

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA – SÃO PAULO**

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI – *Mycobacterium tuberculosis* DE
METABÓLITOS BIOATIVOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EMPREGANDO A
TÉCNICA DO MABA**

**KARINA ANDRADE DE PRINCE
BIOMÉDICA**

**ARARAQUARA
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA – SÃO PAULO**

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI – *Mycobacterium tuberculosis* DE
METABÓLITOS BIOATIVOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EMPREGANDO A
TÉCNICA DO MABA**

Mestrando: Karina Andrade de Prince

Orientadora: Prof^a Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite

**Dissertação apresentada ao
programa De Pós-Graduação
em Análises Clínicas Da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, UNESP, como
parte dos requisitos para
Obtenção do Título de Mestre
em Análises Clínicas.**

**ARARAQUARA
2008**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Prince, Karina Andrade de
P955d Determinação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de
metabólicos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do
MABA. / Karina Andrade de Prince. – Araraquara, 2008.
71 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Clarice Queico Fujimura Leite

. 1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. MABA. 3. Metabólicos bioativos.
4. Citotoxicidade. 4. Microbiologia. I. Leite, Clarice Queico Fujimura, orient..
II. Título.

CDD: 576

DEDICO

*À DEUS. Senhor , tu foste nosso abrigo, de geração em geração. Antes que nascessem os montes e fossem engendrados a terra e o mundo, desde sempre e para sempre tu és Deus. Ensina-nos a dispor de nossos dias, de modo a adquirirmos um coração sensato! Tem compaixão de teus servos! Sacie-nos, desde a manhã, tua misericórdia e exultaremos de alegria, todos os dias. Dá-nos alegria pelos dias em que nos humilhastes. Que tua obra se manifeste a teus servos, e a teus filhos o teu esplendor! Desça sobre nós a bondade do senhor nosso Deus! Consolida para nós a obra de nossas mãos. **SALMO 90.***

Aos meus pais José Augusto de Prince e Izilda Aparecida de Andrade de Prince. A vida dedico a minha mãe que me ensinou a vivê-la com dignidade. O futuro a meu pai que se deu inteiro e renunciou a seus sonhos para, realizar os meus. Sou o que sou às custas de seus sacrifícios. Sejam, pois estas palavras a expressão de minha gratidão e infinito amor.

Ao meu querido filho Mateus Augusto de Prince. Pela compreensão a minha imensa ausência. Meu filho te amo muito.

Aos meus irmãos Peterson Donizete Andrade de Prince, Priscila Maria Andrade de Prince e Gustavo José de Prince pelo incentivo aos meus objetivos.

Ao meu pequenino sobrinho Lucas Prince Oliani. Obrigada por Alegregar a minha vida!

Ao meu namorado Gustavo Augusto de Carvalho. Pela compreensão durante a intensa dedicação que este trabalho exigiu, pela preocupação e incentivos constantes que me fortaleceram nos momentos críticos.

Aos eternos amigos do laboratório Prof. Dr. Hugo David: Ana Carolina, Fernando, Célio, José Rodrigo, Cleso e em especial ao meu querido amigo Adolfo pela imensa contribuição na finalização deste trabalho. Muito Obrigada a todos!

Aos Mestres. A nossa convivência vem de longa data e dela aprendemos que ser mestre e amigo vão muito além do significado dessas palavras. Para isso é preciso tranquilidade e vontade de compartilhar os conhecimentos e permitir o crescimento do outro; é ser amigo nas horas e momentos em que pensamos estar sozinhos. O meu agradecimento e profunda admiração.

Um Guerreiro da luz, compartilha com os outros o, que sabe do caminho. Quem ajuda, sempre é ajudado e precisa ensinar o que aprendeu. Paulo Coelho.

Que a ciência possa gerar cada vez mais dúvidas e incertezas, para que, a cada trabalho, tenhamos novas perguntas e que a cada pergunta possamos ter novas respostas. E que assim a ciência possa prosperar entre perguntas e respostas.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora professora Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite, pelas contribuições na estruturação deste trabalho, pelas orientações na condução da pesquisa e sugestões na revisão do texto. Muito Obrigada!

A Dr^a Ângela Regina de Araújo pelo intenso apoio e colaboração na realização deste trabalho. Obrigada por ter acreditado no meu potencial.

A Ms. Renata Sordi, a Dr^a Mariana Carrara Cafêu e ao Dr. Ioanis Hcristos Leptokarydis meu imenso agradecimento pelo fornecimento dos extratos utilizados na realização deste trabalho.

