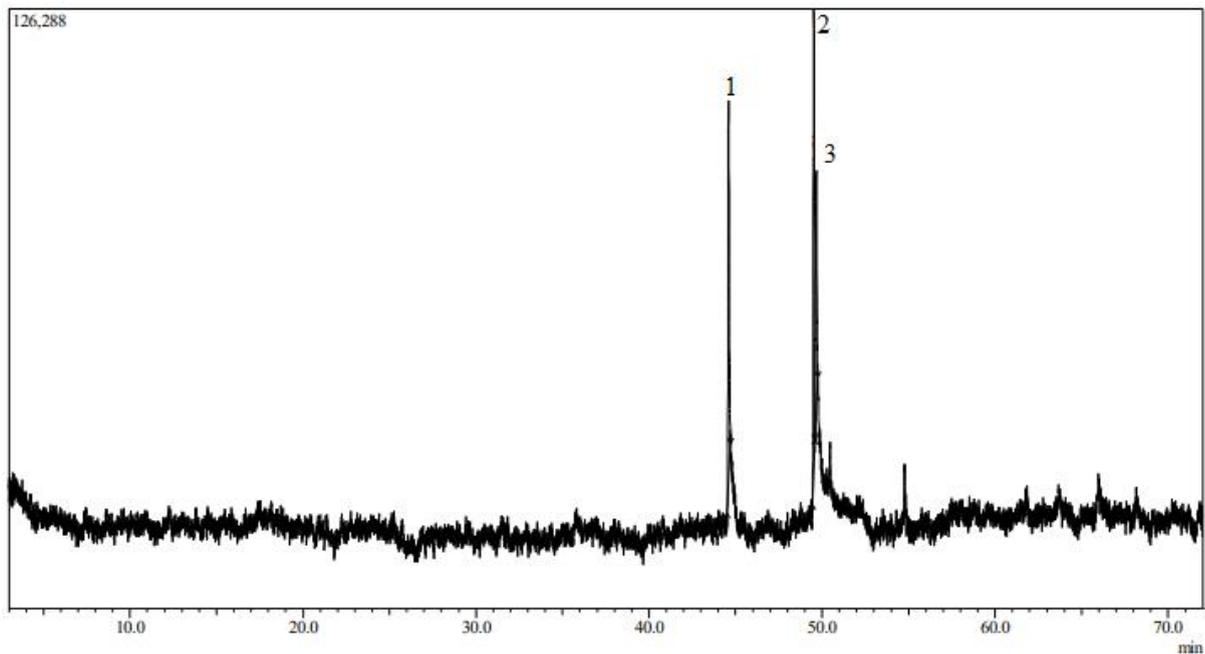
#### 9.1.1. Frações Hexânicas



**Figura 38: Cromatograma da Fração 4-A-M.**

4-A-M- Fração Hexânica do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*.

