



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

JOÃO BATISTA DE ANDRADE NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS
DE LEVEDURAS AMBIENTAIS DO BIOMA CEARENSE FRENTE A CEPAS DE
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS, INCLUINDO *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À
METICILINA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INVESTIGAÇÃO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

FORTALEZA

2015

JOÃO BATISTA DE ANDRADE NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS
DE LEVEDURAS AMBIENTAIS DO BIOMA CEARENSE FRENTE A CEPAS DE
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS, INCLUINDO *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À
METICILINA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E INVESTIGAÇÃO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia ambiental

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientador: Dr. Bruno Coelho Cavalcante.

FORTALEZA

2015

Página reservada para ficha catalográfica que deve ser confeccionada após apresentação e alterações sugeridas pela banca examinadora.

Para solicitar a ficha catalográfica de seu trabalho, acesse o site: www.biblioteca.ufc.br, clique no banner Catalogação na Publicação (Solicitação de ficha catalográfica)

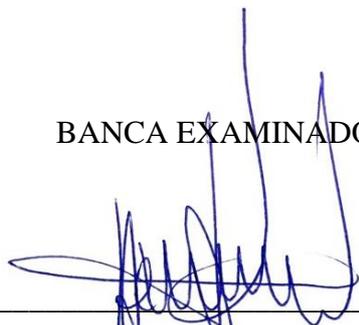
JOÃO BATISTA DE ANDRADE NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDOS
DE LEVEDURAS AMBIENTAIS DO BIOMA CEARENSE FRENTE A CEPAS DE
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS, INCLUINDO SARM: ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO**

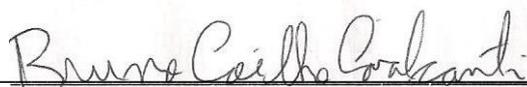
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia ambiental.

Aprovada em: 03/07/2015.

BANCA EXAMINADORA



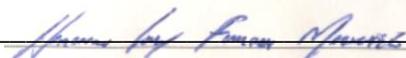
Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Bruno Coelho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Teresa Maria de Jesus Pontes
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A Deus.
Aos meus irmãos João Henrique e Larissa.

AGRADECIMENTO

À Deus, sempre presente e enchendo de bênçãos minha vida.

Aos meus pais, Francisco Ari de Andrade e Francisca Antônia Dantas de Andrade, a minha gratidão por todo amor e apoio dedicados a mim, e por ter transformado momentos de trabalho tenso em colaboração e incentivos.

Aos meus irmãos, João Henrique de Andrade e Larissa Nara Dantas de Andrade, por não me deixarem desistir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela oportunidade concedida e confiança depositada, por todos os ensinamentos, incentivos e participação efetiva na minha formação profissional.

Ao Dr. Bruno Coelho Cavalcanti e ao Prof. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães pelos seus préstimos, sugestões, informações técnicas e incentivos úteis para a vida profissional e pela oportunidade única de trabalhar com ambos.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro e a Ms. Marina Duarte Pinto Lobo pela dedicação e contribuição para a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago, e ao Ms. Leôncio Mesquita de Sousa pela contribuição na realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Conceição Ferreira de Oliveira e ao amigo Ms. Akhenaton Onassis Cardoso Viana Gomes pela contribuição na realização deste trabalho.

À Ms. Cecilia Rocha da Silva pela ajuda incomparável, apoio e participação efetiva na realização deste trabalho.

Aos amigos, Daniel Domingues Freitas, Anderson Ramos da Silva, Rosana de Sousa Campos, Bruna Nascimento, Rose Anny, Letícia Serpa, demais colegas do LABEL, pela contribuição direta ou indireta, pela convivência, incentivo, apoio e acima de tudo amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pelas oportunidades adquiridas durante o mestrado.

“How many roads must a man walk down
Before they call him a man?

The answer, my friend, is blowing in the
wind.”

(Bob Dylan)

RESUMO

O uso consequente e contínuo dos antimicrobianos levaram ao surgimento de patógenos potencialmente letais. O grupo de micro-organismos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.) se destaca perante os demais, onde as infecções por *Staphylococcus aureus* se sobressaem como a principal causa de infecções sistêmicas, sendo o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) um dos principais responsáveis por estas infecções no Brasil. Dessa forma, a emergência de cepas com sensibilidade reduzida acompanhada de uma terapia antimicrobiana limitada faz com que seja necessária uma busca por novas opções terapêuticas. No presente trabalho, foram analisadas leveduras isoladas da região nordeste do Brasil, mais especificamente no estado do Ceará, com o objetivo de buscar metabólitos antimicrobianos com atividade anti-SARM, bem como a descrição de um eventual mecanismo de ação. Foram isoladas 13 leveduras as quais foram acondicionadas em condições de cultivo distintas, a fim de otimizar o crescimento dos isolados de leveduras. Em seguida os extratos acetotílicos obtidos a partir das leveduras, foram exploradas a fim de verificar se produziam metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas. 59% (11) dos extratos obtidos foram ativos contra bactérias Gram positivas e 32% (7) contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os extratos mais ativos apresentaram atividade contra SARM e tiveram CIM que variaram de 34-192 µg/mL. A análise por citometria de fluxo revelou que esses extratos foram capazes de causar danos a membrana plasmática e promover fragmentação do DNA bacteriano, levando a célula à morte celular por apoptose. Nos ensaios citotóxicos, utilizando o teste do MTT com células de leucócitos humanos, os extratos mostraram baixa citotoxicidade. As análises químicas revelaram estruturalmente diversos metabólitos secundários, incluindo os compostos hexahidro-3-(fenilmetil)-pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-dione e o ácido láurico, já descritos na literatura por suas propriedades contra *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e SARM, bem como outros metabólitos conhecidos foram identificados nos extratos restantes, sugerindo que estas leveduras podem produzir moléculas promissoras. Dentro deste contexto, a atividade antimicrobiana e o baixo potencial citotóxico demonstrado por esses extratos revelaram uma classe de compostos químicos promissores para desenvolvimento de novos antibióticos. No entanto, mais estudos farmacológicos serão feitos para confirmar estes dados.

Palavras-chave: Leveduras ambientais, Ceará, Atividade Antibacteriana, MRSA.

ABSTRACT

The consequent and continuous use of antimicrobials led to the emergence of potentially lethal pathogens. ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.) microorganisms group stands towards others, in which *Staphylococcus aureus* infections stand out as the leading cause of systemic infections, with SARM being a major responsible for these infections in Brazil. Thus, the emergence of strains with reduced sensitivity accompanied by a limited antimicrobial therapy makes the search for new therapeutic options necessary. In this study, isolate yeasts from the northeaster region of Brazil, more specifically in Ceará state, were analysed in order to find antimicrobial metabolites with anti-SARM activity, as well as to find a description of a possible mechanism of action. In this paper, 13 yeasts were isolated and conditioned in different growing conditions, in order to optimize the growth of the isolates. In addition, it was explored whether extracts from yeast produced new secondary metabolites with antimicrobial properties. 59% (11) of the obtained extracts were active against Gram positive bacteria and 32% (7) were active against Gram positive and Gram negative bacteria. These more active extracts showed activity against SARM and had MIC ranging between 34-192 µg/mL. Analysis by flow cytometer showed that these extracts were capable of causing damage to the plasma membrane and of promoting bacterial DNA fragmentation, leading the cell to cell death by apoptosis. In cytotoxic tests using the MTT test with human leukocyte cells, the secondary metabolites showed low cytotoxicity. Chemical analysis revealed structurally different secondary metabolites, including the compounds pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione, Hexahydro-3- (phenyl methyl) Laurie acid and, as described in the literature for their properties against MSSA and SARM as well as other known metabolites were identified in the remaining extracts, suggesting that these strains can produce new molecules. Within this context, the antimicrobial activity and the low cytotoxic potential demonstrated by these extracts reveal a class of promising chemical compounds to the development of new antibiotics. However, more pharmacological studies will be done to confirm these data.

Keywords: Environmental yeast. Ceará. Antibacterial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação estrutural do ceftobiprole.....	22
Figura 2 – Representação estrutural do acetato de ceftarolina fosamila.....	22
Figura 3 – Representação estrutural do tomopenem.....	23
Figura 4 – Representação estrutural do razupenem.....	23
Figura 5 – Representação estrutural do oritavancina.....	24
Figura 6 – Representação estrutural do dalbavancina.....	25
Figura 7 – Representação estrutural da telavancina.....	25
Figura 8 – Mapa dos locais de amostragem.....	34
Figura 9 – Fluxograma da metodologia desenvolvida.....	40
Figura 10– Efeito dos extratos HVNJ no número de células viáveis de SARM.....	49
Figura 11 – Ensaio TUNEL frente a um isolado representativo de SARM.....	51
Figura 12 – Externalização de fosfatidilserina.....	53
Figura 13– Representação estrutural da Hexahidro-3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2- a]pirazina-1,4-diona.....	64
Figura 14– Representação estrutural do ácido dodecanóico.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas de leveduras isoladas de amostras ambientais no estado do Ceará.....	43
Tabela 2 – Cultivo de Leveduras em meios de cultura com composições diferentes.....	44
Tabela 3 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos.....	45
Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos.....	47
Tabela 5 – A atividade citotóxica dos metabólitos secundários.....	54
Tabela 6 – Constituintes químicos identificados nos extratos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
AMI	Amicacina
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CFO	Cefoxitina
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLI	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepime
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
DMSO	Dimetilsufóxido
EtOAc	Acetato de etila
HEPES	[N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'- ácido (2-etanossulfónico)]
PI	Iodeto de Propídio
ITS	Internal Transcribed Spacer Regions
MTT	Brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
OXA	Oxacilina
PBS	Tampão fosfato salina
PPB	Tampão Fosfato de Potássio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TMCS	Cloreto de trimetilsilano
TUNEL	Desoxinucleotidil-transferase mediated dUTP nick end labeling assay

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Multiresistência Microbiana	16
2.2	Infecções por <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.3	Infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (SARM) ..	19
2.4	Prevenção e Tratamento das Infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (SARM)	21
2.4.1	Beta lactâmicos	21
2.4.1.1	Cefalosporinas	21
2.4.1.2	Carbapenêmicos	23
2.4.2	Glicopeptídeos	24
2.5	Novas estratégias terapêuticas	26
2.6	Recursos naturais como fontes de obtenção de novos fármacos: Biodiversidade Brasileira como Chave para a Inovação Sustentável	27
2.7	Bioprospecção de microrganismos com potencial antimicrobiano no bioma cearense	28
3	HIPÓTESES	31
4	OBJETIVO GERAL	32
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
6	MATERIAIS E MÉTODOS	33
7	RESULTADOS	41
8	DISCUSSÃO	60
9	CONCLUSÃO	66
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
11	ANEXO A	79

1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos beneficiaram a história da medicina revolucionando o tratamento das doenças infecciosas. Entretanto seu uso contínuo levou ao surgimento de micro-organismos, que outrora considerados inofensivos, passaram a ser temidos como patógenos potencialmente letais (BOWLER *et al.*, 2012; DE QUEIROZ *et al.*, 2012).

A incidência da resistência aos antimicrobianos disponíveis na terapêutica atual vem aumentando progressivamente no meio hospitalar. Essas infecções, principalmente as que acometem pacientes críticos, aumentam o tempo de internação contribuindo para um aumento nos índices de morbimortalidade, repercutindo de maneira significativa nos custos financeiros dos tratamentos (SANTOS CASTRO, 2013; PITTET, 2005). Dentro deste contexto um grupo de micro-organismos se destaca, representados pelo acrônimo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. Esses se sobressaem dos demais patógenos pela dificuldade de controlar as infecções, principalmente pela ausência de uma antibioticoterapia eficiente (BOUCHER *et al.*, 2009; COOPER e SHALES, 2011; SANTOS CASTRO, 2013).

As infecções por *Staphylococcus aureus* se destacam por consistirem em uma importante causa de infecções sistêmicas, sendo o micro-organismo que apresenta maior taxa de morbidade e mortalidade em infecções hospitalares (Smith *et al.*, 2009; Santos Castro, 2013), além do mais estas estirpes possuem uma notável habilidade de adquirir resistência antimicrobiana sendo a resistência à meticilina (SARM) um problema de saúde pública crescente (Rodriguez-Noriega e Seas, 2010; Köck *et al.*, 2010).

Na Europa as infecções por SARM correspondem a 44% de todas as infecções hospitalares/ano, além de serem responsáveis por um total de 5.400 mortes e mais de um milhão de dias de hospitalizações (ECDC/EMEA, 2009). A maioria das infecções causadas por SARM, relacionadas à ambiente hospitalar, é pertinente a uma variante denominada Health-associated SARM (HA-SARM). No Brasil, as infecções causadas por esta variante correspondem a 56% das infecções hospitalares e da comunidade (CARVALHO *et al.*, 2010).

Os agentes antibacterianos são os produtos naturais mais importantes, onde organismos procariontes e alguns fungos merecem um destaque especial por desempenharem um importante papel na produção de metabólitos secundários com potenciais aplicações terapêuticas (RAW, 2007; SINGH e MACDONALD, 2010; RAJESHKUMAR e SUNDARARAMAN, 2012). No mundo estão descritas aproximadamente 99.000 espécies de fungos (KIRK *et al.*, 2008), das quais aproximadamente 3,7% da diversidade mundial existem

no Brasil, sendo que a região Nordeste brasileira apresenta o maior número de registros relacionados a diversidade fúngica (MAIA e CARVALHO JÚNIOR, 2010).

No presente trabalho, foram analisadas leveduras isoladas da região nordeste do Brasil, mais especificamente no estado do Ceará. Esta área representa um ecossistema diversificado e pouco investigado para o isolamento de leveduras produtoras de metabólitos com potencial antimicrobiano. Deste modo, esta pesquisa visa colaborar para ampliar os conhecimentos a respeito da atividade de extratos oriundos de leveduras isoladas do Ceará com potencial antimicrobiano, bem como uma descrição preliminar dos seus mecanismos de ação, com o intuito de aplicação no mercado farmacêutico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Multiresistência microbiana

O aparecimento de bactérias resistentes foi observado a partir da introdução dos primeiros agentes antimicrobianos. Desde então, houve uma rápida disseminação de patógenos com multiresistência, representando uma séria ameaça à saúde pública (WALSH *et al.*, 2005). No sentido mais estrito de sua definição, os micro-organismos multiresistentes são rotulados como tais devido sua resistência *in vitro* a mais de um agente antimicrobiano. As infecções causadas por eles podem levar a uma terapia antimicrobiana inadequada ou retardada (MAGIOKAROS *et al.*, 2011). Esses isolados surgem devido a diferentes fatores, sendo que o principal deles está na utilização empírica e inadequada dos antimicrobianos por parte da população (CORNAGLIA, 2009; DE QUEIROZ *et al.*, 2012)

O sério aumento na resistência de bactérias gram-negativas e gram-positivas representa uma grande preocupação já que estas infecções são caracterizadas por altas taxas de mortalidade. As bactérias que possuem resistência a um ou mais agentes antimicrobianos, de no mínimo três diferentes classes de antibióticos, são definidas como MDR (*Multi Drug Resistance*), e estas se tornaram cada vez mais comuns, principalmente em ambiente hospitalar (BASSETI e RIGHI, 2015).

Portanto, um grupo de micro-organismos se destaca, representados pelo acrônimo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter sp.* Esses se sobressaem dos demais patógenos pela dificuldade de controlar as infecções causadas por estes patógenos, principalmente pela ausência de uma antibioticoterapia eficiente (BOUCHER *et al.*, 2009; COOPER e SHALES, 2011; SANTOS CASTRO, 2013).

A despeito de não compartilharem os mesmos mecanismos de resistência esses micro-organismos têm em comum uma prevalência progressiva nas UTI's, em virtude da pressão seletiva exercida pelo uso dos antimicrobianos (COOPER e SHALES, 2011). Dentro deste contexto as infecções por *Staphylococcus aureus* merecem destaque, por consistirem em uma importante causa de infecções sistêmicas, sendo o micro-organismo que apresenta maior taxa de morbidade e mortalidade em infecções hospitalares (SMITH *et al.*, 2009; SANTOS CASTRO, 2013).

2.2 Infecções por *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende patógenos do homem e outros animais e é compreendido por bactérias gram-positivas esféricas que formam agrupamentos irregulares como cachos de uva (TORTORA *et al.*, 2012; MADIGAN *et al.*, 2010) e geralmente infectam a pele e ferimentos. A maioria das infecções provocadas por estafilococos é decorrente da sua transferência das bactérias da microbiota normal de um indivíduo infectado, porém assintomático, a um indivíduo sensível (MADIGAN *et al.*, 2010), sendo que o *S. aureus* é a cepa mais patogênica do gênero e quase todas as suas amostras patogênicas são capazes de produzir a coagulase, uma enzima que coagula a fibrina no sangue (TORTORA *et al.*, 2012).