A Dra Daisy Nakamura Sato pela padronização das técnicas realizadas, ensinamentos e relevantes sugestões, que enriqueceram o conteúdo do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

RESUMO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVO.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4. RESULTADOS.....	31
5- DISCUSSÃO.....	37
6- CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação dos Extratos Brutos Obtidos de Fungos Endofíticos Isolados de Folhas da Espécie Vegetal <i>Styrax camporum</i>	19
Tabela 2 -	Extratos Brutos Produzidos Pelo Fungo Endofítico SC-04 (<i>Phomopsis stipata</i> 2) Cultivado em Meios com Cereais e Meios Comerciais.....	20
Tabela 3 -	Relação dos Extratos Brutos Obtidos de Fungos Endofíticos Isolados de Folhas da Espécie Vegetal <i>Casearia sylvestris</i>	21
Tabela 4 -	Relação dos Extratos Brutos Obtidos de Fungos Endofíticos Isolados de Folhas e Raízes da Espécie Vegetal <i>Michelia champaca</i>	23
Tabela 5 -	Resultados de CIM dos Extratos Brutos de Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal <i>Styrax camporum</i>	32
Tabela 6 -	Resultados de CIM dos Extratos Brutos de Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal <i>Casearia sylvestris</i>	33
Tabela 7 -	Resultados de CIM dos Extratos Brutos e Substância Pura de Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal <i>Michelia champaca</i>	34
Tabela 8 -	Resultados de CIM, IC ₅₀ e IS dos Extratos Brutos e Ácido Pirenochético A Promissores.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação Esquemática da Técnica do MABA.....	26
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima 90%
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC	Índice de Citotoxicidade
IC50	Índice de Citotoxicidade 50%
IC90	Índice de Citotoxicidade 90%
INH	Isoniazida
IS	Índice de Seletividade
LJ	Lowenstein Jensen
MABA	Microplate Alamar Blue Assay
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
OADC	Oleic Acid, Albumin, Dextrose and Catalase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TB	Tuberculose
MTBMDR	<i>M. tuberculosis</i> Multi-Droga Resistente
TBMDR	Tuberculose Multi-Droga Resistente
ATCC	American Type Culture Collection

AcOEt	Acetato de Etila
MBD	Base para Cultivo de Leveduras e Fungos
ME	Extrato de Malte
CZ	Czapek – Dox Broth
YM	YM Broth
NU	Nutrient Broth

RESUMO

PRINCE, K. A. **Determinação Da Atividade Anti – *Mycobacterium tuberculosis* de Metabólitos Bioativos de Fungos Endofíticos Empregando a Técnica do MABA.** Araraquara. 2008. (Mestrado em Análises Clínicas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

O problema da tuberculose no Brasil, reflete o desenvolvimento social do país, onde novas causas concorrem para o agravamento, como a epidemia de AIDS e também a multiresistência às drogas. Portanto, torna-se necessária a busca de novas alternativas terapêuticas, como a utilização de novos princípios ativos sintéticos e/ou extraídos de plantas. Em muitas partes do Brasil, existe uma rica tradição no uso de plantas medicinais para a cura de várias doenças infecciosas. Este trabalho teve como objetivo a pesquisa de metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos de plantas do cerrado, com atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Este trabalho faz parte do projeto temático “Conservação, Sustentabilidade e Uso de Plantas do Cerrado e da Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Drogas em Potencial” dentro da linha de pesquisa “Bioprospecção em Fungos Endofíticos de Espécies Vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica”. Neste estudo, a partir de 3 plantas do Cerrado, foram isolados 11 fungos endofíticos e destes obtidos 16 extratos brutos e 1 substância pura. A atividade anti- *M. tuberculosis*, foi determinada empregando o MABA, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) de composto necessária para inibir a multiplicação de 90% das células micobacterinas. Dos 17 extratos brutos testados 3 apresentaram CIM > 250 µg/mL (17,6%), em 7 o valor de CIM foi de 250 µg/mL (41,2%), em 3 de 125 µg/mL (17,6%), em 2 de 62,5 µg/mL (11,8 %) e em outros 2 de 31,25 µg/mL (11,8%). A substância purificada, identificada como ácido pirenochaético, apresentou excelente atividade antimicobacteriana, com valor de CIM de 3,9 µg/mL. O estudo revelou atividade anti- *M. tuberculosis* promissora em 7 extratos brutos testados (41,2%), e na substância pura. O ácido pirenochaético e os extratos que apresentaram atividade promissora foram avaliados quanto a citotoxicidade, apresentando resultados de baixa citotoxicidade (entre 500 e 62,5 µg/mL).