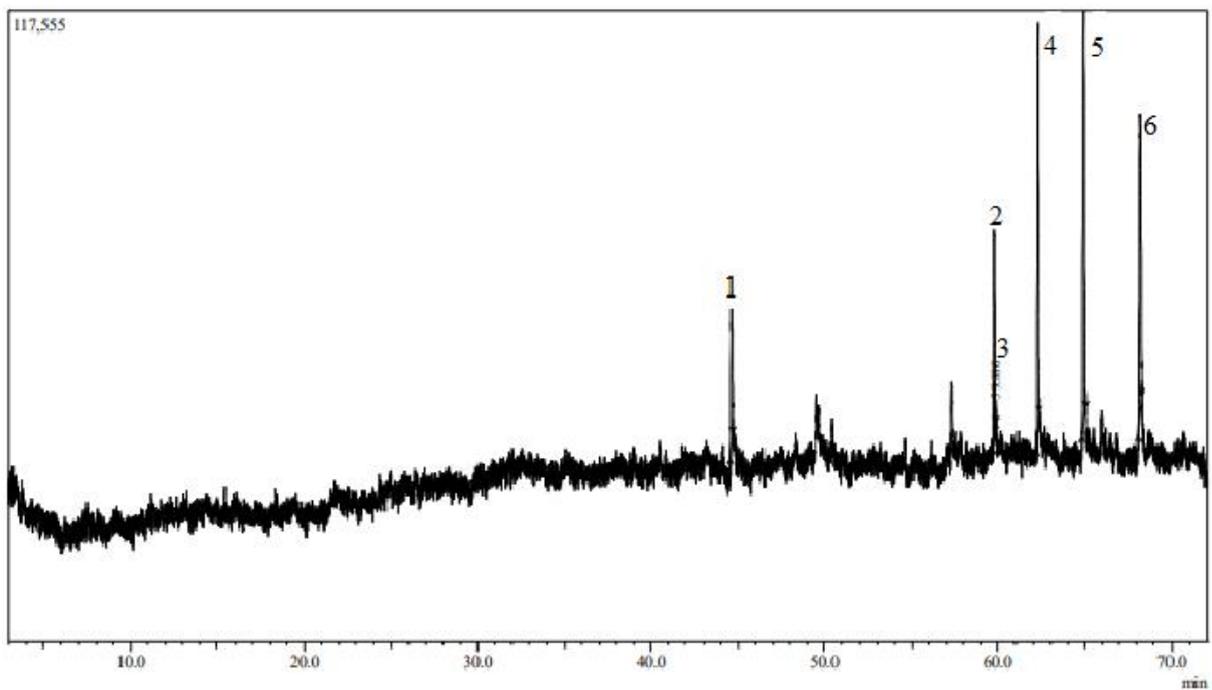
Picos: (1) Ácido hexadecanóico (Área= 52,03 %); (2) 9-12 Ácido octadecadienóico (Área= 32,66%); (3) Ácido trans-9-octadecenoico (Área= 15,21%) e (4) Não identificado (Área=0,10 %). Total de Área Identificada = 99,9%.



**Figura 39: Cromatograma da Fração 3-A-B.**

**3-A-B-** Fração Hexânica do controle do meio fermentativo.

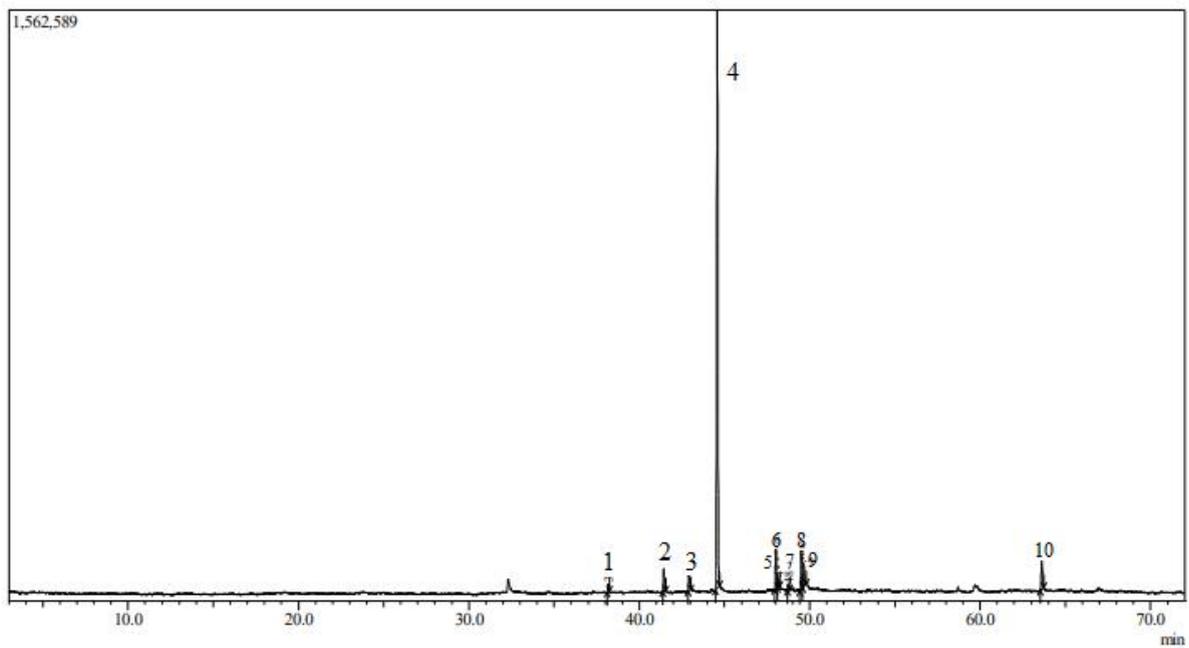
Picos: (1) Ácido hexadecanóico (Área= 35,78 %); (2) 9-12 Ácido octadecadienóico (Área= 41,17 %) e (3) 9-12 Ácido octadecadienóico (Área= 23,05 %). Área total identificada = 100%.