Essa bactéria é um residente permanente das passagens nasais de 20% da população, e cerca de 60% a carregam ocasionalmente (TORTORA *et al.*, 2012). Em um estudo feito por Hoffman *et al.* (2015), foi estimado que um grupo populacional de 3.309 pessoas, 16,6% (n = 549) continham cepas de *S. aureus* em suas passagens nasais, sendo que destas 70,1% eram resistentes a um ou mais antibióticos, principalmente penicilina. O transporte de *S. aureus* foi significativamente associado a pacientes jovens, sexo masculino, e de trabalho no setor da saúde.

Outra característica interessante destas bactérias consiste no fato de que é um micro-organismo que se dissemina facilmente em diversos ambientes, podendo sobreviver em superfícies por meses (TORTORA *et al.*, 2012; Santos Castro, 2013). Em um estudo feito por MEDEIROS *et al.* (2014), objetivando a investigação de micro-organismos em um córrego poluído na região de São Pedro (Juiz de Fora- MG), após análises de PCR (Reação em cadeia da polimerase), os ensaios revelaram uma alta intensidade de amplicons de cepas patogênicas de *S. aureus* neste ambiente aquático. Estes dados são de fundamental importância para a saúde pública, bem como ambiental, tendo em vista que o surgimento destas cepas em áreas de esgoto está relacionado a ações antropogênicas, associadas com a urbanização, que alteram a estrutura das comunidades microbianas.

O *S. aureus*, em particular, tem uma extraordinária capacidade de habitar dispositivos médicos através da interação direta com a superfície de polímero do dispositivo, formando aglomerações “pegajosas” em uma matriz extracelular (MEC), denominados biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1999). Os biofilmes apresentam uma elevada resistência a ações mecânicas, tratamento aos antibióticos e aos mecanismos de defesa imune do hospedeiro. Além disso, causam enormes problemas no ambiente, assim como nas infecções em humanos e animais (OTTO, 2008). As infecções associadas ao biofilme são caracteristicamente

crônicas e frequentes em ambientes hospitalares, onde, o *S. aureus* é uma das principais causas deste tipo de infecção (PERIASAMY *et al.*, 2012).

A formação de biofilme bacteriano prossegue em três etapas: adesão, proliferação, e descolamento. A adesão pode ocorrer sobre virtualmente qualquer superfície biótica ou abiótica. Em seguida, procede a proliferação através da produção de uma matriz extracelular polimérica (MEC) que contribui para a agregação entre as células. Nas estirpes de *S. aureus*, a matriz é constituída por vários polímeros segregados, tais como exopolissacarídeo, ácidos teicóico, e as proteínas específicas, bem como de DNA proveniente de células lisadas (PERIASAMY *et al.*, 2012).

As linhagens de *S. aureus* que provocam doenças em seres humanos com maior frequência produzem fatores de virulência. Pelo menos quatro hemolisinas diferentes foram reconhecidas e, frequentemente, uma única linhagem é capaz de produzir várias. As hemolisinas são responsáveis pela hemólise observada ao redor das colônias geradas em placas de ágar sangue. *S. aureus* é também capaz de produzir uma enterotoxina associada à intoxicações alimentares (MADIGAN *et al.*, 2010).

Cepas de *Staphylococcus aureus* são frequentemente isoladas de feridas pós-cirúrgicas, e possuem uma grande capacidade em causar infecções sistêmicas, sendo o micro-organismo que apresenta maior taxa de morbidade e mortalidade em infecções hospitalares (VONBERG *et al.*, 2006). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), somente o *S. aureus* é responsável por mais de 10% (~ 200 mil) infecções nosocomiais nos EUA, sendo que deste total, 70% das estirpes de *S. aureus*, apresentam algum tipo de resistência aos antimicrobianos (MADIGAN *et al.*, 2010).

Uma vez que o *S. aureus* infecta a pele, ele estimula uma resposta inflamatória vigorosa, e macrófagos e neutrófilos são atraídos para o sítio de infecção. Entretanto, a bactéria frequentemente consegue escapar dessas defesas normais do hospedeiro. Todos os seres humanos possuem anticorpos contra o *S. aureus*, mas não são capazes de prevenir efetivamente infecções recorrentes (TORTORA *et al.*, 2012).

O *S. aureus* provocam uma variedade de doenças, contudo raramente são responsáveis em indivíduos saudáveis, apesar de estes serem portadores. As crianças são frequentemente infectadas durante a primeira semana de vida, pelo contato próximo com a mãe ou outros indivíduos. Infecções estafilocócicas severas também ocorrem quando a resistência do hospedeiro encontra-se diminuída em decorrência de alterações hormonais, doenças

debilitantes, ferimentos, ou tratamento com esteróides ou outros fármacos que comprometem o sistema imune (MADIGAN et al, 2010).

As infecções e síndromes clínicas causadas pelas estirpes de *Staphylococcus aureus* podem ser divididas em três grupos (SANTOS CASTRO, 2013). O primeiro grupo é conferido a aquelas doenças ocasionado pela liberação de toxinas, incluindo o impetigo bolhoso (síndrome da pele escaldada), intoxicações alimentares e a síndrome do choque tóxico. O segundo grupo é conferido àquelas patologias em que há uma destruição dos tecidos locais e a formação de abscessos tais como: foliculites, carbúnculos, furúnculos, mastite e pneumonia. O terceiro grupo compete às infecções hematogênicas, incluindo a bacteremia e a endocardite (TORTORA et al., 2012; VONBERG et al, 2006)

Cepas resistentes a antibióticos surgiram e são muito difíceis de tratar (BOUCHER et al., 2009; COOPER e SHALES, 2011). Essas cepas causam, atualmente, infecções em hospitais e nas comunidades (CARVALHO et al., 2010).

2.3 Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM)

O uso extensivo de antibióticos resultou em uma seleção natural de estirpes de linhagens resistentes de *S. aureus*. As infecções hospitalares (nosocomiais) causadas por estas bactérias resistentes ocorrem, frequentemente, em pacientes cuja resistência encontra-se diminuída em decorrência de outras doenças, procedimentos cirúrgicos ou por terapia de fármacos. Frequentemente os pacientes são contaminados por cepas de *S. aureus* oriundas dos profissionais hospitalares, os quais podem ser portadores assintomáticos de linhagens resistentes a fármacos (MADIGAN et al, 2010).

Por esse motivo, o tratamento de infecções por *S. aureus* com fármacos antimicrobianos apropriados consiste em um dos principais problemas em ambientes hospitalares (MADIGAN et al, 2010).

O *S. aureus* possui uma notável habilidade de adquirir resistência antimicrobiana, sendo a resistência à meticilina um problema de saúde pública crescente. Com a chegada do novo milênio, o *S. aureus* resistente à meticilina (SARM) emergiu como o patógeno mais alarmante para os prestadores de cuidados de saúde nos países desenvolvidos (JI, 2007).

O SARM foi descrito pela primeira vez na Europa, em 1961, espalhando-se globalmente nas décadas seguintes (RODRIGUEZ-NORIEGA e SEAS, 2010; KÖCK, 2010; SANTOS CASTRO, 2013). O mecanismo de resistência à meticilina desenvolvido está relacionado com a produção das proteínas de ligação com a penicilina (PBPs). O *S. aureus* produz quatro tipos de PBPs (PBP1-PBP4). As cepas SARM expressam uma nova PBPs

(PBP2a ou 2') adquirida de outras espécies de estafilococos e codificada pelo gene MEC A, responsável pela mudança do sítio de ligação da meticilina. A PBP2a mostra baixa afinidade, não apenas à meticilina e à oxacilina, mas praticamente a todos os antibióticos beta-lactâmicos, levando a um importante problema clínico (SANTOS CASTRO, 2013).

Mais de 100.000 casos de infecção por SARM são relatados anualmente em ambientes hospitalares, embora alguns estudos estimem que o número total de infecções por SARM possa ser superior a um milhão nesses estabelecimentos, a cada ano (MADIGAN et al, 2010). Na Europa a cada ano as infecções por SARM correspondem a 44% de todas as infecções hospitalares, além de serem responsáveis por um total de 5.400 mortes e mais de um milhão de dias de hospitalização (ECDC/EMEA, 2009). Em um trabalho publicado por GORWITZ *et al.* (2008), foi estimado que 1,5% da população dos Estados Unidos (EUA), algo em torno de 4,1 milhões de pessoas, estariam colonizadas por cepas de SARM. Em outro estudo paralelo KLEVENS *et al.*(2007) demonstraram que no mesmo país, as mortes ocasionadas pelas infecções por SARM ofuscaram muitas outras doenças infecciosas incluindo as causadas pelo vírus HIV (SMITH *et al.*, 2009).

A maioria das infecções causadas por SARM, relacionadas à ambiente hospitalar, são pertinentes a uma variante denominada Health-associated SARM (HA-SARM). No Brasil, as infecções causadas por HA-SARM correspondem a 56% das infecções hospitalares e da comunidade avaliados e foi o mais comum entre os patógenos prevalentes. Segundo dados do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, estes micro-organismos correspondem a 63,7% das infecções no sangue, 100% das infecções do trato urinário e 46,7% das pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV), causadas por *Staphylococcus aureus* (CARVALHO *et al.*, 2010). Em outro estudo MOREIRA *et al.* (2008) pesquisando a etiologia da PAV na unidade de terapia intensiva em adultos do mesmo hospital relataram que 41,2% dos isolados eram de *S. aureus*, sendo que 41,2% desses eram referentes a cepas de HA-SARM.

Entretanto apesar do SARM ser considerado um patógeno nosocomial, diversos autores já começam a descrever como um agente causador de infecções graves na comunidade, sobretudo nos casos onde existam doenças de base grave, como diabetes ou ainda, devido ao uso descontrolado de antimicrobianos (DE QUEIROZ *et al.*, 2012). Assim ao longo da última década, as infecções por SARM associados à comunidade (CA-SARM) emergiram globalmente, atingindo principalmente indivíduos jovens e saudáveis, que não apresentavam fatores de risco (hospitalização recente ou cirurgia) (WEBER, 2008; SANTOS

CASTRO, 2013). As CA-SARM possuem fatores de virulência exclusivos como a exotoxina Panton-Valentine Leucocidina (PVL), que está relacionada com infecções severas dos tecidos moles e pneumonia (BOWLER *et al.*, 2012).

Os primeiros casos documentados por estas infecções ocorreram entre aborígenes australianos e nativos americanos no Canadá, no início da década de 90. Posteriormente, estas infecções se propagaram pelo mundo, incluindo diversos surtos, tanto nos Estados Unidos como em diversos outros países (LOPES, 2005). Atualmente, tem sido observado um aumento na incidência das infecções de pele e tecidos moles causadas por esta variante (QUALLS *et al.*, 2012). Em um estudo realizado por RIBEIRO *et al.* (2007) em dois hospitais nas cidades do Rio de Janeiro e Porto Alegre, foi evidenciado que 32,8% dos isolados de SARM foram caracterizados como CA-SARM. Devido à presença destas variantes nas unidades de saúde, muitos autores já começam a afirmar que a restrição entre CA-SARM e HA-SARM está começando a desaparecer (CARVALHO *et al.*, 2010).

Logo a emergência de cepas com sensibilidade reduzida acompanhada de uma terapia antimicrobiana limitada faz com que seja necessária uma busca por novas opções terapêuticas (BOUCHER *et al.*, 2009).

2.4 Prevenção e Tratamento das Infecções por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM)

A prevenção de infecções estafilocócicas é problemática, uma vez que muitos indivíduos são portadores assintomáticos e pelo fato de algumas doenças, como a acne e o impetigo, poder ser transmitido pelo simples contato com dedos contaminados. Em ambientes hospitalares, como alas cirúrgicas e berçários, os indivíduos identificados como portadores de linhagens patogênicas devem ser excluídos ou tratados com fármacos antimicrobianos de uso tópico ou sistêmico, a fim de eliminar os patógenos (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.4.1 Tratamento com beta lactâmicos

2.4.1.1 Cefalosporinas

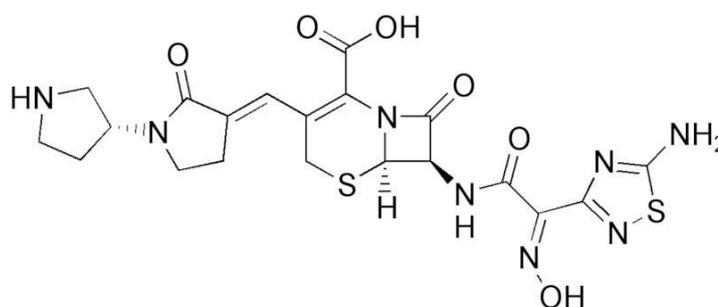
As cefalosporinas estão entre os agentes antimicrobianos mais prescritos devido ao seu amplo espectro de atividade e ao seu perfil de segurança favorável. Como outros beta-lactâmicos, o seu mecanismo de ação consiste na ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBP), levando a inibição da síntese da parede celular bacteriana (BASSETI e RIGHI, 2015).

Novas cefalosporinas de quinta geração, que incluem a ceftarolina fosamila (Figura 1) e a ceftobiprole (figura 2), possuem características em comum o fato de possuírem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, principalmente contra bactérias gram-negativas

resistentes aos antibióticos e uma atividade única contra cepas de SARM (BASSETI e RIGHI, 2015).

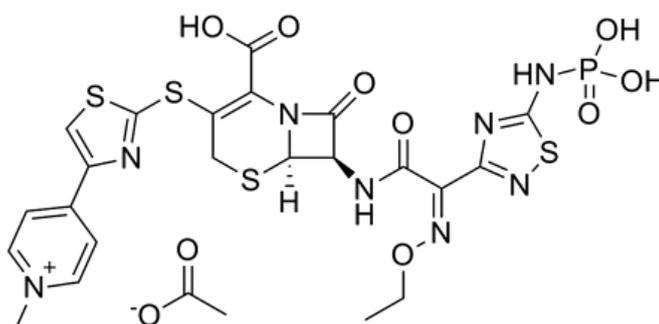
A ceftarolina fosamila é uma nova cefalosporina, semissintética com atividade de amplo espectro, que está atualmente concluindo os ensaios clínicos de fase quatro. A ceftarolina apresenta atividade melhorada contra bactérias gram-positiva, incluindo o SARM e *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV). A sua atividade contra SARM é devida a um efeito maior sobre a inibição PBP2a em comparação com outras beta-lactamases (POON *et al.*, 2012; SARAVOLATZ *et al.*, 2011).

Figura 1. Representação estrutural do ceftobiprole.



Fonte: CHAN *et al.*, 2008.

Figura 2. Representação estrutural do acetato de ceftarolina fosamila

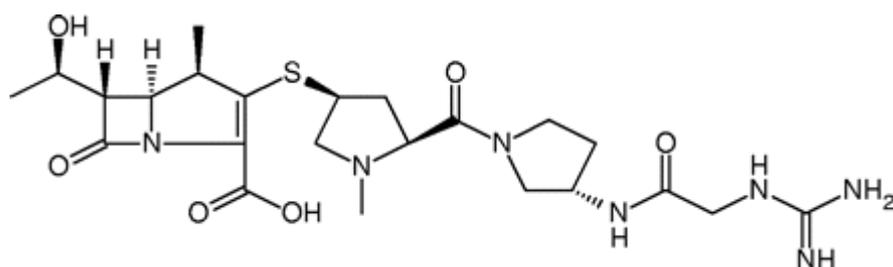


Fonte: SARAVOLATZ *et al.*, 2011.

2.4.1.2 Tratamento com carbapenêmicos

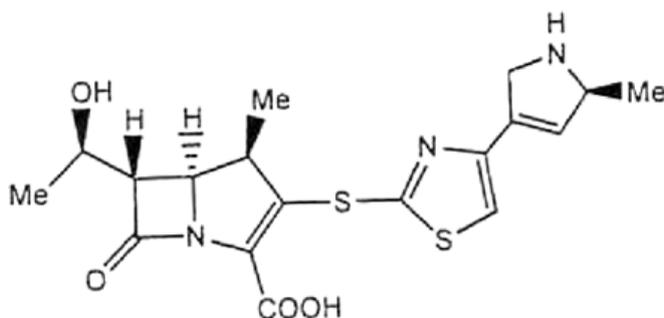
Os carbapenêmicos são antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro, caracterizados por uma estabilidade à hidrólise pela maioria das beta-lactamases de espectro estendido (BLEEs). Atualmente, o meropenem e o imipenem são amplamente utilizados e são recomendados para o tratamento de infecções da corrente sanguínea (Bassetti & Righi, 2015). Contudo ambas as moléculas não são indicadas para o tratamento de infecções por SARM, porém novos carbapenêmicos, tais como o tomopenem (figura 3) e o razupenem (figura 4) possuem atividade contra estirpes de SARM, mas não contra bacilos não fermentadores (KOGA *et al.*, 2008; CLARK *et al.*, 2009).