Palavras Chaves: *M. tuberculosis*, MABA, Metabólitos Bioativos, Fungos Endofíticos e Citotoxicidade.

ABSTRACT

PRINCE, K. A. **Determination of Activity Anti – *Mycobacterium tuberculosis* of Bioactive Metabolites of Endophytic Fungi Using MABA Technique.** 2008. (Master in Clinical Analysis) State University "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP.

The tuberculosis in Brazil shows the social development problem in the country, as there are several new causes increasing the numbers, like HIV epidemic and the drugs multi-resistance. Therefore it's necessary the research of alternative therapies as the use of new synthetic compounds and plant extracts. In most parts of Brazil, there is the tradition in the use of medical plants to the cure of various infectious diseases. The objective of this work was to research of bioactive secondary metabolites from endophytic fungi of "Cerrado" plants active against *Mycobacterium tuberculosis*. This work is part of the thematic project "Conservation, Sustainability and the Use of "Cerrado" Plants and from Atlantic Forest: Chemistry Diversity and Drugs Potential Prospecting" inside the research line "Bioprospection in Endophytic Fungi from Vegetable Species of "Cerrado" and Atlantic Forest". From 3 plants of "Cerrado", was isolated 11 endophytic fungi and from this, was obtained 16 crude extracts and 1 pure substance. The activity against *M. tuberculosis* was determined using the MABA, finding the minimal inhibitory concentration (MIC) of the drug necessary to inhibit the multiplication of 90% of bacillary growth. From 17 crude extracts tested, 3 showed MIC >250 µg/mL (17.6%), in 7, the MIC value was of 250 µg/mL (41.2%), in 3 of 125 µg/mL (17.6%), in 2 of 62.5µg/mL (11.8%) and in the last 2 was of 31.25 µg/mL (11.8%). The purified fraction, identified as pirenochaetic acid presented excellent activity against *M. tuberculosis* with MIC value of 3.9µg/mL. The study showed promising activity against *M. tuberculosis* in 7 crude extracts tested (41.2%) and at the pure substance. The pirenochaetic acid and crude extracts that presented promising activity was also evaluated by cytotoxicity activity showing low cytotoxicity (between 500-62.5µg/mL).

Key-words: *M. tuberculosis*, MABA, Bioactives Metabolites, Endophytic Fungi and Cytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

O agente etiológico da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* pertence ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família *Mycobacteriaceae*. Tem a forma de bacilo reto e fino, mede cerca de 1 a 5 µm de comprimento por 0,45 µm de largura, é aeróbio obrigatório e apresenta crescimento muito lento com tempo de geração de 18 horas. Possui a propriedade de resistir à descoloração quando tratado com solução de ácido clorídrico, devido a grande quantidade de lipídios presentes em sua parede celular que representa cerca de 60% do peso seco da parede celular. Os ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa de C78-C90), ceras e fosfatídios são os principais representantes dos lipídios. O bacilo da tuberculose devido à natureza hidrofóbica da superfície celular e ao crescimento em agregados mostra-se altamente resistente à desidratação e aos agentes químicos como álcalis, ácidos, antibióticos e quimioterápicos (KONEMAN et al., 2001; AL-HAJJAJ et al., 2001; BRASIL, 2005; HART et al., 1996).

É estimado que um terço da população mundial está infectada com o bacilo da tuberculose (WHO, 2007). Entretanto somente uma pequena porcentagem dos indivíduos infectados desenvolve a tuberculose doença. A cada ano há aproximadamente 8 milhões de novos casos e 2 milhões de óbitos. *M. tuberculosis* é o maior responsável pela mortalidade humana em relação às outras espécies microbianas (PAULI et al., 2005).

A despeito do intenso programa de tratamento com drogas tuberculicidas e da vacinação em larga escala com o BCG, no Brasil a tuberculose ainda é uma das principais causas de morte entre as doenças por

agentes infecciosos identificáveis. No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 129.000 casos novos por ano, dos quais apenas 90.000 casos novos são notificados oficialmente. O estado de São Paulo, responsável pelo maior número absoluto de casos novos com um coeficiente de incidência de 50/100,000 habitantes e cerca de 1,500 óbitos por ano, notificou 20,125 casos novos no ano de 2001 (BRASIL, 2002; SÃO PAULO, 2002).