**Figura 40: Cromatograma da Fração 1-A-TB3.**

**1-A-TB3** - Fração hexânica do cultivo tradicional.

Picos: (1) Ácido hexadecanoico (Área=8,0 %); (2) Tetra Tetracontano (Área= 11,63%); (3) Não identificado (Área= 0,10%); (4)Hexacosano (Área=24,87%); (5)Heneicosano (Área = 29,95%) e (6)Nonacosano (Área= 20,34%). Área total identificada = 99,9 % .

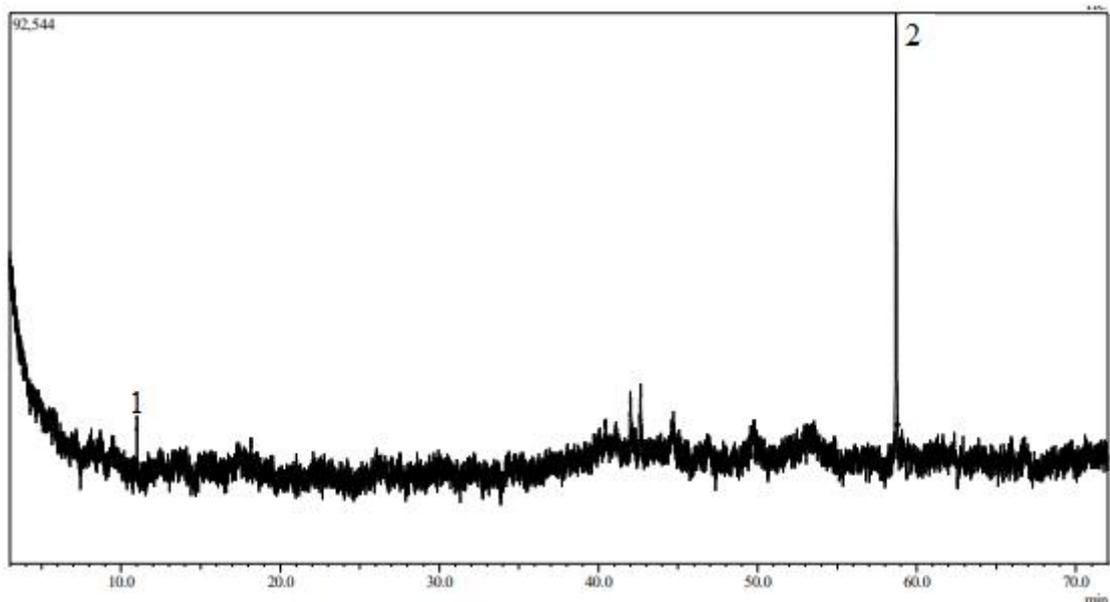


**Figura 41: Cromatograma da Fração 2-A-TB3.**

2-A-TB3 - Fração Hexânica do cultivo eliciado.

Picos: (1) Ácido mirístico (Área= 0,83 %); (2) Trimetilsilil pentadecanoato (Área= 2,85%); (3) Ácido hexadecanoico (Área= 2,41 %); (4) Trimetilsilil palmitato (Área= 71,83 %); (5) Linoleato de etila (Área = 5,18%) e (6) Oleato de etila (Área= 0,98%) (7) Não identificado (Área= 0,69%); (8) 9-12 Ácido octadecadienóico (Área= 6,66 %); (9) ácido Trans-9-octadecenoico (Área= 3,98 %) e (10) Não identificado (Área = 4,6%). Área total identificada = 94,71% .