Figura 3. Representação estrutural do tomopenem



Fonte: KOGA *et al.*, 2008.

Figura 4. Representação estrutural do razupenem



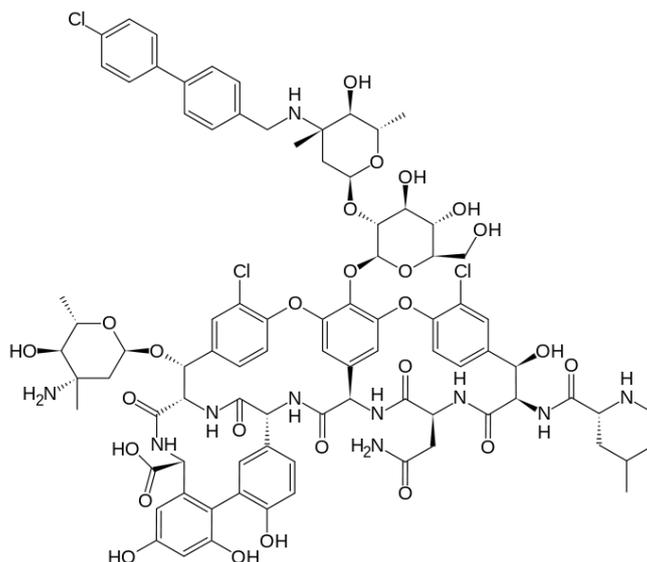
Fonte: Clark *et al.*, 2009.

2.4.2 Tratamento com glicopeptídeos

A classe dos glicopeptídeos é composta por moléculas bem conhecidas, tais como a vancomicina e a teicoplanina. Este grupo de fármacos exibe um espectro de ação limitado e são eficazes principalmente contra cocos gram-positivos. O seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese da parede celular bacteriana, por meio da ligação terminal com as unidades precursoras da parede celular, D-alanil-Dalanil (REYNOLDS, 1989).

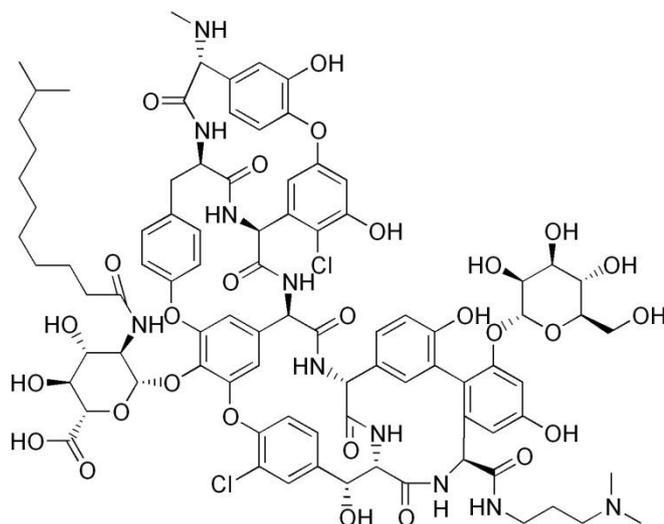
Novos derivados desta classe, oritavancina (figura 5), dalbavancina (figura 6), e telavancina (figura 7), têm sido desenvolvidos para superar o aparecimento de estirpes de SARM com sensibilidade reduzida a vancomicina e para aumentar a penetração nos tecidos e no fluido cerebrospinal. Estas novas moléculas são lipoglicopeptídeos (ou seja, eles apresentam uma cadeia lateral lipofílica ligada a um grupo de glicopeptídeos) e são caracterizadas por mais meia-vida em comparação com vancomicina, esta permitindo a dosagem frequente, maior potência e menor potencial para o desenvolvimento de organismos resistentes (KUMAR *et al.*, 2010; BASSETI e RIGHI, 2015; CHEN *et al.*, 2007).

Figura 5. Representação estrutural do oritavancina



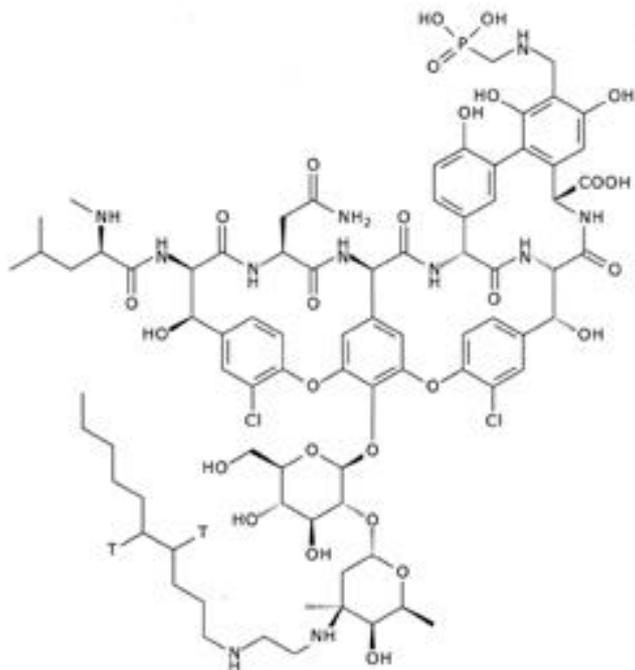
Fonte: KUMAR *et al.*, 2010.

Figura 6. Representação estrutural do dalbavancina



Fonte: CHEN *et al.*, 2007

Figura 7. Representação estrutural da telavancina



Fonte: HOUSMAN *et al.*, 2011

2.5 Novas estratégias terapêuticas

Apesar da necessidade urgente de novos medicamentos para tratar infecções resistentes, não há muitos projetos do setor farmacêutico para pesquisa de novos antimicrobianos (IDSA, 2004), principalmente porque o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é um processo complexo que exige anos de pesquisas, levando a altos custos. Consequentemente esses aspectos levam a um acesso restrito, por parte da população aos novos produtos que chegam ao mercado (BAIDEN *et al.*, 2010; DE QUEIROZ *et al.*, 2012).

Outro ponto que merece destaque é que as grandes empresas farmacêuticas perderam o interesse em pesquisar antibióticos, apesar de aumentarem os seus orçamentos. Logo, torna-se preocupante a escassez em recursos voltados para o investimento de novas drogas antimicrobianas. Em 1990, metade das grandes empresas farmacêuticas nos Estados Unidos e no Japão suspenderam ou diminuíram significativamente seus esforços de descoberta de antibióticos (IDSA, 2004; SANTOS CASTRO, 2013). Segundo BOUCHER *et al.* (2009), houve uma redução drástica no número de agentes antimicrobianos aprovados entre os anos 1983-2007, onde nos anos de 2003-2007 só um novo agente antibacteriano (doripenem) foi aprovado desde o relatório anterior.

De acordo com BOUCHER *et al.* (2013) este problema pode ser resolvido reunindo setores políticos e científicos para desenvolverem incentivos criativos que estimulem a investigação de novos antibacterianos. Segundo os autores, o objetivo da Infectious Diseases Society of America (IDSA) é a criação de uma empresa com o poder em curto prazo que possa desenvolver uma droga antibacteriana global de forma sustentável. Dessa forma seria possível gerar 10 novos antibióticos, seguros e eficazes para 2020.

Segundo a consultoria ERNST e YOUNG (2011), o ambiente global para a inovação de um produto é cada vez mais desafiador, onde para se manter num caráter arrojado, é sempre mais claro que este tem que dar em “alguma coisa”. Assim dentro deste contexto surge um novo modelo denominado Inovação Sustentável. O respectivo termo pode ser explicado a partir de duas abordagens principais: prová-lo ou perdê-lo (ou seja, buscar áreas e estratégias terapêuticas para demonstrar como os resultados podem ser melhorados) e fazer mais com menos (ou seja, aumentar a eficiência operacional).

Dessa forma, hoje estamos cada vez mais caminhando para um mundo em que todas as empresas das ciências da vida terão que operar de forma mais eficiente, valendo-se de fontes completamente diferentes para o desenvolvimento novos fármacos, agindo de forma

cautelosa devido ao ambiente financeiro pressionado pela crise financeira global e recessão econômica (ERNST e YOUNG, 2011).

A partir destes pontos de vista, recursos naturais surgem como uma possível fonte de obtenção de novos fármacos de forma sustentável.

2.6 Recursos naturais como fontes de obtenção de novos fármacos: Biodiversidade Brasileira como Chave para a Inovação Sustentável

O termo biodiversidade hoje consagrado na literatura, refere-se à diversidade biológica para designar a variedade de formas de vida em todos os níveis, desde micro-organismos até flora e fauna silvestres, além da espécie humana (ALHO, 2012).

A biodiversidade, ao compreender toda a variedade de organismos vivos, encontrada nos mais diferentes níveis da natureza, representa a maior riqueza do planeta, pois é a base de inúmeras atividades, tais como agricultura, pecuária, pesca, silvicultura e, mais modernamente, a indústria da biotecnologia (GOMES, 2008). Em países considerados detentores de alta biodiversidade, como o Brasil, a questão da biodiversidade tem enorme relevância, de importância estratégica, incluindo o destaque político no contexto global (Alho, 2012). Dessa forma, o novo milênio traz um grande desafio para a ciência brasileira que seria a exploração racional e eficiente do meio ambiente. A exploração de forma sustentável da biodiversidade seria a resposta para essa questão, contribuindo, assim para a melhoria da qualidade e ampliação da expectativa de vida da população brasileira (MORAES FILHO, 2010).

A natureza, desde a antiguidade é explorada como uma fonte de produtos naturais para o tratamento de diversas enfermidades, pois este ambiente é tido como uma rica fonte de compostos com propriedades terapêuticas (MOLINSKY *et al.*, 2009; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009). Atualmente, não é diferente, continuamos em uma busca constante por novos meios de cura com base em novos componentes químicos ou princípios ativos de produtos da biodiversidade, no potencial farmacêutico de inúmeras espécies de micro-organismos, plantas e animais, além da busca da medicina preventiva nesses novos produtos da diversidade biológica (ALHO, 2012).

Moléculas bioativas, que foram obtidas a partir de diversos recursos naturais, incluindo micróbios terrestres e marinhos, plantas e animais (invertebrados e vertebrados) e seus derivados, foram validados por suas potenciais propriedades antimicrobianas. Essas moléculas ainda podem apresentar atividade anticancerígena, anticoagulante, antiparasitária e imunossupressora. Esses compostos antibióticos por serem não tóxicos ou menos tóxicos para

as células hospedeiras apresentam um papel vital no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (RAJESHKUMAR e SUNDARARAMAN, 2012).

Produtos naturais são os agentes antibacterianos mais importantes. O número total de produtos naturais produzidos foi estimado a estar entre 500.000 e 600.000. As estruturas de 160.000 produtos naturais já foram elucidadas. Cerca de 100.000 destes são a partir de plantas (DEMAIN, 2009). De cada 150 medicamentos receitados e comercializados nos Estados Unidos, 118 são elaborados a partir de produtos originários da biodiversidade, como plantas, fungos, bactérias e animais (CHIVIAN e BERNSTEIN, 2008). Entretanto os organismos procariontes e alguns fungos desempenham um importante papel na produção de metabólitos secundários com potenciais aplicações terapêuticas, onde, a maior fonte de novas moléculas não são plantas, mas fungos e bactérias (RAW, 2007).

Aproximadamente 20.000 metabólitos microbianos têm sido utilizados na indústria farmacêutica como drogas antimicrobianas, antivirais e antitumorais (RAJESHKUMAR e SUNDARARAMAN, 2012). Entretanto, ainda existe uma necessidade urgente de descobrir novos metabólitos secundários oriundos de micro-organismos, para serem utilizados em prol da medicina (DEMAIN, 2009).

Contudo, hoje, sem dúvida, é grande o impacto causado pela população humana sobre a natureza, proporcionando drástica perda da biodiversidade. Essa degradação biótica, especialmente nas regiões tropicais, preocupa autoridades e ambientalistas no mundo inteiro, principalmente pelo fato de que a programação genética contida em cada espécie é única, original, e, quando essa espécie é extinta, essa informação é perdida para sempre, bem como seu potencial biológico (ALHO, 2012).

2.7 Bioprospecção de micro-organismos com potencial antimicrobiano no bioma cearense

A enorme diversidade de micro-organismos no planeta é um fator determinante que deve ser mantido em mente para o desenvolvimento futuro de novas drogas (DEMAIN, 2009). Vale ressaltar que a competição pela sobrevivência e as pressões ambientais conduzem a evolução desses micro-organismos (defesa, ataque e diversidade de sinalização), determinando, assim, a diversidade biológica e o desenvolvimento de potenciais novas drogas químicas (SINGH e MACDONALD, 2010).

Segundo dados de DEMAIN (2009), em 2002, os micro-organismos foram a fonte de 22.500 compostos bioativos. Destas moléculas, 17% foram obtidas a partir de bactérias unicelulares, 45% a partir de actinomicetos e 38% a partir de fungos. Dentro deste ponto de

vista os fungos merecem um destaque especial pelo fato de que se avalia que existam 1,5 milhões de espécies fúngicas, das quais apenas 74.000 são conhecidas (AJESH e SREEJITH, 2009).

Os fungos têm uma longa história de uso na medicina popular, especialmente nos países asiáticos, e seu estudo tornou-se uma questão de grande importância nas últimas décadas (LINDEQUIST *et al.* 2010). Entretanto, a investigação de metabólitos secundários, oriundos de fungos, se deu início através da descoberta da penicilina, obtida do fungo *Penicillium chrysogenum*, por Alexander Fleming, em 1928, e seu uso clínico, na década de 1940, a bioprospecção de micro-organismos e seus produtos, tornaram-se uma via interessante para o descobrimento de novos compostos (CRAGG e NEWMAN, 2013).

Desde então estes micro-organismos tornaram-se um terreno de busca para novas drogas (STROBEL e DAISY 2003; LARSEN *et al.*, 2005). Nos anos posteriores, vários outros agentes antimicrobianos de origem fúngica, como griseofulvina (GROVE *et al.*, 1952) e cefalosporina C (NEWTON e ABRAHAM, 1955) foram descobertos. Isso estimulou as empresas farmacêuticas para provar e analisar grandes coleções de cepas fúngicas especialmente para produção de antibióticos (BUTLER, 2004). Conseqüentemente, muitos compostos naturais foram isolados. Estes compostos, em sua maioria, podem ser produzidos em grandes quantidades e com um custo razoável, por fermentação empregando estirpes de fungos selvagens ou geneticamente modificados (ALY *et al.*, 2011).

Nos primeiros anos da descoberta das drogas oriundas de fungos, os organismos eram principalmente isolados de amostras de solo, contudo ao longo dos últimos anos, a descoberta de compostos bioativos a partir de microrganismos do solo tornou-se mais difícil devido à grande exploração deste recurso. Para ultrapassar este problema, outros habitats têm sido explorados, principalmente aqueles em que os micro-organismos estão em associação simbiótica, tais como relação de endófitos. A investigação sobre microrganismos endofíticos, que é mais recente do que investigação sobre os micróbios do solo tem contribuído para a descoberta de moléculas biologicamente ativas (JOSEPH e PRIYA, 2011; CRAWFORD e CLARDY, 2011; KURTBOEKE, 2011; GUTIERREZ *et al.*, 2012).

Atualmente, as drogas derivadas de fungos apresentam um grande valor no mercado global, onde a amoxicilina e a ciclosporina geraram lucros de 1,7 bilhões e 1,4 bilhões de dólares, respectivamente, durante o período 2004-2008 (SINGH e MACDONALD, 2010).

Portanto dentro deste contexto, espera-se que através da sondagem de fungos, especialmente leveduras, em nichos ecológicos novos ou menos investigado, novas estruturas

drogas ou agrotóxicos possam ser descobertas (SINGH e MACDONALD, 2010). Dentre os diversos biomas existentes no Brasil, o bioma cearense apresenta peculiaridades únicas. Uma vez que no Estado do Ceará coexistem diversos biomas entre eles: praias, serras, sertões, caatinga e resquícios de Mata Atlântica (CEARÁ, 2011). Nas últimas décadas, esse potencial biotecnológico vem correndo um sério risco de desaparecer devido a fenômenos cada vez mais frequente como os processos de desertificação, queimadas e biopirataria (ICMBio 2010). A microbiota fúngica desses ambientes e o seu potencial biotecnológico é totalmente desconhecida. Assim o Bioma Cearense surge como um importante ecossistema para a busca de novos fungos, bem como a procura por novas moléculas antimicrobianas.