Hoje a pandemia da AIDS, o controle insuficiente da tuberculose e o aparecimento de cepas de *M. tuberculosis* multi-droga resistente (MTBMDR), tem exacerbado o problema, produzindo um grande reservatório de indivíduos altamente susceptíveis, tornando assim um obstáculo para o tratamento e controle da tuberculose (CORBETT et al., 2003).

1.1 - TUBERCULOSE MULTI-DROGA RESISTENTE

Apesar da existência de esquemas terapêuticos eficazes, muitos pacientes não se curam, porque interrompem o tratamento ou usam irregularmente os medicamentos. Estes fatores induzem a seleção de cepas de *M. tuberculosis* mutantes resistentes elevando as taxas de resistência tanto primária quanto adquirida e, conseqüentemente causando falência no tratamento (HIGUCHI, 2007).

O surgimento e a transmissão de cepas de MTBMDR é uma importante ameaça para o controle da tuberculose e gera um sério problema de saúde pública (ZUMIA; GRANGE, 2001).

A epidemia de AIDS e o controle insuficiente da tuberculose apontam para a necessidade de medidas enérgicas e eficazes de saúde pública. O surgimento de focos de tuberculose multi-droga resistente (TBMDR), tornou-se um sério problema mundial (DALCOMO et al., 1998; COOPER et al., 1993; FRIEDEN et al., 2003). Pacientes infectados com cepas de *M. tuberculosis* MDR apresentam falha no tratamento com os seguintes medicamentos rifampicina (RMP) e isoniazida (INH) devido ao abandono do tratamento, isto implica em sérias conseqüências, principalmente relacionadas à manutenção de longos períodos de infectividade em comparação com pacientes infectados com cepas susceptíveis (ZUMIA; GRANGE, 2001), sendo que este fato pode ocasionar a mortalidade anual de 2 milhões de pessoas (JANIN, 2007).

É essencial que testes de susceptibilidade a drogas sejam desenvolvidos rapidamente para prevenir o aparecimento da TBMDR (SEKIGUCHI et al., 2007).

1.2 - PESQUISA DE NOVAS DROGAS PARA TUBERCULOSE

Aproximadamente 25% dos produtos naturais biologicamente ativos conhecidos foram obtidos a partir de fungos (KONGSAEREE, et al., 2003). Fleming e Chain, baseados na teoria de fermentação de Pasteur, descobriram a penicilina, um poderoso antibiótico produzido por *Penicillium notatum* (STROBEL et al., 2004). A partir da descoberta da penicilina G, na década de 40, o potencial dos fungos na produção de metabólitos secundários bioativos começou a ser explorado. Na década seguinte, programas de triagem biológica

eram realizadas pelas principais indústrias farmacêuticas, conduzindo ao isolamento de uma série de substâncias (DREYFUSS; CHAPELA, 1994), como as citocalaminas e cefalosporinas, potentes antibióticos, griseofulvina e rifampicina, utilizadas como antifúngicos (DEMAIN, 2000; MASUREKAR, 1992) e contra tuberculose (MITSCHER, 1988), respectivamente.

Um dos mais importantes fatores para o sucesso no descobrimento de um novo fármaco é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser sintéticas, naturais, ou originadas de química combinatória. Dentre estas, os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química (TREVISAN et al., 2003).

Produtos naturais são bioprodutos obtidos a partir de microrganismos, plantas e animais e representam uma valiosa alternativa na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Esses bioprodutos têm sido utilizados pela medicina tradicional há muito tempo. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos destes medicamentos tradicionais, derivados predominantemente de plantas, foram a base para muitos fármacos, tais como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e polícarpina (BUTLER, 2004).

Produtos naturais servem como modelos para desenvolvimento de novas drogas (CRAGG et al., 1997; KINGHORN, 2001; NEWMAN et al., 2000, 2003, 2007), recebendo uma grande atenção como agentes antituberculose em potencial. Atividade antituberculose tem sido encontrada em muitos tipos de estruturas, principalmente de plantas, mas também de outros organismos como fungos e organismos marinhos (PAULI et al., 2005). Atualmente, produtos naturais são responsáveis diretamente ou indiretamente por cerca de 40% dos

fármacos disponíveis no mercado, sendo 70% antibióticos e antitumorais (CALIXTO; YUNES, 2001).