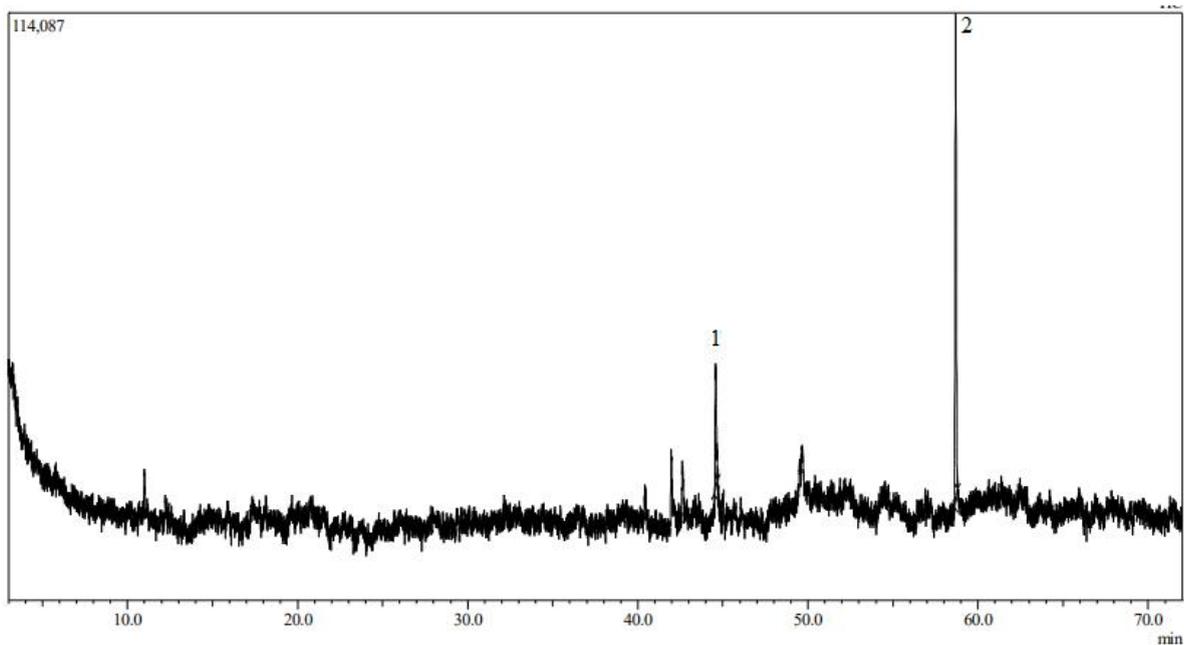
### 9.1.2. Frações Acetato de etila



**Figura 42: Cromatograma da Fração 3-B-B.**

3-B-B- Fração acetato de etila do controle do meio fermentativo

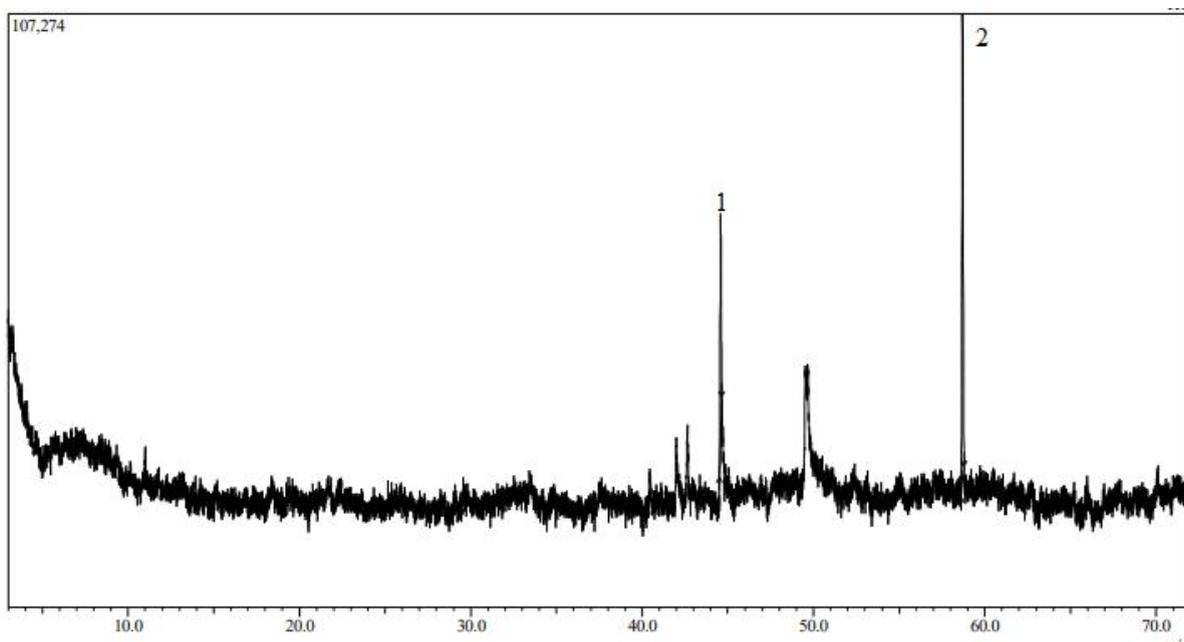
Picos: (1) Não identificado Área= 6,28%) e (2) di (2 - etilhexil) ftalato (Área= 93,72 %). Total de área identificada = 93,72% .