3. HIPÓTESES

- 1) Leveduras obtidas do bioma cearense produzem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana?
- 2) Os metabólitos secundários obtidos de Leveduras pertencentes ao bioma cearense apresentam atividade por meio de danos na membrana em SARM?

4. OBJETIVO GERAL

Realizar a prospecção de compostos com atividade biológica a partir de extratos obtidos de fermentados de leveduras isoladas de diversas amostras do bioma cearense, com o intuito de identificar novas espécies e avaliar o seu potencial biotecnológico.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

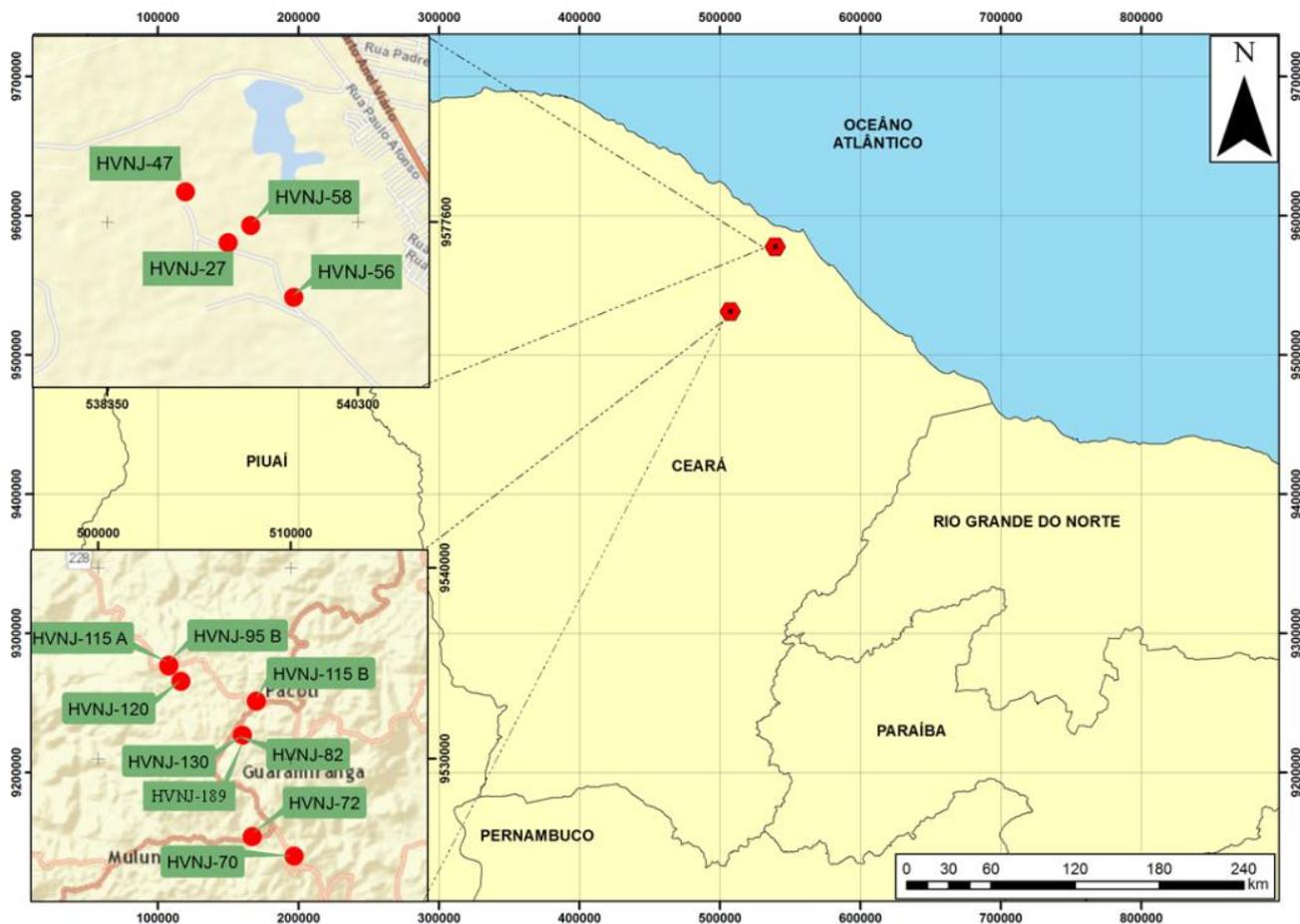
- ✓ Isolar e cultivar leveduras oriundas do Macro Regiões do Estado do Ceará: Região Metropolitana de Fortaleza e Região da Serra de Guaramiranga.
- ✓ Identificar a nível molecular as leveduras isoladas;
- ✓ Extrair os metabólitos secundários oriundos das leveduras obtidas do bioma cearense;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, o potencial antimicrobiano dos extratos obtidos pela fermentação dos isolados frente a cepas de bactérias patogênicas, incluindo SARM, pertencentes à bacterioteca do LABEL da Universidade Federal do Ceará;
- ✓ Caracterizar o perfil químico dos extratos ativos com ênfase no isolamento e reconhecimento de metabólitos secundários com atividade biológica;
- ✓ Determinar o possível mecanismo de ação dos extratos ativos através da citometria de fluxo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Coleta do material/Plaqueamento das amostras/Purificação dos micro-organismos

As amostras foram coletadas em algumas regiões do Estado do Ceará encontram-se marcadas na Figura 8 (ver página 34). Estas foram acondicionadas em plásticos estéreis e guardadas em caixas térmicas devidamente rotuladas e identificadas. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram diluídas em água mili-Q na proporção de 1:5 (m/v). Após essa etapa, 1 mL do homogeneizado foi plaqueada em placas de batata dextrose ágar (BDA). Após o plaqueamento das amostras, as placas foram armazenadas em estufa a 35°C por sete dias. A seleção das leveduras foi realizada por diferenças nos aspectos morfológicos de cada colônia observadas a olho nu. A purificação das linhagens foi feita em placas de Ágar Sabouraud acrescidas de Clorafenicol (5%), através da técnica de estria por esgotamento, até que as cepas estivessem completamente puras. Confirmada a pureza, as leveduras isoladas foram armazenadas e identificadas com o auxílio de técnicas moleculares (Kelecon, 2002; WAGNER-DÖBLER *et al.*, 2003; WILKE *et al.*, 2003).

Figura 8: Mapa dos locais de amostragem no estado do Ceará.



HVNJ-27(Latitude: 3.82329/Longitude: 38.6465); **HVNJ-70**(Latitude: 4.29845/ Longitude: 38.9087; **HVNJ-72** (Latitude: 4.28922/ Longitude: 38.9283); **HVNJ-82** (Latitude: 4.2413/Longitude: 38.9328); **HVNJ-95 B**(Longitude: 4.20817/Latitude: 38.9672); **HVNJ-115 A** (Latitude: 4.20848/Longitude: 38.9673); **HVNJ-115 B**(Latitude: 4.22508/ Longitude: 38.9263); **HVNJ-120** (Latitude: 4.21568/ Longitude: 38.9616); **HVNJ-130** (Latitude: 4.24134/ Longitude: 38.9328); **HVNJ-138** (Latitude: 4.21238/ Longitude: 38.9454); **HVNJ-189** Latitude: 4.24134/ Longitude: 38.9328).

5.2. Identificação molecular

O DNA genômico foi purificado utilizando um protocolo baseado no método CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), tal como descrito anteriormente por WARNER *et al.* (1996). A região do DNA nuclear que compreende os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e o gene do rRNA 5.8S foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') como sugerido por WHITE *et al.* (1990).

Reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 mL, que continha DNA genômica (300-400 ng), tampão de reação 1X GoTaq tampão de reação (Promega, Madison, WI, EUA), MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA), 0,5 µM de cada iniciador e 1,25 U de DNA Polimerase GoTaq (Promega). As reações foram realizadas num termociclador de gradiente Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) programado para um passo inicial de desnaturação (2 min a 95 ° C) seguido por 35 ciclos de 1 min a 95 ° C, 1 min a 60 ° C, e 3 min a 72 ° C. O último ciclo foi seguida por uma incubação final de 10 min a 72 ° C. Amostras de controle contendo todas as componentes da reação, com exceção DNA foram usadas para testar a ausência de contaminação DNA ocorreu.

A especificidade das amplificações foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (Sambrook *et al.*, 1989). A especificidade das amplificações foi determinada por eletroforese em 1,0% de gel de agarose. Os restantes produtos amplificados foram purificados utilizando as ILUSTRAÇÕES GFX PCR DNA e Banda Gel Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences) e as concentrações dos produtos de amplificação purificados foram determinadas por medição da absorbância a 260 nm dez vezes diluída. O sequenciamento do DNA foi efetuado na Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul), utilizando o método de terminação de cadeia didesoxi Sanger's. Ambas as cadeias de cada amplicom foram sequenciados utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5. As sequências foram então montadas usando o pacote Phred / Phrap / Consed (EWING *et al.*, 1998; EWING and GREEN, 1998; GORDON *et al.*, 1998). Os limites iniciais e finais do ITS1 e ITS2 foram identificados por comparação com sequências anotadas da ITSoneDB (Santamaria *et al.*, 2012) e ITS2 database (KELLER *et al.*, 2009), respectivamente. Os ITS / 5.8S sequências foram depositadas no banco de dados GenBank (números de acesso KJ740170- KJ740173, KJ740178, KJ740180- KJ740182, KJ740185, KJ740189 e KJ740190) e comparadas às

disponíveis na sequência de DNA dos bancos de dados utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

5.3. Cultivo e extração química das culturas de leveduras

Para a obtenção dos extratos, as cepas de leveduras purificadas foram inoculadas em erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de meio (0.4% glicose, 1% extrato de malte, 0.4% extrato de levedura). As culturas foram incubadas a 35°C por 48 h (Ding *et al.*, 2008). Os fungos isolados foram inoculados e cultivados em diferentes meios nutritivos. Alíquotas de 5mL das culturas de 48h foram colocadas em dois erlenmeyers de 1000 mL, contendo 400 mL de dois meios de cultura distintos: **(I)** (1% de glicose, 0.25% de extrato de levedura, 1% de peptona); **(II)** (1% de glicose, 1% de extrato de levedura, 0.25% de peptona). As culturas foram mantidas a 28°C por 14 dias. Após o crescimento no meio líquido, os extratos de cada levedura foram extraídos com acetato de etila (EtOAc) e concentrados em evaporador rotativo. A massa seca foi ressuspensa em DMSO (0,1%), onde ficaram prontas para os testes de rastreamento da atividade antimicrobiana (XIONG *et al.*, 2009).

5.4. Micro-organismos

As cepas de controle padrão utilizados nesses experimentos foram *Escherichia coli* (ATCC® 8739TM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027TM), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538TM), *Bacillus subtilis* (ATCC® 6633TM) e SARM (ATCC® 65398TM). Neste estudo foram usadas 11 cepas de SARM que foram bioquimicamente identificadas e que pertencem ao Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL) da Universidade Federal do Ceará.

5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana (Método de Difusão em Ágar)

Os testes foram realizados segundo o documento M02-A11 (CLSI, 2012) com modificações. Poços, com 6 mm de diâmetro, foram confeccionados na camada de ágar da placa de Petri, como descrito por SHEN *et al.* (2014). Nesses poços foram aplicados um volume de 20 µL (30 mg/mL) dos extratos obtidos. As placas foram incubadas por 20 horas a 35°C. Os solventes bem como os diluentes utilizados na dissolução dos extratos foram usados como controle negativo. Foram considerados como compostos promissores aqueles com halo superiores a 30 mm. Os discos de antibióticos utilizados nos ensaios de sensibilidade aos antimicrobianos foram Oxacilina 1µg (OXA), Cefepime 30µg (CPM), Amicacina 30µg (AMI), Cefoxitina 30µg (CFO) e Clindamicina 2µg (CLI) (Diagnósticos Microbiológicos Especializados – D.M.E., BRA) (CLSI, 2013).

5.6. Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os extratos que apresentaram potencial efeito antimicrobiano, pelo método de difusão em ágar foram submetidos à determinação do CIM pelo método de microdiluição em caldo. A determinação do CIM foi realizada de acordo com o documento M07-A9 (CLSI, 2012). Os extratos foram avaliados na faixa de concentração de 1024-0.5 µg/mL. Vancomicina (Sigma-Aldrich Co., USA) foi usada como controle positivo, na faixa de 0.25-64 µg/mL e o DMSO foi usado como controle negativo, na faixa de 0.039–10% v/v. As placas foram incubadas a 35°C por 20 horas. A inibição do crescimento microbiano foi determinada visualmente (CLSI, 2013).

5.7. Exposição das células de SARM aos extratos mais ativos

Para determinação da integridade de membrana, da fragmentação do DNA e da exposição da fosfatidilserina foi utilizada uma única cepa de SARM (**SARM 1**). As suspensões celulares da estirpe resistente foram obtidas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial, incubadas em caldo BHI a 37 °C por 20h. As células foram colhidas, centrifugadas (1600g por 10 min a 4°C) e lavadas duas vezes com uma solução salina 0.85% (1200g por 5 min a 4°C), e então ressuspensas (~10⁶ células/mL) com tampão HEPES (Sigma Chemical Co., EUA) suplementado com glicose 2%, pH 7.2. Uma suspensão de bactérias (5 x 10⁶ UFC/mL) foi incubada a 35°C por 20 horas com os extratos ativos na concentração de 2x CIM (SILVA *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 1998).

5.8. Determinação da integridade de membrana

A integridade da membrana das estirpes bacterianas foi avaliada pelo teste de exclusão com 2 mg/L de iodeto de propídio (PI). Após 20 horas de incubação com os extratos, alíquotas foram retiradas e analisadas por citometria de fluxo. Foi avaliado um total de 10.000 eventos por experimento (n = 2), com os detritos celulares omitidos da análise. A fluorescência celular foi então determinado por citometria de fluxo em um Guava EasyCyte™ Mini System cytometer (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) e analisadas com o software 4.1 CytoSoft (ANDRADE NETO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 1998)

5.9. Análise da fragmentação do DNA

Para a análise da fragmentação do DNA, foi realizada a técnica de desoxinucleotidil-transferase mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL). Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante do kit (Roche, Suíça). As células tratadas (**item 5.7**) foram fixadas em 7% de paraformaldeído à temperatura ambiente. As células fixadas foram penetradas com 1% de Triton X-100 durante 10 minutos em gelo, depois incubadas com a

mistura reacional de TUNEL durante 1 h a 37 ° C. As células foram então examinadas utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão). Duzentas células foram contadas por amostra para determinar o percentual de células positivas (DWYER *et al.*, 2012).

5.10. Análise da exposição de fosfatidilserina

As células de SARM (**item 5.7**) foram coradas com FITC anexina V e PI utilizando um kit de detecção de apoptose FITC anexina V (Guava nexin Kit, Guava Technologies). Subsequentemente, foram lavadas com PPB (Tampão Fosfato de Potássio, pH 6.0) e incubadas em tampão de ligação de anexina contendo 5 mL/mL de FITC anexina V e 5 mL de PI para 20 min. As células foram depois analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte Mini System). Para cada experimento (n = 3) 10.000 eventos foram avaliadas e os detritos celulares foram omitidos da análise (DWYER *et al.*, 2012; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

5.11. Isolamento e cultura de leucócitos humanos

Foi usado sangue heparinizado, oriundo de doadores não fumantes saudáveis que não tinham tomado qualquer droga pelo menos 15 dias antes da amostragem, os leucócitos foram recolhidos e isolados utilizando centrifugação em gradiente de densidade usando Histopaque-1077. As células foram lavadas e re-suspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U / mL de penicilina, 100 ug / mL de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 37 ° C e sob uma 5 % atmosfera CO₂. Fito-hemaglutinina-2% (CULTILAB, Campinas, Brasil) foi adicionado no início das culturas. Após 24 h, as células foram tratadas com os compostos do presente trabalho (DA SILVA *et al.*, 2014; CAVALCANTI *et al.*, 2009).