A busca de novas drogas com atividade antitubercular, tanto a partir de plantas, derivados sintéticos de moléculas já conhecidas, metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos, são metas perseguidas por diferentes pesquisadores. Entretanto, é preciso avaliar se a droga em questão é eficaz contra *M. tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose. Diferentes antibióticos eficazes contra bactérias Gram positivas ou negativas são inócuos ao *M. tuberculosis* por este apresentar uma parede diferenciada.

1.3 - FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos são organismos quimiorganotróficos, cujo corpo pode ser unicelular (leveduriforme) ou pluricelular (filamentoso) (SILVA, 2005). São encontrados em diferentes lugares, como água, solo, ar, animais e plantas (HAWKSWORTH, 2001), devido às condições simples de temperatura (~25°C), pH ligeiramente ácido, condições aeróbias ou anaeróbias necessárias para o seu crescimento (ALCANO, 1994). Os fungos são divididos em vários grupos, tais como: coprófilos, microparasitas de água doce, marinhos, termófilos, epifíticos, endofíticos, entre outros (AINSWORTH; SUSSMAN, 1995).

Entre os sistemas celulares, os fungos são de grande interesse biotecnológico, sendo talvez, dentre os seres vivos, os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância para o bem estar da

população. Eles são importantes na indústria de alimentos, na produção de álcool, ácidos orgânicos como o cítrico e o acético, antibióticos e esteróides (AINSWORTH; SUSSMAN, 1996).

Os fungos endofíticos são microrganismos capazes de produzir metabólitos potencialmente bioativos. Habitam o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como as folhas, ramos e raízes, podendo habitar a planta por toda vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (AZEVEDO, 1998). Evidências da associação planta-microrganismo têm sido descobertas em tecidos fossilizados de caules e folhas. Provavelmente, ao longo do tempo e da evolução das espécies, os endofíticos podem ter desenvolvido sistemas genéticos que permitissem a transferência de informações entre eles e a planta e vice-versa, possibilitando ao endofítico lidar com condições ambientais instáveis e aumentando a compatibilidade com a planta hospedeira (STROBEL et al., 2004).

Além de proteger as plantas contra insetos, pragas e patógenos, os endofíticos ainda são capazes de produzir metabólitos que aumentam o crescimento e enraizamento da planta hospedeira e a sua resistência a estresses bióticos e abióticos (HALLMANN et al., 1997). Estas moléculas que podem possuir atividade de hormônios, antibióticos, antitumorais entre outras funções biológicas, apresentam grande interesse industrial e biotecnológico.

Certos produtos potencialmente bioativos produzidos por fungos endofíticos que merecem destaque são: 1- taxol produzido pelos fungos endofíticos *Taxomyces andreanae* e *Pestalotiopsis microspora* (STROBEL et al., 1996), com atividade antitumoral, 2- citocalasina E (WAGENAR et al., 2001),

pestalotiopsis A (PULICI et al., 1996), ácido torriânico e ácido oregânico (LEE et al., 1996); geniculol e citocalasina F que são algicidas (KONIG et al., 1999); 3-citosporona D (BRADY et al., 2000), fomopsolida A e ácido coletótrico (ZOU et al., 2000) que se destacam pela atividade antibacteriana; 4- leucinostatina A (STROBEL et al., 1997), criptocandina e criptocina (LI et al., 2000) que apresentam atividade antifúngica.

Tan e Zou (2001) examinaram a diversidade dos metabólitos isolados de fungos endofíticos e relataram isolamento de substâncias pertencentes a diversos grupos estruturais como esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, alcalóides, quinonas, furandionas, terpenóides, peptídeos, citocalasinas e compostos alifáticos. Compostos como terpenóides (CANTRELL et al., 2001) e triterpenóides possuem potencial atividade antimicobacteriana (OKUNADE et al., 2004).

Estudos baseados no cultivo de caules e folhas submetidos à esterilização superficial revelaram uma diversidade espetacular de fungos existentes subcuticularmente nos tecidos de muitos tipos de plantas saudáveis (CARROL, 1988). Qualquer espécie de planta vascular pode hospedar entre 10 e 100 diferentes espécies de fungos endofíticos, sendo no mínimo duas específicas no hospedeiro, chamadas de espécies dominantes (DREYFUSS; CHAPELA, 1994).

Do ponto de vista ecológico é extremamente importante, a descoberta de fontes microbianas produtoras de fármacos de alto valor agregado, porém são produzidos em quantidades reduzidas por espécies vegetais. Estas, devido ao extrativismo predatório estão ameaçadas de extinção. Os endofíticos apresentam-se como uma perspectiva muito importante para garantir a

preservação destas espécies, uma vez que se necessita de apenas uma pequena porção de tecido vegetal para o isolamento destes microrganismos, mantendo assim a produção de compostos que garantam a vida de pessoas afetadas por inúmeras doenças.