**Figura 43: Cromatograma da fração 4-B-M.**

4-B-M - Fração acetato de etila do controle do lisado de *Mycobacterium bovis*.

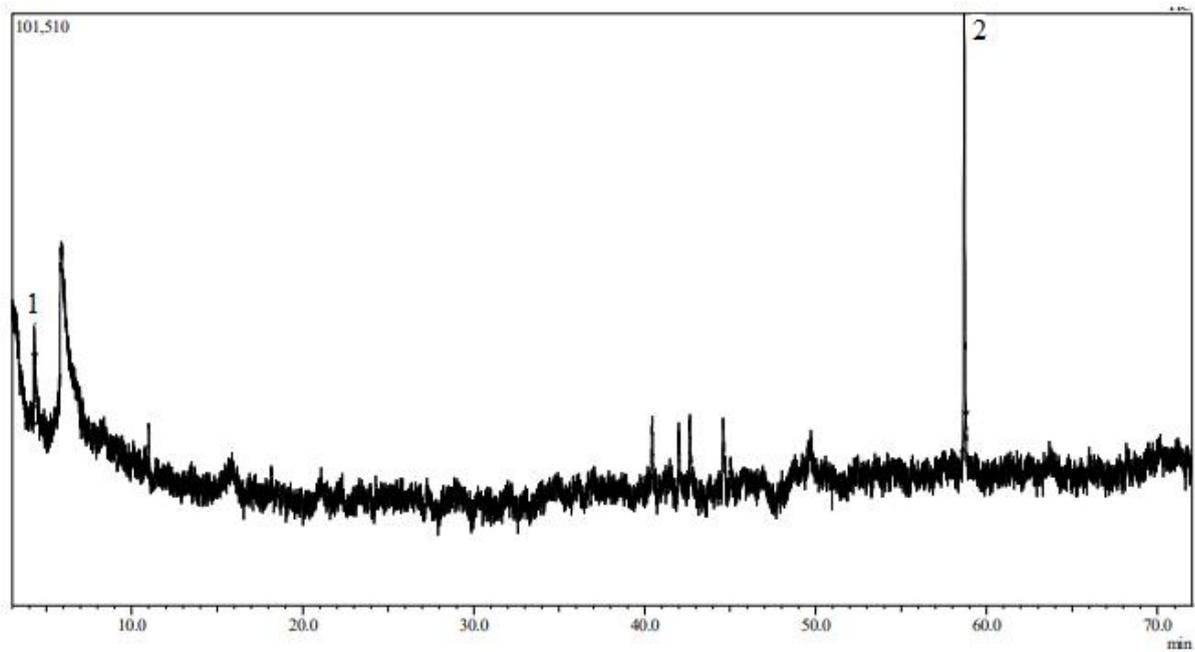
Picos: (1) Ácido hexadecânico (Área= 23,08%) e (2) Di (2 - etilhexil) ftalato(Área= 76,92%). Área total identificada = 100%.



**Figura 44: Cromatograma da Fração 1-B-TB3.**

1-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo tradicional.

Picos: (1) Ácido hexadecânico (Área= 31,61%) e (2) di (2 - etilhexil) ftalato (Área= 68,39%). Área total identificada = 100%.



**Figura 45: Cromatograma da Fração 2-B-TB3.**

2-B-TB3 - Fração acetato de etila do cultivo eliciado

Picos: (1) Dimetil sulfona (Área= 8,19 %) e (2) di (2 - etilhexil) ftalato (Área= 91,81%). Área total identificada = 100%.