5.12. Toxicidade dos extratos obtidos das leveduras frente a leucócitos humanos

A citotoxicidade dos compostos testados contra leucócitos foi avaliada pelo ensaio do MTT (brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich Co., EUA). Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1,5 x 10⁶ células / ml). Os compostos foram dissolvidos em DMSO a 1% (Sigma Chemical) a 0,19-100 ug / ml e as soluções resultantes foram adicionadas aos poços. Após 72 h de exposição, o sobrenadante foi substituído por meio fresco contendo MTT (0,5 mg / mL). Após 3 h, o produto de formazan de MTT foi dissolvido em DMSO e a absorbância foi medida a 595 nm (Beckman Coulter® espectrômetro DTX-880) (DA SILVA *et al.*, 2014; CAVALCANTI *et al.*, 2009).

5.13. Análise do perfil químico dos extratos obtidos usando Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS)

Os extratos obtidos a partir do cultivo das leveduras em diferentes meios foram submetidos a análise do perfil dos metabólitos por em CG-MS acoplado com um espectro de massa.

5.13.1 Derivatização dos extratos

Os extratos (1 mg) foram submetidos à derivatização com uma solução de piridina (1 mL), TMCS (cloreto de trimetilsilano) e 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano na proporção de 9:3:1, respectivamente. Em seguida, os mesmos foram agitados em vortex por 10 min e incubados em um bloco de aquecimento a 60°C durante 60 minutos. Finalmente, as amostras derivatizadas foram transferidas para as vias do cromatógrafo gasoso usando uma pipeta de Pasteur (MARQUES, R.A. 2011).

5.13.2 Análise dos extratos

As amostras foram analisadas através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O volume de 1µL das amostras foi injetado. A separação dos compostos foi feita utilizando-se uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm d.i., 0,25µm de espessura do filme). O gás Hélio foi usado para o arraste com uma velocidade linear de 0,9 mL/s. O programa de temperatura do forno foi: temperatura inicial de 160°C, 160° a 270°C a 4°C/min, e depois 270°C por 20 min. A temperatura do injetor era de 250°C. Os parâmetros do espectrômetro de massas no modo de impacto eletrônico foram: temperatura da fonte de íons, 230° C; energia dos elétrons, 70 eV; corrente do filamento, 34,6 µA; voltagem do multiplicador de elétrons, 1200 V (MARQUES, R.A. 2011).

5.13.3 Identificação dos compostos

Os compostos foram identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com os espectros existentes no banco de dados do equipamento e por comparação visual dos espectros de massas com dados contidos na literatura (MARQUES, R.A. 2011).

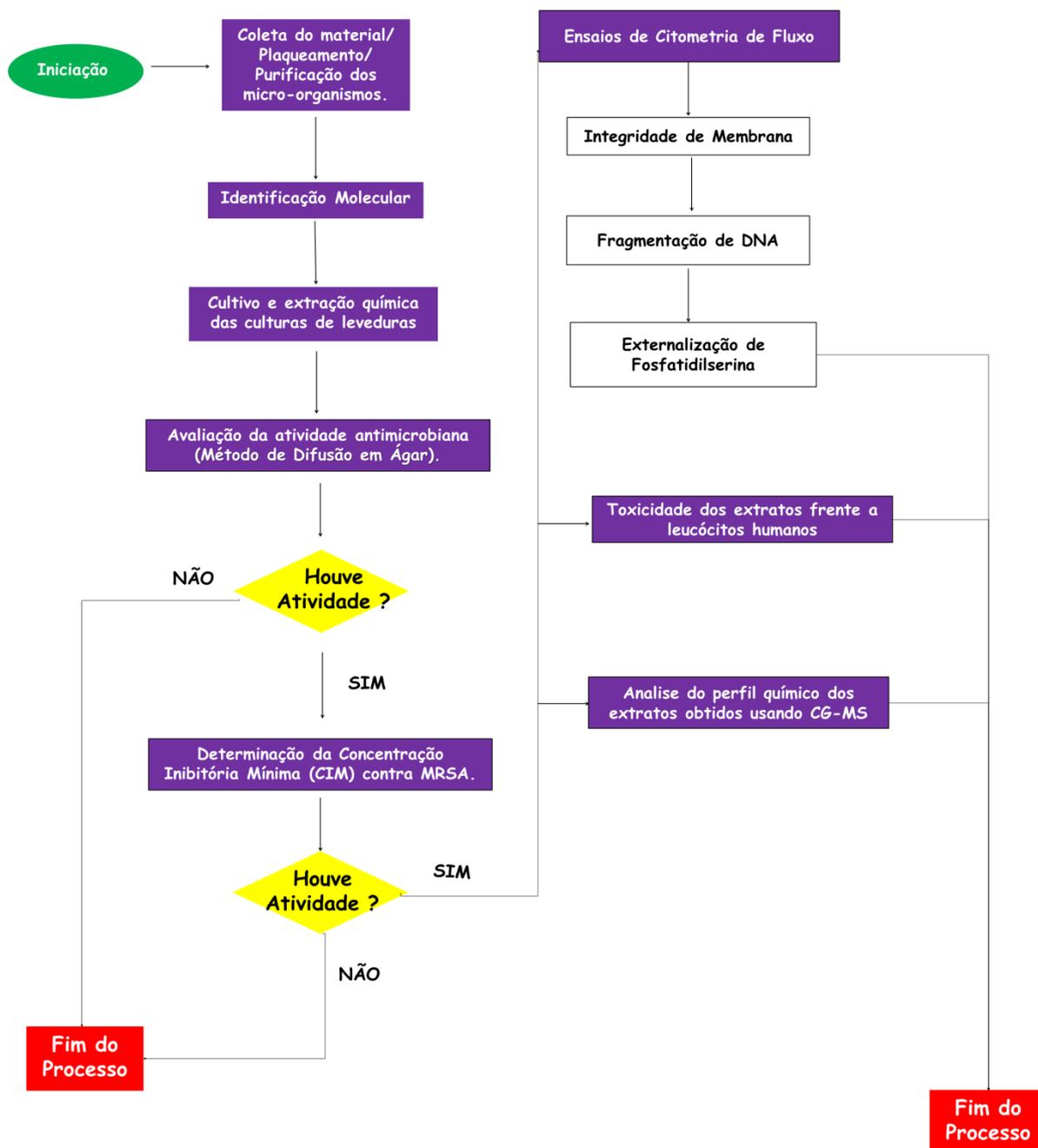


Figura 9: Fluxograma da metodologia desenvolvida

6. RESULTADOS

6.1 Isolamentos das amostras

Usando os meios seletivos e as condições de cultivo descritas, foram isoladas onze cepas de leveduras, de várias amostras (solo, flores, folhas, frutos, madeira em decomposição e água) do bioma cearense, conforme discriminadas na Tabela 1 (ver página 45).

6.2 Identificação Molecular

Para a identificação das 11 cepas utilizadas neste trabalho a região completa ITS/5.8S (ITS1, 5.8S, e ITS2) do DNA ribossômico nuclear foi amplificado e totalmente sequenciado. Estas sequências de ITS/5.8S foram comparadas às depositadas em bancos de dados de sequências de DNA, e com base nos percentuais de identidade de sequência, que foram recuperados nas buscas BLAST, as estirpes estavam determinados a pertencer a 5 espécies, como mostrado na Tabela 1(ver página 45).

6.3 Crescimento das leveduras em condições nutricionais distintas

Foram testados dois meios de cultura diferentes, a fim de avaliar efeitos prévios dos mesmos sobre o crescimento e a produção de compostos bioativos. Ao analisarmos a Tabela 2 (ver página 46), a maioria das leveduras cresceu de maneira semelhante nas condições nutricionais, com exceção dos isolados **HVNJ-138 (II)** e **HVNJ-189 (II)** que não apresentaram crescimento adequado nos respectivos meios em que foram cultivados.

6.4 Atividade antimicrobiana dos extratos

Todos os extratos obtidos a partir dos isolados foram testados quanto à sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas contra quatro cepas de coleção (ATCC), sendo duas bactérias Gram positivas e duas Gram negativas. No total, foram testados 22 extratos orgânicos quanto a sua atividade antimicrobiana, utilizando o método de difusão em ágar. De acordo com a Tabela 3 (ver página 47), observamos que 59% (13) dos extratos obtidos, parecem ter atividade *in vitro* frente a cepas de bactérias Gram positivas. Contudo, sete deles aparentam ter um espectro de ação maior, pois foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram negativas. Estes apresentaram zonas de inibição superiores a 30 mm, quando comparadas ao controle negativo (DMSO 0.1%). Devido a isto, selecionamos estes extratos para serem testados frente a quatro cepas de SARM. Os resultados encontram-se discriminados na Tabela 3, onde observamos que todos os extratos testados propiciaram uma inibição no crescimento das estirpes resistentes.

6.6 Determinações do CIM dos extratos mais ativos frente a cepas de SARM

Os extratos que apresentaram atividade inibitória contra as cepas de SARM tiveram o seu CIM determinado. Todas as cepas estudadas foram inibidas pelos extratos ativos, com diferentes graus de inibição. A Tabela 4 (ver página 49) mostra uma potencial atividade antimicrobiana de sete extratos contra os isolados clínicos de SARM, com MICs variando entre 34-512 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstraram serem promissores, portanto, decidimos investigar o possível mecanismo de ação destes extratos em cepas de SARM, utilizando técnicas de citometria de fluxo.

Tabela 1. Cepas de leveduras isoladas de amostras ambientais no estado do Ceará.

Cepa	Fonte	Latitude (° S)	Longitude (° W)	Espécies	GenBank números de acesso das sequências ITS / 5.8S
HVNJ-27	Folhas	3.82329	38.6465	<i>Candida tropicalis</i>	KJ740185
HVNJ-70	Tronco	4.29845	38.9087	<i>Candida tropicalis</i>	KJ740182
HVNJ-72	Folhas	4.28922	38.9283	<i>Candida tropicalis</i>	KJ740181
HVNJ-82	Tronco	4.2413	38.9328	<i>Candida tropicalis</i>	KJ740180
HVNJ-95 B	Folhas	4.20817	38.9672	<i>Exophiala dermatitidis</i>	KJ740171
HVNJ-115 A	Folhas	4.20848	38.9673	<i>Candida parapsilosis</i>	KJ740190
HVNJ-115 B	Tronco	4.22508	38.9263	<i>Candida parapsilosis</i>	KJ740189
HVNJ-120	Pedra	4.21568	38.9616	<i>Candida albicans</i>	KJ740178
HVNJ-130	Folhas	4.24134	38.9328	<i>Trichosporon asahii</i>	KJ740172
HVNJ-138	Solo	4.21238	38.9454	<i>Exophiala dermatitidis</i>	KJ740170
HVNJ-189	Folhas	4.24134	38.9328	<i>Trichosporon asahii</i>	KJ740173

Tabela 2. Cultivo de Leveduras em meios de cultura com composição diferente, por 14 dias. G, glicose; Y, extrato de levedura; P, peptona. O crescimento foi estimado visualmente (+++ melhor crescimento; ++ crescimento médio; + fraco crescimento). Este código será usado nas Tabelas 3-6 e Figuras 1-4.

Código	Fonte de Carbono (10g/L)	Fonte de Nitrogênio (g/L)	Crescimento	Cor do extrato
HVNJ-27 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Azul
HVNJ-27 (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-70 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-70 (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-72 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-72 (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-82 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-82 (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-95B (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-95B (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-115A (I)	Glicose	10Y+0.25P	+++	Amarelo
HVNJ-115A (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-115B (I)	Glicose	10Y+0.25P	+++	Amarelo
HVNJ-115B (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-120 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-120 (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-130 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-130 (II)	Glicose	0.25Y+10P	++	Amarelo
HVNJ-138 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-138 (II)	Glicose	0.25Y+10P	+	Amarelo
HVNJ-189 (I)	Glicose	10Y+0.25P	++	Amarelo
HVNJ-189 (II)	Glicose	0.25Y+10P	+	Amarelo

HVNJ-115 B (I)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
HVNJ-115 B (II)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
HVNJ-130 (I)	36.0	37.3	34.7	33.3	18	35	11	14.5	35
HVNJ-130 (II)	35.0	35.3	38.0	37.0	18	36	11.5	15	34.5
HVNJ-138 (I)	37.3	34.7	35.3	37.7	33	36	12.5	13	32.5
HVNJ-138 (II)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
HVNJ-189 (I)	36.7	38.3	37.7	35.7	33	37.5	12.5	14	35.5
HVNJ-189 (II)	35.7	34.7	40.7	35.3	34	37	12.5	15	35
OXA	21	26.5	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
CPM	33	26	30	30	14	26	NE	NE	14
AMI	32	23	21	24	NE	29	24	24	22
CFO	25	34	27	27	NE	14	12	NE	14
CLI	30	24	NE	NE	8.0	NE	NE	NE	NE

^aCepa de SARM isolada de amostras biológicas. ^bNC – Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO, 0.1%) utilizado para a diluição das substâncias teste; **OXA**– Oxacilina, **CPM**–Cefepima, **AMI**– Amicacina, **CFO**– Cefoxitina, **CLI**– Clindamicina. ^cNE: Nenhum efeito. O método de difusão de agar foi realizado de acordo com o protocolo M02-A11 do CLSI e os pontos de corte foram baseados no protocolo M100-S23 do CLSI. Todos os extratos HVNJ tiveram suas concentrações fixadas em 30 mg / ml. O halo (mm) representa as médias geométricas de, pelo menos, três grupos halo determinados em dias diferentes.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos oriundos de leveduras ambientais isoladas no Ceará contra cepas de SARM.

Cepas ^a	VAN ^b	CIM (µg/mL)						
		HVNJ- 27(I) ^b	HVNJ- 27 (II) ^b	HVNJ- 130 (I) ^b	HVNJ- 130 (II) ^b	HVNJ- 138 (I) ^b	HVNJ- 189 (I) ^b	HVNJ- 189 (II) ^b
SARM ATCC® 65398™	2	128	512	512	256	256	128	512
SARM 1*	4	136	136	132	132	72	68	34
SARM 2	4	256	128	96	96	192	192	64
SARM 3	4	128	128	64	96	192	96	48
SARM 4	4	72	72	40	32	72	40	36
SARM 5	2	128	512	512	256	256	128	512
SARM 6	2	16	512	512	32	128	16	512
SARM 7	2	64	256	512	32	64	16	512
SARM 8	2	32	512	512	32	64	64	512
SARM 9	2	64	256	512	32	128	16	512
SARM 10	2	64	256	512	32	16	16	512
SARM 11	2	64	256	512	128	128	16	512

^a Cepas de SARM. ^bVAN – Vancomicina; Extratos HVNJ. O CIM foi definido como a concentração mais baixa que produziu uma redução de 80% no crescimento de células bacterianas após 20 horas de incubação. A técnica de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com o protocolo M07-A9 do CLSI. As concentrações de VAN variaram 0,125-64 µg / mL e as concentrações dos extratos variaram 0,5-512 µg / mL. As CIMs representam as médias geométricas de, pelo menos, três CIMs determinadas em dias diferentes. * Isolado selecionado para a determinação do mecanismo de ação.

6.7 Danos na membrana plasmática em SARM após exposição aos extratos

A Figura 10 (ver página 49) revela que na presença do marcador iodeto de propídio (IP) parte das células tornaram-se PI-positivas quando tratadas com extratos após 20 h de exposição quando comparadas ao grupo controle ($p < 0.05$), o que demonstra que os extratos causam danos à membrana celular de cepas de SARM. Os tratamentos com os extratos **HVNJ-27 (I)** e **HVNJ-27 (II)** resultaram em maiores percentuais de células coradas com PI.