1.4 – ESPÉCIES VEGETAIS

1.4.1 – *Styrax camporum* (Styracaceae)

Esta espécie vegetal ocorre nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná, e predomina em regiões de cerrado (LORENZI, 1998). Amplamente utilizada em doenças gastroduodenais pela medicina popular, teve seu potencial antiulcerativo e toxicidade avaliados, a partir de extratos brutos e frações sendo confirmada a sua eficiência no combate de úlceras estomacais (BACCHI; SERTIÉ, 1994; BACCHI et al., 1995). O potencial antiulcerativo de *Styrax camporum* foi atribuído à presença de taninos (substâncias com ação cicatrizante) (BACCHI et al., 1995). Os taninos possuem em suas estruturas os grupos hidroxílicos fenólicos, conferindo-lhes uma forte ação antioxidante, e ação antiulcerogênica (CASA et al., 2000). Levantamento bibliográfico sobre a constituição química das espécies do gênero *Styrax* evidenciou a ocorrência de poucas classes de produtos naturais, predominando lignóides, triterpenos e saponinas (SORDI, 2007).

1.4.2 – *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)

Esta espécie vegetal é popularmente conhecida como “guaçatonga”, “cafezeiro do mato”, “chá de bugre”, “erva de bugre” e “língua de lagarto”. Apresenta ampla distribuição na América Tropical, especialmente no Brasil, ocorrendo em todo território, inclusive no Cerrado e Mata Atlântica (LORENZI, 1992). A *Casearia sylvestris* é uma planta medicinal utilizada por índios, caboclos e pela população em geral, sendo que, suas folhas, cascas e raízes são utilizadas como antitérmico, anestésico local, anti-diarréico, antiofídico, antireumático, antisséptico, antiulceroso, cicatrizante e depurativo (JUNGES et al., 1985; CORREA, 1975). Estudos fitoquímicos das folhas desta espécie vegetal evidenciaram a presença de flavonóides, saponinas, óleo essencial (SCAVONE et al., 1979). O extrato bruto apresentou atividades antiulcerosa (SERTIÉ et al., 2000), antiofídico, antiinflamatória e atumoral (CARVALHO et al., 1998).

1.4.3 – *Michelia champaca* (Magnoliaceae)

Esta espécie vegetal é muito utilizada como planta ornamental. Na medicina tradicional é utilizada no controle da febre, cólicas, e dores do parto, (PERRY, 1980) e também apresenta atividade antiinflamatória (VIMALA et al., 1997). Estudo fitoquímico desta planta evidenciou presença de óleo essencial,

aldeídos, fenóis (PERRY, 1980), terpenos, alcalóides, saponinas, esteróis, triterpenóides, taninos, falvonóides e alcalóide liriodenine (KHAN et al., 2002).

Foi demonstrado que extratos brutos de *Michelia champaca* apresentavam atividade contra uma grande variedade de bactérias e protozoários. Frações do extrato bruto, obtidas com o solvente acetato de etila proporcionaram um aumento significativo da atividade antimicrobiana (KHAN et al., 2002).

Devido às características relevantes encontradas nas espécies vegetais acima citadas buscou-se os fungos endofíticos presentes nestas plantas e avaliou-se a atividade anti- *M. tuberculosis* nos metabólitos secundários produzidos por estes fungos.

1.5 - MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE UTILIZANDO ALAMAR BLUE COMO REVELADOR DO CRESCIMENTO MICOBACTERIANO (Microplate Alamar Blue Assay - MABA)

O método mais comumente utilizado para a avaliação da susceptibilidade anti- *M. tuberculosis* a drogas é o método das proporções em ágar, onde se incorpora drogas antimicobacterianas no meio de cultura. Este método exige pelo menos 3 semanas de incubação, oferecendo resultados tardios (BRASIL, 1999). O BACTEC método radiométrico de susceptibilidade a drogas, é mais rápido que o método das proporções em ágar e os resultados são fornecidos em 5 a 10 dias, mas requer o uso de radioisótopos e sua