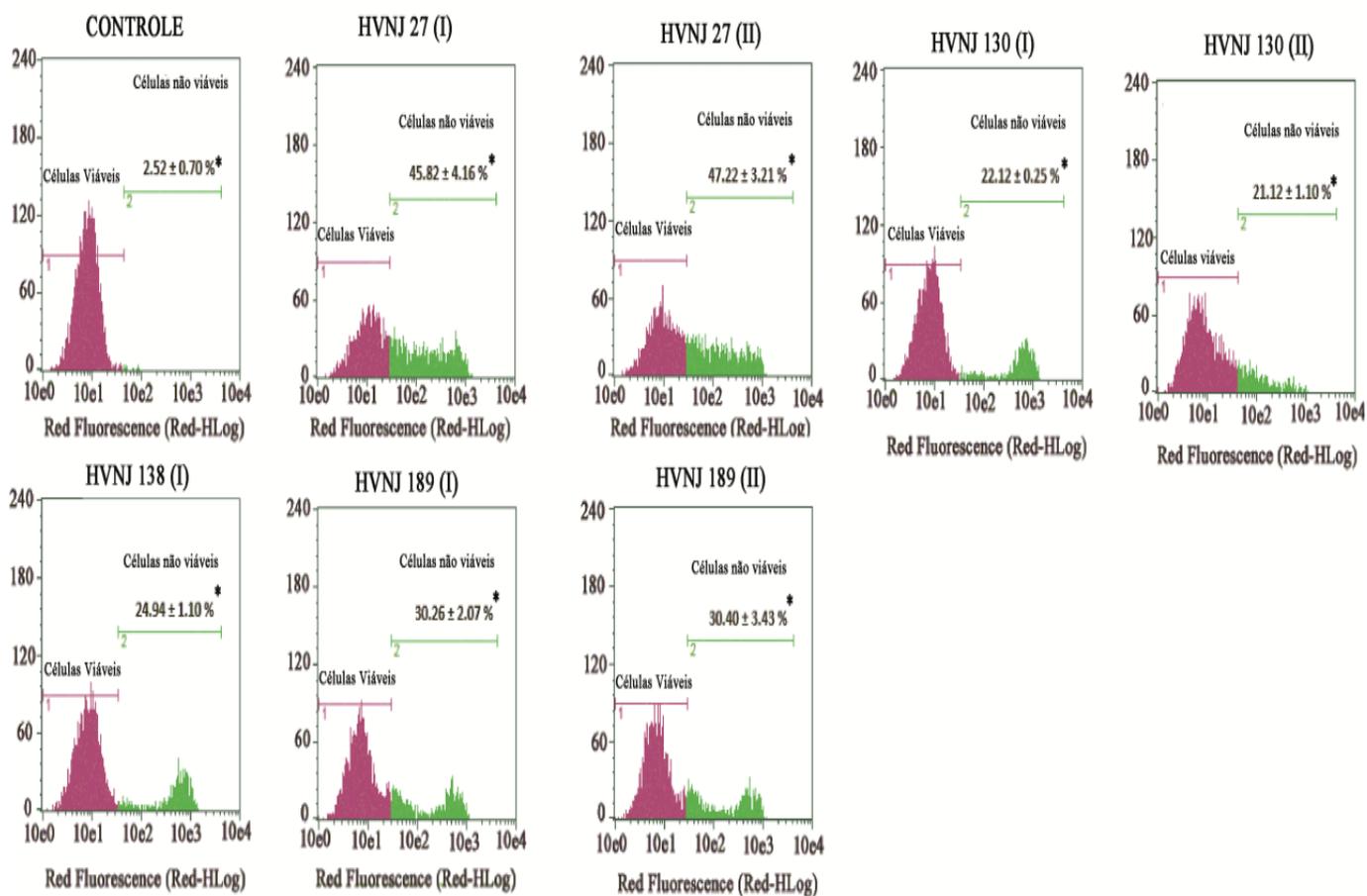


Figura 10: Efeito dos extratos HVNJ sobre a membrana plasmática de um isolado representativo de SARM. RPMI foi utilizado como controle negativo. * $p < 0.05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.8 Fragmentações do DNA induzida pelos extratos em cepas de SARM detectadas pelo TUNEL

A Figura 11 (ver página 51) mostra que após a exposição dos respectivos extratos, observamos um aumento significativo ($p < 0.05$) no percentual de células TUNEL positivas em comparação ao grupo controle. Uma vez que a TdT (Desoxinucleotidil-transferase terminal) age seletivamente na extremidade 3'-OH do DNA, as células de TUNEL-positivas tratadas com os extratos devem apresentar mais destas extremidades, o que representa uma fragmentação do DNA. Neste experimento, $62.0 \pm 2.4\%$ e $62.0 \pm 4.3\%$ das células de SARM tratadas com os extratos **HVNJ-138 (I)** e **HVNJ-27 (I)** foram TUNEL-positivas, sendo estes os extratos que ocasionaram mais danos ao DNA.

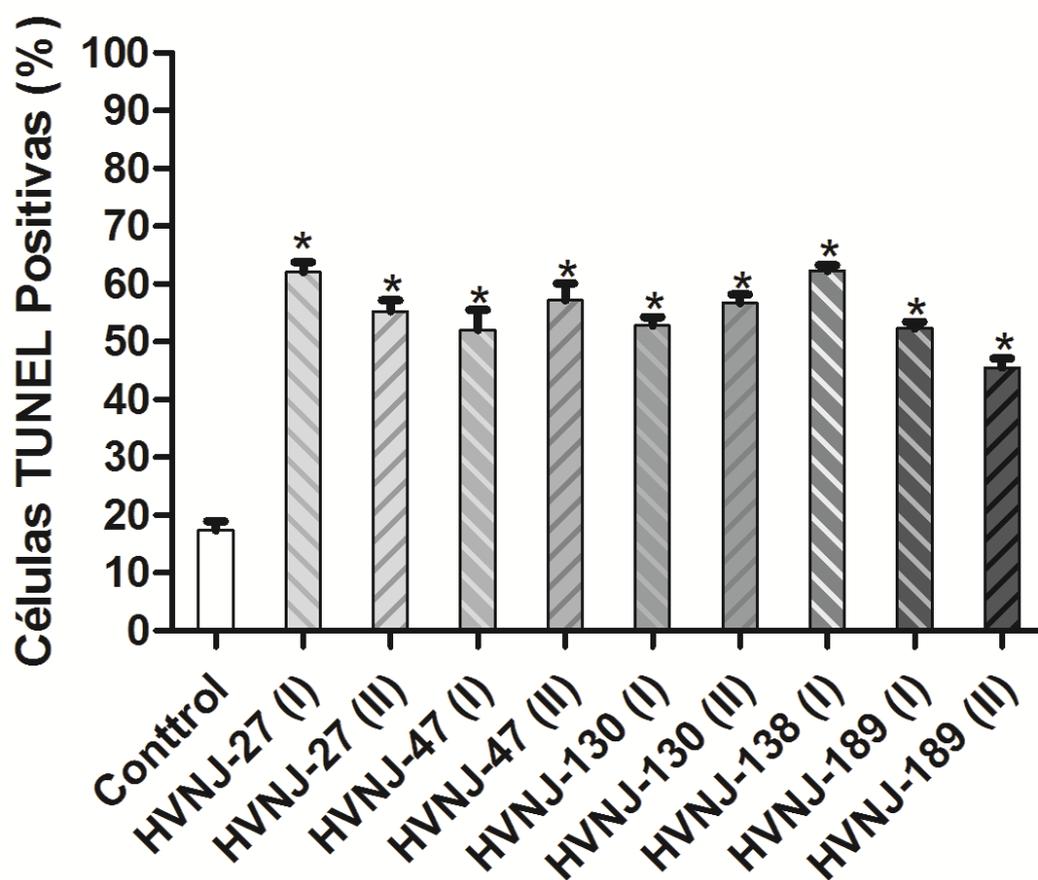


Figura 11: Ensaio TUNEL frente a um isolado representativo de SARM mostrando a fragmentação do DNA após a incubação com os extratos HVNJ. As barras indicam a porcentagem de células TUNEL positivas pré-tratadas com o controle (RPMI) e os respectivos extratos HVNJ após 24h de tratamento. * $p < 0.05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.9 Externalização da fosfatidilserina em SARM

A avaliação quantitativa da apoptose foi realizada pelo método da anexina V-FITC . O processo apoptótico recente é identificado pela externalização da fosfatidilserina, que se liga à anexina V após incubação. Assim, após 24 h de incubação das células de SARM com os extratos, a apoptose foi determinada pela marcação com anexina V por citometria de fluxo. Pode-se observar na Figura 12 (ver página 53) que apenas $11.5 \pm 3.6\%$ das células que não receberam tratamento com os extratos (grupo controle) apresentaram marcação positiva para a anexina V. No entanto, quando as células foram tratadas com os extratos houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0.05$) no número de células com marcação positiva para anexina V, em relação ao grupo controle. Os extratos **HVNJ-130 (I)** e **HVNJ-47 (II)** foram os que apresentaram um maior percentual de células anexina-positivas, com valores de $57 \pm 11.4\%$ e $56 \pm 6.2\%$, respectivamente.

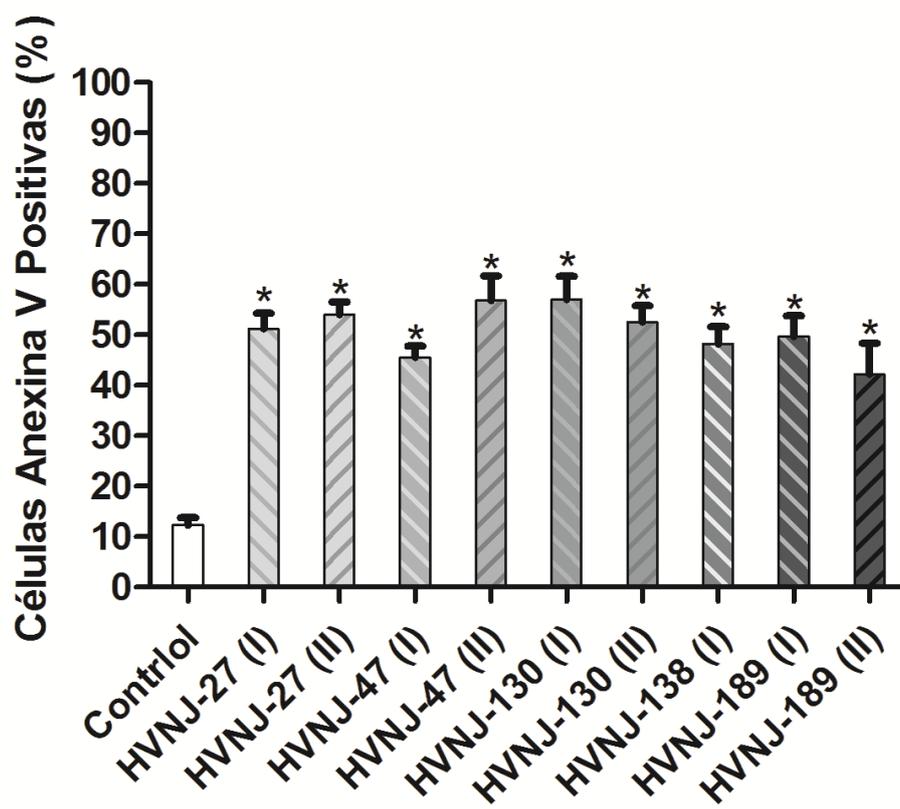


Figura 12: Externalização de fosfatidilserina. A intensidade de fluorescência indica a quantidade de fosfatidilserina exposta em células tratadas com os extratos HVNJ na concentração de 2x CIM. O percentual de células anexina V + nas estirpes representativas de SARM foi avaliada durante 24 horas. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.10 Atividades citotóxicas

A atividade citotóxica dos extratos mais ativos (halo ≥ 30 mm) foi avaliada contra leucócitos humanos (Tabela 5). É interessante ressaltar que aproximadamente 67% (5) dos extratos obtidos revelaram uma citotoxicidade baixa, com valores de CI 95% variando entre 84.9 e 95.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto que dois extratos foram considerados inativos.

Tabela 5. A atividade citotóxica dos metabólitos secundários derivados de leveduras nos leucócitos. Os dados são apresentados como valores de IC₅₀ e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata.

IC 95% ($\mu\text{g/mL}$)	
Compostos	Leucócitos IC ₅₀
NC ^a	NE ^b
HVNJ-27 (I)	95.73 \pm 0.10
HVNJ-27 (II)	86.49 \pm 4.15
HVNJ-130 (I)	84.90 \pm 4.07
HVNJ-130 (II)	92.59 \pm 1.10
HVNJ-138 (I)	>100
HVNJ-189 (I)	91.36 \pm 5.10
HVNJ-189 (II)	>100

^a O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO, 0,1%) utilizado para diluir as substâncias de teste

^b NE: Nenhum efeito.

6.11 Rastreamento químico dos extratos ativos

Através da análise por CG-MS foi identificado uma variedade de substâncias. A Tabela 6 (ver página 58) compara o perfil químico dos extratos e mostra que o glicerol foi a única substância presente nos 9 extratos analisados. Contudo, mais trabalhos estão em fase de desenvolvimento, com o intuito de caracterizar as características químicas e biológicas destes potenciais metabólitos, com o objetivo de descobrir compostos antimicrobianos para aplicação no mercado farmacêutico.

Tabela 6. Constituintes químicos identificados nos extratos oriundos de leveduras isoladas no Ceará.

1= HVNJ 130-I; 2=HVNJ 130-II; 3=HVNJ 47-I; 4=HVNJ 27-I; 5=HVNJ 47-II; 6=HVNJ 138-I; 7=HVNJ 189-II; 8=HVNJ 138-II; 9=HVNJ 189-I; 10=HVNJ 27-II

CAS	COMPOSTO	RT (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
108-67-8	Mesitileno	3.165										x
7381-30-8	1,2-Bis(trimetilsiloxi)etano	3.260										x
17887-27-3	2,2,4,7,7-pentametil-3,6-Dioxa-2,7-disilaoctano	4.065	x			x	x					
17596-96-2	Ácido 2-[(trimetilsilil)oxi]-trimetilsililester propanóico	4.385	x					x				
33581-77-0	Acido [(trimetilsilil)oxi]-trimetilsililester acético	4.645	x	x	x	x	x	x			x	
60-12-8	Fenil-etil álcool	5.535										x
55133-94-3	Ácido 3-[(trimetilsilil)oxi]-trimetilsililester butanóico	6.541					x					
55124-92-0	Ácido 3-metil-2-[(trimetilsilil)oxi]-trimetilsililester butanóico	6.681					x					
65-85-0	Ácido benzóico	6.845										x
55124-90-8	Ácido 3-metil-3-[(trimetilsilil)oxi]-trimetilsililester butanóico	7.728	x	x				x			x	
14629-58-4	2-feniletóxi-trimetilsilano	8.075			x	x	x					x
54890-08-3	Ácido 4-metil-2-[(trimetilsilil)oxi]-trimetilsililester pentanóico	8.555					x					
2078-12-8	Ácido trimetilsililester benzóico	8.625		x			x		x		x	
54890-09-4	Ácido 3-metil-2-[(trimetilsilil)oxy]-trimetilsililester pentanóico	8.630					x					
2078-12-8	Ácido trimetilsilylester benzóico	8.695					x					
54494-06-3	2,2,10,10-tetrametil-3,9-dioxa-2,10-disilaundecano	9.015								x		
55494-06-9	Ácido trimetilsililester octanóico	9.120									x	
6787-10-6	Tris(trimetilsilil)éter glicerol	9.705	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2078-18-4	Ácido trimetilsililester benzenacético	10.080	x	x		x	x	x			x	
40309-57-7	Ácido bis(trimetilsilil) ester butanenodióico	10.663	x	x	x		x	x			x	

16-6														
4376-20-9	Mono (2-etilhexil)-phthalate	45.595								x	x			X
7098-22-8	Tetratetracontano	46.510												X
1188-74-5	Ácido 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propylester hexadecanóico	46.565	x		x	x								
74367-36-5	Ácido trimethylsilylester docosanóico	46.995			x	x			x				x	
54284-47-8	1-Monooleoilglicerol trimetilsilileter	48.225	x											
6263-84-9	1,3,5-Trifenil-1,5-pentandiona	48.858								x				

7. DISCUSSÃO

No mundo estão descritas aproximadamente 99.000 espécies de fungos (Kirk *et al.* 2008), das quais aproximadamente 3,7% da diversidade mundial existiria no Brasil, sendo que a região Nordeste brasileira apresenta o maior número de registros relacionados a diversidade fúngica (Maia & Carvalho Júnior 2010). No presente trabalho, foram analisadas leveduras isoladas da região nordeste do Brasil, mais especificamente no estado do Ceará. Esta área representa um ecossistema diversificado e pouco investigado para o isolamento de leveduras produtoras de metabólitos com potencial antimicrobiano. É importante destacar que poucos trabalhos foram realizados com o presente assunto na região.

A maioria das leveduras descritas no presente trabalho são cosmopolitas e tolerantes ao calor, merecendo destaque as leveduras negras (*Exophiala dermatitidis*), cujo principal fator de virulência (produção de melanina) (Sidrim & Rocha, 2004) é profícuo para a adaptação a este nicho ecológico. Considerando-se os resultados na Tabela 1, a maioria das leveduras descritas no presente trabalho é cosmopolita, onde, um número mais elevado de leveduras, aproximadamente 54.5%, foi isolado a partir da vegetação local.