execução é cara (YAJKO et al., 1995). Yajko et al. (1995), desenvolveram um método alternativo para determinação da susceptibilidade a drogas, que é rápido, quantitativo e não radiométrico e utiliza o Alamar Blue para a detecção do perfil de sensibilidade micobacteriana a diferentes drogas, utilizando a diluição em tubos. O Alamar Blue cujo princípio ativo é a resazurina (O' BRIEN et al., 2000) que é um composto capaz de indicar, através da oxido-redução, o crescimento microbiano sendo atualmente muito empregado para determinar o perfil de sensibilidade a antimicobacterianos. Collins e Franzblau (1997) preconizaram a técnica do Alamar Blue com microdiluição em placa (Microplate Alamar Blue Assay – MABA). A comparação desta técnica frente às outras demonstrou que o MABA, por ser uma técnica rápida, sensível, não radiométrica e ter custo baixo, é de grande utilidade para se determinar a Concentração Inibitória Mínima principalmente quando se trabalha com um grande número de novos compostos, frente a micobactérias que são de crescimento lento. O MABA vem sendo utilizado por diversos grupos de pesquisa para determinar a atividade anti - *M. tuberculosis* de princípios ativos naturais (PIETRO et al., 2000; JANUÁRIO et al., 2002; LEAL et al., 2003).

Neste estudo, o *M. tuberculosis* foi testado frente a diferentes concentrações de ácido pirenochaético A e extratos brutos de fungos endofíticos com potencial para novas drogas antimicobacterianas, a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), do agente antimicrobiano capaz de inibir 90% da população bacteriana, *in vitro* (LEE; HEIFETS, 1987) utilizando o MABA.

1.6 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A determinação da citotoxicidade é um procedimento importante na pesquisa de substâncias menos tóxicas e seletivas com atividade antimicobacteriana, sendo fundamental que a droga atue seletivamente contra o *M. tuberculosis*, porém seja inócua ou pouco tóxica ao hospedeiro. Dessa maneira, a determinação do IC de substâncias pode ser realizada *in vitro* sobre células eucarióticas (SATO, 2003). O IC₉₀ é um índice que determina 90% de viabilidade celular e é definido como o ponto no qual ocorre a mudança de coloração do reagente Alamar Blue, de azul para a rosa. O IC₅₀ é definido como a concentração onde ocorre 50% de morte celular e é calculado a partir do IC₉₀ (PIETRO, 2000).

Desde 1993, tem-se utilizado o corante Alamar Blue (FIELDS et al., 1993) para a determinação da viabilidade celular. Este corante não é citotóxico, pois não é necessária a morte celular para se obter resultados dos ensaios, ao contrário do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). O método é simples, rápido, eficiente, confiável, sensível e seguro. O corante não deve interferir com o composto a ser testado. (CANTRELL et al., 1996; ARECHABALA et al., 1999).

Para a determinação do Índice de Citotoxicidade (IC), os extratos brutos de fungos endofíticos promissores foram testados frente à linhagem celular J774 (macrófagos de murinos). Por esta técnica, foi determinada a concentração de metabólico que provoca 50% de morte celular sendo o índice denominado de IC₅₀ (AHMED, 1994).

1.7 – DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

A partir dos valores obtidos de IC_{50} e CIM_{90} é calculado o Índice de Seletividade (IS) através da razão da primeira pela segunda com o objetivo de se estimar uma possibilidade de relação entre o ensaio *in vitro* e a passagem segura para ensaio *in vivo* de compostos sintéticos ou naturais (PROTOPOPOVA et al., 2005). Esta estimativa favorece também a determinação e o acompanhamento da atividade do processo de fracionamento de bioensaios dos princípios ativos (ORME, 2001; FALZARI et al., 2005).

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo pesquisar, nos extratos parciais e substância pura produzidos por fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado, a atividade contra o *M. tuberculosis*. Este faz parte do projeto temático “Conservação, Sustentabilidade e Uso de Plantas do Cerrado e da Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Drogas em Potencial” dentro da linha de pesquisa “Bioprospecção em Fungos Endofíticos de Espécies Vegetais de Cerrado e Mata Atlântica”.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 - Determinar a atividade antimicobacteriana dos extratos parciais e substância pura de fungos endofíticos, frente ao *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, empregando-se a técnica já padronizada da microdiluição em placas utilizando como revelador de crescimento bacteriano o Alamar Blue (MABA – Microplate Alamar Blue Assay).

2.1.2 - Realizar testes de citotoxicidade utilizando cultura de células de macrófagos de murinos da linhagem J774, para extratos parciais e substância pura com CIM $\leq 125 \mu\text{g/mL}$.