Segundo Mautone (2008) a superfície externa da folha (filoplano) é um importante substrato para o desenvolvimento de leveduras. Os nutrientes que estão disponíveis no filoplano, servem como base para o desenvolvimento das populações de leveduras que são depositadas através do vento ou carreadas por insetos e outros organismos. Outro ponto que merece destaque é fato de que os micro-organismos endófitos vivem pelo menos uma parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos vegetais, sem causar danos às suas plantas hospedeiras (Kusari *et al.*, 2012; Kogel *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2005). A maioria dos relatórios em endófitos mostrou a diversidade e o potencial de fungos em pesquisa prospecção (de Siqueira *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012).

A capacidade das leveduras colonizarem diferentes plantas contribui para a diversidade de espécies (Mautone, 2008; Ding *et al.*, 2008). Dentro deste contexto (Tabela 1), foi possível avaliar uma diversidade entre as espécies de leveduras, porém observamos uma prevalência de espécies do gênero *Candida*. Diversas publicações, entre as quais listas estaduais, regionais e gerais, apontam para a convergência das espécies do gênero *Candida* com plantas nativas da Caatinga (EMBRAPA, 2010). A Caatinga é um bioma extremamente peculiar e encontrado apenas no Brasil, estando presente em aproximadamente 46% da dimensão territorial do Estado do Ceará (Ceará, 2013). Vale ressaltar que pelo fato de possuir

um cunho único, este nicho ecológico pode nos propiciar a descoberta de novas moléculas com atividade biológica (Singh e Macdonald, 2010; Moraes Filho, 2010).

Durante a triagem das leveduras isoladas, quanto ao seu potencial antimicrobiano, os extratos, de uma forma geral, demonstraram uma maior atividade contra bactérias Gram-positivas. Mohseni *et al.*, (2013), também observaram uma maior atividade em bactérias Gram-positivas de extratos oriundos de actinomicetos isolados de sedimentos marinhos. Segundo Motamedi et al, (2010) e Darabpour *et al.*, (2012), este fato pode ser explicado por alguns motivos, tais como: a baixa permeabilidade proporcionada pela presença de múltiplas membranas nas bactérias Gram-negativas e pelo fato destas apresentarem enzimas no espaço periplasmático, que são capazes de quebrar moléculas estranhas ao micro-organismo.

Vale ressaltar, também, que no presente estudo detectamos uma potencial atividade antimicrobiana em relação a sete extratos ativos, onde estes apresentaram zonas de inibição, com mais de 30 mm em bactérias Gram positivas e Gram negativas. Segundo Mehravar & Sardari (2011), espera-se que o tamanho das zonas de inibição dos extratos seja, de fato, menores do que as de um composto puro, portanto podemos considerar os resultados encontrados bastante promissores.

Na pesquisa vigente, avaliamos a atividade dos nossos extratos mais ativos frente a cepas bacterianas com multirresistência as drogas (MDR), no caso, isolados clínicos de SARM. Os resultados deste estudo mostram que os extratos testados apresentaram efeitos contra estirpes de SARM, merecendo destaque os extratos **HVNJ-189 (I)** e **HVNJ 189 (II)**. Nossos dados vão de acordo com os encontrados por Darabpour *et al.*, (2012) e Kannan *et al.*, (2011).

No presente estudo observamos que as células de SARM que foram expostas aos extratos bioativos apresentaram uma absorção aumentada de PI, onde este achado pode ser um indicativo de que estes extratos promovem danos significativos ($p < 0.05$) a membrana células bacteriana (Silva *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2007). A membrana plasmática é um alvo latente para a ação antibiótica, pois moléculas que atuam neste sitio apresentam um maior potencial biológico por demonstrarem um rápido e extenso efeito antimicrobiano, além de ser mais difícil o desenvolvimento de resistência (Mehravar & Sardari, 2011; Bambeke *et al.*, 2008).

Contudo, apesar de parecer correto afirmar que as células de micro-organismos com comprometimento das membranas sejam consideradas mortas, ou até mesmo que células com a membrana intacta sejam células ativas, essas alegações não são necessariamente

subsistentes (Berney *et al.*, 2007; Nebe-Von-Caron *et al.*, 2000). Portanto se faz necessária uma avaliação do comprometimento de outros sítios nas células microbianas, após a exposição de drogas (da Silva *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2014; Neto *et al.*, 2014).

A morte celular programada (PCD) desempenha um papel crítico no ciclo de vida de diversas espécies bacterianas, onde, esta tem sido proposta como um alvo potencial para novas estratégias antibacterianas (Tanouchi *et al.*, 2013). No presente estudo, a marcação com anexina V/PI e o ensaio do TUNEL foram realizados para avaliar se os extratos testados induziriam uma morte celular por apoptose ou necrose. Levando os presentes achados em conjunto, demonstramos que estes extratos promovem a morte celular por apoptose nas células de SARM. Nossos dados vão de encontro com os de Dwyer *et al.*, (2012) que demonstraram características de morte celular semelhantes em cepas de *E. coli* após o tratamento com antibióticos bactericidas.

A manipulação das condições de cultura tem um impacto importante sobre o crescimento dos micro-organismos, onde, meios de cultura não aprimorados geralmente fornecem um baixo rendimento na produção de extratos ativos (Mehravar & Sardari, 2011; Xiong *et al.*, 2008), logo no presente estudo almejamos otimizar algumas condições de fermentação e avaliar se afetariam na produção de tais extratos. Verificou-se que as leveduras isoladas, de uma maneira geral, não apresentaram divergência na produção dos compostos antibióticos, com relação ao rendimento. Uma causa provável seria devido a manutenção dos níveis de glicose nos meios estudados. Este fato pode ser explicado segundo os achados de Xiong, *et al.* (2008), onde os mesmos descrevem que a adição de glicose em cultura aumenta o nível da produção de antibióticos, ao passo que o cultivo na ausência do açúcar produz poucos extratos bioativos.

Contudo, desconsiderando o fato de que a maioria das leveduras isoladas cresceram quase que igualmente sob ambas as condições de cultura, observamos que algumas leveduras apresentaram uma diminuição considerável na atividade antimicrobiana, principalmente o composto **HVNJ-138 (II)**, que ficou totalmente isento de atividade. Esses achados corroboram com os encontrados por Miao *et al.*, (2006), onde estes assinalaram que o substrato de extrato de levedura promoveu o crescimento micelial e reduziu a atividade antibacteriana do derivado-marinho do fungo *Arthrinium cfsaccharicola*.

É importante destacar que diversos trabalhos atentam para o fato de que a produção de metabólitos secundários pode ser afetada por vários componentes do meio, incluindo o nitrogênio, e que elevadas concentrações deste podem inibir vias importantes para a produção

de metabólitos (Kobayashi *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 2006; López & Monteón, 2013). Além disso, o extrato de levedura contém uma concentração de nitrogênio maior do que a peptona de soja, desta forma é possível sustentar a suposição acima (López & Monteón, 2013).

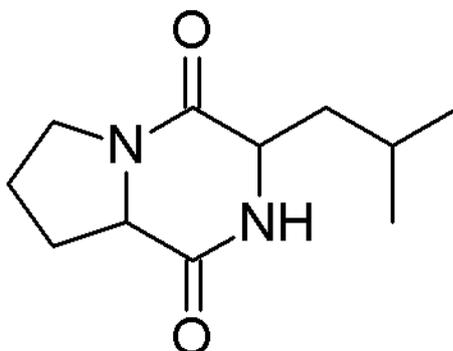
As drogas oriundas de produtos naturais regularmente apresentam uma solubilidade limitada em solventes aquosos e/ou exibem uma citotoxicidade considerável, resultando em índices terapêuticos estreitos (Cragg *et al.*, 2014). Assim sendo, a investigação da toxicidade em células eucarióticas nucleadas é um bom modelo para se averiguar a citotoxicidade de tais compostos (Da Silva *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2011; Cavalcanti *et al.*, 2009).

Nos ensaios citotóxicos, utilizando o ensaio do MTT com células de leucócitos humanos, os metabólitos secundários obtidos apresentaram uma baixa citotoxicidade. Nossos dados corroboram com os achados de Nadumane *et al.*, (2013) , que ao analisarem os metabólitos secundários obtidos a partir do fungo *Aspergillus ochraceus*, observaram que este apresentou pouca ou nenhuma toxicidade contra linfócitos normais, nas mesmas concentrações bioativas. Estes dados realçam nossos resultados, pois segundo Bertrand *et al.*, (2014) os extratos de produtos naturais são misturas bastante complexas, o que complica ainda mais a avaliação da bioatividade, pois podem existir substâncias tóxicas em excesso, fato este que não foi observado em nossos achados, podendo gerar uma vantagem para realização de ensaios farmacológicos posteriores.

A triagem “**chemical-guided**” foca-se em um grupo específico de moléculas bioativas, a fim de reconhecer, e eventualmente se desfazer, de conhecidas classes de antibióticos ou propriedades biológicas indesejáveis. A avaliação consiste na combinação dos dados físico-químicos (massa molecular/espectro de UV) com as propriedades biológicas (espectro antimicrobiano/ taxonomia da estirpe produtora) dos extratos isolados (Brunati *et al.*, 2009). Este processo é fundamental para auxiliar no processo de descoberta de novos medicamentos (Chapman and Hall, 2003, Brunati *et al.*, 2009).

Ao longo desta abordagem, foram identificados dois compostos conhecidos nos extratos mais ativos o Hexahidro-3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona e o Ácido dodecanóico (Tabela 7). Diversos estudos relatam o potencial antimicrobiano da classe química dos alcaloides pirrolo pirazina contra bactérias humanas patogênicas (Melo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Este metabolito fúngico é constituído por um anel heterocíclico lipofílico (pirrolo pirazina) com uma cadeia lateral hidrofílica (guanidium) (Figura 12) e sua produção já foi relatada em diversas espécies, tais como *Aspergillus* spp e *Candida* spp (Zhang *et al.*, 2012).

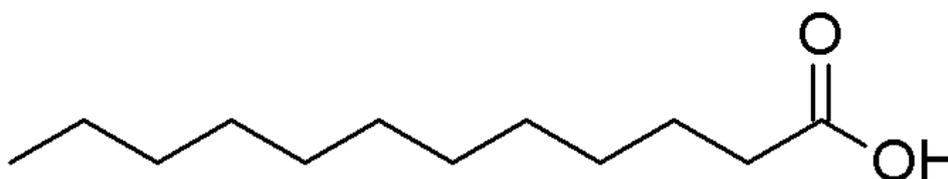
Figura 13. Representação estrutural da Hexahidro-3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona.



Fonte: LABEL, 2015

As atividades antimicrobianas condizentes aos ácidos graxos saturados, mas especificamente o Ácido dodecanóico (Figura 13 - ver página 66), são bastante relatadas na literatura (Kitahara *et al.*, 2003; Kitahara *et al.*, 2005). O Ácido dodecanóico é um surfactante com atividade contra espécies de *S. aureus* (Abad, et al, 2013), onde, segundo os resultados *in vitro* de Rouse *et al.*, (2005), formulações a base de Ácido dodecanóico apresentaram uma elevada atividade frente a cepas de SARM e MSSA. Contudo, além das moléculas acima citadas, no presente trabalho também foram reveladas outras moléculas nos extratos ativos que necessitam de mais esforços de perfis analíticos e biológicos.

Figura 14. Representação estrutural do Ácido dodecanóico



Fonte: LABEL, 2015

O desenvolvimento de novas drogas para infecções bacterianas tem uma importância global e precisa ser apoiada e intensificada, tendo em vista que as práticas realizadas no passado já demonstraram que a administração de antibióticos podem prolongar a vida e garantir lucros para as indústrias (Cole, S. 2014). Dentro deste contexto, a atividade

antimicrobiana e o baixo potencial citotóxico demonstrado por esses extratos revelam uma classe de compostos químicos promissores para desenvolvimento de novos antibióticos. No entanto, mais estudos farmacológicos serão feitos para confirmar esta hipótese.

8. CONCLUSÃO

Os resultados apontam para o potencial biológico de metabólitos, oriundos de espécies de leveduras isoladas no Ceará. Demonstram que estas leveduras podem produzir metabólitos com potencial atividade anti-SARM, onde estes extratos promovem fragmentação do DNA bacteriano, levando à morte celular por apoptose.

Dessa forma, propomos que as leveduras isoladas podem ser utilizadas como fonte biotecnológica alternativa interessante para a produção de biomoléculas, além de destacar a necessidade de pesquisas na região nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

ABAD, C.L.; PULIA, M.S.; SAFDAR, N. Does the Nose Know? An Update on SARM Decolonization Strategies. **Current Infectious Disease Reports**, v. 15, n. 6, p. 455-464, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

AJESH, K.; SREEJITH, K. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. **Peptides**, v. 30, n. 5, p. 999-1006, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

ALHO, J.R.C. Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. **Estudos Avançados**, v.26, n.74, p. 151-166, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n.1, p. 3-19, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BAIDEN, F. *et al.* The need for new antibiotics. **Lancet**, v. 375, n.9715, p.637-638, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BAMBEKE, F.V. *et al.* The bacterial envelope as a target for novel anti-SARM antibiotics. **Trends Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 124-134, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BASSETTI, M.; RIGHI, E. Development of novel antibacterial drugs to combat multiple resistant organisms. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 400, n. 2, p. 153-165, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BERNEY, M. *et al.* Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3283-3290, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BERTRAND, S. *et al.* Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery, **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BOUCHER, H.W. *et al.* 10 x '20 Progress--Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infection Disease**, v. 56, n. 12, p. 1685-1694, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BOUCHER, H.W. *et al.* Bad Bugs. No Drugs: no ESKAPE! an update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. v. 48, n.1, p.1-12, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BOWLER, P.G. *et al.* Multidrug-resistant organisms, wounds and topical antimicrobial protection. **International Wound Journal**, v. 9, n.4, p. 387–396, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BRUNATI, M. *et al.* Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. **Marine Genomics**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 2141–2153, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CARVALHO, C.R. *et al.* The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, n. 2, p. 95-107, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CARVALHO, K.S.; MAMIZUKA, E.M.; GONTIJO FILHO, P.P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. **The Brazilian Journal Infection Disease**, v. 14, n. 1, p. 71-76, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CAVALCANTI, B.C. *et al.* Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal Applied of Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560-568, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

Ceará. Anuário Estatístico, 2011.
<http://www2.ipece.ce.gov.br/publicacoes/anuario/anuario2011/index.htm>. Acessado em 11/03/2013.

CHAN, P. *et al.* Compatibility of ceftobiprole medocaril with selected drugs during simulated Y-site administration. **American Journal of Health-System Pharmacist**, v. 65, n. 16, p. 1545-1551, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CHAPMAN, HALL, 2003. Dictionary of Natural Product on CD-ROM, Version 12:1. **Chapman& Hall/CRC Press UK**, London, UK. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CHEN, A.Y.; ZERVOS, M.J.; VAZQUEZ, J.A. Dalbavancin: a novel antimicrobial. **International Journal Clinical Practice**, v. 61, n.5, p. 853-863, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CHIVIAN, E.; BERNSTEIN, A. (Ed.) How human health depends on biodiversity. New York: Oxford University Press, 2008.

CLARK, C. *et al.* Resistance Selection Studies Comparing the Activity of Razupenem (PTZ601) to Vancomycin and Linezolid against Eight Methicillin-Resistant and Two Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 3118-3121, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, vol. 32 of **Approved standard M07-A9**, CLSI, Wayne, Pa, USA, 9th edition, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, vol. 32 of **Approved standard M02-A11**, CLSI, Wayne, Pa, USA, 11th edition, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; vol. 33 of **Approved standard M100-S23**, CLSI, Wayne, Pa, USA, 23th edition, 2013.

COLE ST. Who will develop new antibacterial agents? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. Series B, Biological sciences. 369: 20130430. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0430>, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

COOPER, M. A.; SHALES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**. v. 472, n. 7341, p. 32, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CORNAGLIA G. Fighting infections due to multidrug-resistant Gram positive pathogens. **Clinical Microbiology Infection**, v. 15, n.3, p. 209-211, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

COSTA-LOTUFO, L.V. *et al.* Organismos marinhos como fonte de novos fármacos - histórico & perspectivas. **Química Nova**, v.32, n. 3, p.703-716, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal Nature Product**, v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p.3670-3695, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CRAWFORD, J.M.; CLARDY, J. Bacterial symbionts and natural products. **Chemical Communications** 2011; v. 47, n. 27, p. 7559-7566. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

DA SILVA, R. *et al.* Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1468-1478, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

DE QUEIROZ, G.M. *et al.* Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.10, n.2, p. 132-138, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

DE SIQUEIRA, V.M. *et al.* Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v.53, n. 2, p. 89-95, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

DEMAIN, A.L. Antibiotics: natural products essential to human health. **Medicinal Research Review**, v. 29, n. 6, p. 821-842, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

DING, G. *et al.* Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Journal Natural Products**, v. 71, n.4, p. 615-618, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

DWYER, D.J. *et al.* Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 561-572, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. 2010. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/nichtmL/fgbanco01.asp>. Acesso em: 06/06/2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

ERNST e YOUNG. **Beyond Borders: Global Biotechnology Report**. 2011. Disponível em: <http://www.ey.com/Publication>. Acesso em: 04 mar.2013.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL/EUROPEAN MEDICINES AGENCY (ECDC/EMA). Technical report. The bacterial challenge: time to react. Stockholm, Sweden: **ECDC/EMA**; 2009. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909 TER The Bacterial Challenge Time to React. pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf) [accessed 21.07.11].

EWING, B., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

GOMES, D.V. A proteção da biodiversidade e dos conhecimentos tradicionais associados no Brasil: aspectos éticos e jurídicos. **Revista do Curso de Direito da FSG**, v. 2, n.4, p.69-80, 2008. Disponível em: <http://ojs.fsg.br/>. Acesso em: 02 abr.2015.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 mar.2015.

GORWITZ, R.J. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **Journal Infection Disease**, v. 197, n. 9, p. 1226–1234, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

GUTIERREZ, R.M.P., GONZALEZ, A.M.N.; RAMIREZ, A.M. Compounds Derived from Endophytes: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 2992-3030, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

HOFFMANN, K. *et al.* Prevalence and resistance patterns of commensal *S. aureus* in community-dwelling GP patients and socio-demographic associations. A cross-sectional study in the framework of the APRES-project in Austria. **BMC Infection Disease**, v. 16, n. 1, p. 213, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 mar.2015.

HOUSMAN, S.T. *et al.* Physical compatibility of telavancin hydrochloride with select i.v. drugs during simulated Y-site administration. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 68, n. 23, p. 2265-2270, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 mar.2015.

HUANG, X., MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

IDSA: Infection Disease Of Society American: Identification And Characterization Of Porins In Pseudomonas aeruginosa. Report: Bad Bugs, No Drugs: As Antibiotic Discovery Stagnates, a Public Health Crisis Brews; July 2004 Disponível em: <http://www.idsociety.org/10x20.htm>. Acesso em: 29 jun.2013.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. <http://www.icmbio.gov.br/menu/instituicao>. Acessado em: 29 agos. 2010.

JL, Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) protocols. Preface. **Methods in Molecular Biology**, v. 391, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

JOSEPH, B; PRIYA, R.M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect: A Review. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**; v. 1, n. 3, p. 291-309, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 mar.2015.

KANNAN, R.R.; INIYAN, A.M.; PRAKASH, V.S. Isolation of a small molecule with anti-SARM activity from a mangrove symbiont *Streptomyces* sp. PVRK-1 and its biomedical studies in Zebrafish embryos. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedical**, v. 1, n. 5, p. 341-347, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 mar.2015.

KELECON, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 151-170, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

KELLER, A. *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. **Gene**, v. 430, p.50–57, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KIRK P.M.; CANNON P.F.; DAVID J.C.; STALPERS J.A. (eds.) 2008. Dictionary of the Fungi, 11th ed. **Wallingford: CABI Publishing**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KITAHARA, T. *et al.* Antimicrobial Activity of Saturated Fatty Acids and Fatty Amines against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 9, p. 1321-1326, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KLEVENS, R.M. *et al.* Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA**, v. 298, n. 15 ,p. 1763–1771, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KOBAYASHI, T. *et al.* *Pseudoalteromonas sagamiensis*.nov., a marine bacterium that produces protease inhibitors. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1807–1811, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KÖCK, R. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (SARM): Burden Of Disease And Control Challenges In Europe. **Euro surveillance**. v. 15, n. 41, p. 1-9, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KOGA, T. *et al.* Potent *In Vitro* Activity of Tomopenem (CS-023) against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2849-2854, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KOGEL, K-H; FRANKEN, P., HUECKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4; p. 358-363, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 fev.2013.

KUMAR, A.; MANN,, H.J. Visual compatibility of oritavancin diphosphate with selected coadministered drugs during simulated Y-site administration. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 67, n. 1640-1644, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

KURTBOEKE, D.I. Exploitation of phage battery in the search for bioactive actinomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 931-937, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLERT, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

LARSEN, T.O. *et al.* Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Products Report**, v. 22, n. 6, p. 672-695, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

LAZZARINI, A. *et al.* Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 3-4, p. 399-405, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015

LI, F. *et al.* *In vitro* susceptibility and cellular uptake for a new class of antimicrobial agents: dinuclear ruthenium(II) complexes. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2686-2695, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

LINDEQUIST, U. Higher fungi in traditional and modern medicine. **Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten**, v. 33, n. 2, p. 40-48, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015

LOPES, H.V. CA-SARM: um novo problema para o infectologista. *Revista Panamericana de Infectologia*. v. 7, n. 3, p. 34-36, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

LÓPEZ, R.; MONTEÓN, V. Influence of different organic nitrogen sources on antimicrobial activity of *Pseudoalteromonas* sp. **JPR: BioMedRx: An International Journal**, v.1, n. 10, p. 952-956, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MADIGAN, T. M. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12^a edição, São Paulo: ARTMED® EDITORA S.A. 2010. 1160p. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MAGIOKAROS, A.P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology Infection**, v.18, n. 3, p. 268-281, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MAIA, L.C.; CARVALHO JUNIOR, A.A. Introdução: os fungos do Brasil. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 43-48. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0.

MARQUES, R.A. “Estudo Químico e Avaliação Quimiopreventiva de *Humirianthera ampla*, *Simarouba versicolor* e Cinco Espécies do Gênero *Lippia*” 2011, Tese (Doutorado em Química), **Curso de Pós-Graduação em Química**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2011.

MAUTONE, J.N. Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do parque de Itapuã, RS, Brasil. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado) – **Instituto de Ciências Básicas da Saúde**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MEDEIROS, J.D. *et al.* Characterization of the microbial community in a lotic environment to assess the effect of pollution on nitrifying and potentially pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n. 3, p. 612-622, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MEHRAVAR, M.; SARDARI, S. Screening of antimicrobial membrane-active metabolites of soil microfungi by using chromatic phospholipid/polydiacetylene vesicles. **Journal of Mycologie Médicale**, v. 21, n. 3, p. 188-197, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MELO, I.S. *et al.* Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v.18, n. 1, p. 15-23, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MIAO L, KWONG T.N, QIAN PY. Effect of culture conditions on mycelia growth, antibacterial activity and metabolite profiles of the marine derived fungus *Arthrinium c.f.saccharicola*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 72, n. 5, p. 1063-1073. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MOHSENI, M. *et al.* Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the caspian sea. **International Journal Molecular and Cellular Medicine**, v. 2, n. 2, p. 64-71, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MOLINSKY, T.F. *et al.* Drug development from marine natural products. **Nature Review Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p.69-85, p., 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

Moraes Filho, M.O. A biodiversidade brasileira como fonte de medicamentos inovadores. Parcerias Estratégicas. Edição Especial, v. 15, n. 31 p. 171-192, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MOREIRA, M.R. *et al.* Risk factors and evolution of Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus* sensitive or resistant to Oxacillin in patients at Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital, **Brazilian Journal Infection Disease**; v. 12, n. 6, p. 499-503, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MORRIS-JONES, R. *et al.* Synthesis of melanin pigment by *Candida albicans in vitro* and during infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 6147-6150, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

MOTAMEDI, H. *et al.* Antibacterial effect of ethanolic and meyhannolic extract of *Plantago ovata* and *Oliveria decumbens* endemic in Iran against some pathogenic bacteria. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. , 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

NADUMANE, V.K. *et al.* A novel metabolite from aspergillus ochraceus JGI 25 showing cytotoxicity to hela cells. **Indian Journal Pharmaceutical Science**, v. 75, n. 5, p. 507-514, 2013. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

NEBE-VON-CARON, G. *et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal Microbiological Methods**, v.42, n.1, p.97-114, 2000. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

Andrade Neto, J.B. *et al.* Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS One**. 2014 May 9;9(5):e93698. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiology**, n. 5, v.4, p. 203-223, 2003. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

OTTO, M. *Staphylococcal* biofilms. **Current Topics in Microbiology Immunology**, v. 322, p. 207–228, 2008. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 mai.2015.

PERIASAMY, S. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1281-1286, 2012. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

PITTET, D. Infection control and quality health care in the new millennium. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 5, p. 258-267, 2005. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

POON, H.; CHANG, M.H.; FUNG, H.B. Ceftaroline fosamil: a cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n.4, p. 743–765, 2012. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 mai.2015.

QIN S. *et al.* Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 457-473, 2011.

QIN, J.C. *et al.* Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1572- 1574, 2009. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 05 mai.2015.

QUALLS, M.L. *et al.* Emergency Department Visit Rates for Abscess Versus Other Skin Infections During the Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* , 1997-2007. **Clinical Infectious Diseases**. v. 55, n. 1, p. 103-105, 2012. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 05 mai.2015.

RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, M. Emergence of *Candida spp.* and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – status quo. **Mycoses**, v.55, n.3, p.60-73, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

RAW, I. Biotecnologia e saúde pública. **Revista USP**, n.75, p. 6-17, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

REYNOLDS, P.E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 8, n. 11, p. 943–950, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

RIBEIRO, A. *et al.* Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v. 59, n. 3, p. 339-345, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C. The Changing Pattern Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clones In Latin America: Implications For Clinical Practice In The Region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 2, p. 87-96, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

ROUSE, M.S. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluations of the activities of lauric acid monoester formulations against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3187-3191, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SAIKKONEN, K.; GUNDEL, P.E.; HELANDER, M. Chemical Ecology Mediated by Fungal Endophytes in Grasses. **Journal of Chemical Ecology** 2013; 39: 962-968 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, N.Y. 1989 (manual).

SANTA MARIA, M. *et al.* Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 13, n. 6, p. 682–695, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SANTOS CASTRO F. F. Identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de um novo peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha* contra bactérias multirresistentes.2013. 80f. Tese (**Mestre em Ciências da Saúde**) - Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SANTOS, S.N. *et al.* Endophytic fungi from *Combretum leprosum* with potential anticancer and antifungal activity. **Symbiosis**, v. 58, n. 1-3, p. 109-117, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SARAVOLATZ, L.D.; STEIN, G.E.; JOHNSON, L.B. Ceftaroline: A Novel Cephalosporin with Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infection Disease**, v. 52, n. 9, p. 1156-1163, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SCHULZ, B; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 set.2014.

SHEN, X.Y. *et al.* Diversity and Antimicrobial Activity of Culturable Endophytic Fungi Isolated from Moso Bamboo Seeds. **PLoS ONE** 9(4): e95838, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 out.2014.

SHI, L. *et al.* Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. **Cytometry Part A**, v. 71, n. 8, p. 592-598, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2 ed., 2004.

SILVA, F. *ET AL.* Coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal Medical Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1479-1486, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SINGH, B.K.; MACDONALD, C.A. Drug discovery from uncultivable microorganisms. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17-18, p.792-799, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

SMITH, T.C. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. **PLoS One**, v.4, n. 1: e4258, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p.491-502, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. MICROBIOLOGIA. 10^a edição. Porto Alegre: ARTMED® EDITORA S.A. 2012. 967p.

VONBERG, R.P. *et al.* How Often Do Asymptomatic Healthcare Workers Cause Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreaks? A Systematic Evaluation. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 27, n. 10, p. 1123-1127, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

WAGNER-DÖBLER, I. *et al.* Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.74, n. , p. 207-238, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

WALSH, T.R. *et al.* Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Review**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

WARNER, S.A.J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction. In: Foster, G.D.; Twell, D. (Eds). *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. West Sussex: John Wiley & Sons, v.1, p.51-73, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 nov.2013.

WEBER, C. J. Update on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (SARM). **Urologic nursing**, v. 28, n. 2, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

WHITE, T. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M. A., Gefland D. H., Sninsky J. J., White T. J. (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. **Academic Press**, San Diego, CA, p. 315–322,1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 nov.2013.

WILKE, D.V. *et al.* Cytotoxic lipiidic alpha-amino acids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the northeastern coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p.1455-1459, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 nov.2013.

WILLIAMS, S.C. *et al.* Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, , p. 225–236, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

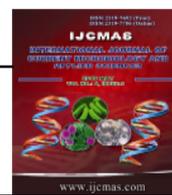
XIONG, H. *et al.* Antibiotic and antifouling compound production by the marine-derived fungus *Cladosporium sp.* F14. **Journal of Hydro-environment Research**, v.2, n., p. 264-270, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

ZHANG, X.; LI C, NAN Z. Effects of cadmium stress on seed germination and seedling growth of *Elymus dahuricus* infected with the *Neotyphodium* endophyte. **Science China Life Sciences**, v. 55, n. 9, p. 793-799, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 jun.2014.

ANEXO A – PULICAÇÃO ORIGINADA A PARTIR DO TRABALHO

Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2015) 4(5): 459-472*International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*

ISSN: 2319-7706 Volume 4 Number 5 (2015) pp. 459-472

<http://www.ijemas.com>**Original Research Article**

Screening of Antimicrobial Metabolite Yeast Isolates Derived Biome Ceará against Pathogenic Bacteria, Including MRSA: Antibacterial Activity and mode of Action Evaluated by Flow Cytometry

João B. A. Neto¹, Cecília R. da Silva¹, Francisca B. S. A. Nascimento¹, Leticia Serpa Sampaio¹, Anderson R. da Silva¹, Daniel D. de Freitas¹, Rosana S. Campos¹, Larissa N.D. de Andrade¹, Thially Braga Gonçalves², Aparecida Tiemi Nagao-Dias², Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho², Jacó Ricarte Lima de Mesquita³, Hemerson I. F. Magalhães⁴, Manoel O. de Moraes⁵, Thalles B. Grangeiro⁶, Gilvandete Maria Pinheiro Santiago⁷, Horlando Carlota da Silva⁸, Leôncio Mesquita de Sousa⁸, Akenaton O. C. V. Gomes⁹, Bruno C. Cavalcanti^{5*} and Hélio V. N. Júnior^{1*}

¹Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection and Experiments in Yeast (LABEL), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

²Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

³St. Joseph Hospital for Infectious Diseases, Fortaleza, CE, Brazil

⁴School of Pharmacy, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁵Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

⁶Department of Biology, Science Center, Molecular Genetics Laboratory, Federal University of Ceará, CE, Brazil

⁷Department of Chemistry, Laboratory of Organic Synthesis, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

⁸Department of Chemistry, Laboratory of Biotechnology and Organic Synthesis, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

*Corresponding author

A B S T R A C T**Keywords**

Staphylococcus aureus,
MRSA,
Antibacterial activity,
Ceará

Antimicrobials benefited the history of medicine by revolutionizing the treatment of infectious diseases. However, its consequent and continuous use has led to the emergence of microorganisms which once were considered safe, but have become feared as potentially lethal pathogens (Bowler et al., 2012). *Staphylococcus aureus* infections are highlighted for being a major cause of systemic infections, and for being the microorganism that has the highest morbidity and mortality rates in hospital infections (Smith et al., 2009). In addition, these strains have a remarkable ability to acquire antimicrobial resistance, with methicillin (MRSA) resistance being an increasing public health issue (Rodríguez-Noriega and Seas, 2010). In Brazil, in a study by Santos et al. (2010) in a tertiary hospital, a high incidence of MRSA colonization was reported, in which the acquisition rate was of 5.5/1.000 patient-days for adults. In another study performed in northeastern Brazil with hospitalized patients, Almeida et al. (2014) reported that among the colonized wounds by *S. aureus*, 32% were MRSA. Within this context, the emergence of strains with reduced sensitivity accompanied by a limited antimicrobial therapy causes the need of a search for new therapeutic options (Boucher et al., 2009). Antibacterial agents are the most important natural products, in which prokaryotes organisms and some fungi deserve special mention for playing an important role in the production of secondary metabolites with potential therapeutic applications (Singh and Macdonald, 2010). Throughout the world, approximately 99.000 fungi species were described (Kirk et al. 2008), of which approximately 3.7% of the world's diversity exist in Brazil, and the Brazilian Northeastern region has the largest number of records related to fungal diversity (Maia and Carvalho Junior 2010). In this study, isolate yeasts from the northeastern region of Brazil, more specifically from the state of Ceará, were analyzed. This area ecosystem is diverse and little investigated regarding the isolation of yeasts that produce metabolites with antimicrobial activity. Thus, this research aims to contribute to increase knowledge about the activity of extracts derived from isolated yeasts from Ceará with antimicrobial potential, as well as to contribute with a possible description of their mechanisms of action.