2.1.3.- Determinar o IS (Índice de Seletividade) dos extratos parciais e substância pura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – CEPA DE *Mycobacterium tuberculosis*

3.1.1 - A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294 foi utilizada para determinação da CIM dos extratos parciais e substância pura de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA. A cultura bacilar foi mantida em meio de Lowenstein-Jensen até o momento do uso.

A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294 foi gentilmente cedida pelo Dr. Scott Gary Franzblau do Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois em Chicago, USA.

3.2 - DROGA DE REFERÊNCIA

Foi utilizada a solução estoque de isoniazida (INH – Sigma) a 10 mg/mL em água destilada como droga de referência nas técnicas do MABA e de citotoxicidade.

3.3 - METABÓLITOS BIOATIVOS

Extratos parciais e substância pura, produzidos por fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *Styrax camporum* (Styracaceae), *Casearia*

sylvestris (Flacourtiaceae), e *Michelia Champaca* (Magnoliaceae), foram obtidos por Ms. Renata Sordi, Dra. Mariana Carrara Cafêu e Dr. Ioanis Hcristos Leptokarydis, no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP de Araraquara, sob a orientação da Prof^a Dr^a Ângela Regina Araújo.

3.3.1 – EXTRATOS BRUTOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Styrax camporum* (Styracaceae).

As folhas da espécie vegetal foram coletadas em região de Cerrado na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu, fazenda Campininha/São Paulo e identificadas pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo. As exsicatas encontram-se devidamente classificadas e depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

Este material vegetal foi processado pela Ms. Renata Sordi que obteve isolamento de 7 linhagens de fungos endofíticos (SC-01, SC-02, SC-03, SC-04, SC-05, SC-06, SC-07). A sigla SC refere-se ao nome da espécie vegetal *Styrax camporum* e o número é referente à sequência de isolamento.

Os sete isolados foram cultivados no caldo MBD (DIFCO), obtendo-se, sete extratos brutos (provenientes de metabólitos secretados pelos fungos endofíticos) após a partição líquido-líquido do caldo com o Acetato de Etila (AcOEt) (Tabela 1).

As culturas puras estão sendo classificadas pelo Prof. Dr. Ludwing H. Pfenning do Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Lavras

– MG. Até o momento, dos endofíticos isolados das folhas saudáveis de *Styrax camporum*, três linhagens foram classificadas: SC-02 – *Phomopsis* sp; SC-03 – *Phomopsis stipata* 1 e SC-04 – *Phomopsis stipata* 2.

Tabela 1. Relação dos Extratos Brutos Obtidos de Fungos Endofíticos Isolados de Folhas da Espécie Vegetal *Styrax camporum*

PARTE DO VEGETAL	FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO	SOLVENTE UTILIZADO	TIPO DO METABÓLITO BIOATIVO	SIGLA DO EXTRATO
Folhas	SC-01	AcOEt	Extrato bruto	ESC-01
Folhas	SC-02 <i>Phomopsis</i> sp	AcOEt	Extrato bruto	ESC-02
Folhas	SC-03 <i>Phomopsis stipata</i> 1	AcOEt	Extrato bruto	ESC-03
Folhas	SC-04 <i>Phomopsis stipata</i> 2	AcOEt	Extrato bruto	ESC-04
Folhas	SC-05	AcOEt	Extrato bruto	ESC-05
Folhas	SC-06	AcOEt	Extrato bruto	ESC-06
Folhas	SC-07	AcOEt	Extrato bruto	ESC-07

O fungo endofítico codificado SC-04 foi cultivado em dois meios de cultura contendo milho (YOKI) ou arroz (TIO JOÃO) e em quatro outros meios comerciais (ME, YM, Nutrient e CzapeK da DIFCO). Obteve-se assim mais seis extratos brutos com metabólitos secretados pelo fungo SC-04 (*Phomopsis stipata* 2), após extração com Acetato de Etila (AcOEt) (Tabela 2).

Tabela 2. Extratos Brutos produzidos pelo fungo endofítico SC-04 (*Phomopsis stipata* 2) cultivados em meios com cereais e meios comerciais.

MEIOS DE CULTURA	SOLVENTE	TIPO DO METABÓLITO BIOATIVO	SIGLA DO EXTRATO
Milho	AcOEt	Extrato bruto	EMilho-04
Arroz	AcOEt	Extrato bruto	EArroz-04
ME	AcOEt	Extrato bruto	EME-04
YM	AcOEt	Extrato bruto	EYM-04
Nutrient	AcOEt	Extrato bruto	ENU-04
Czapek	AcOEt	Extrato bruto	ECZ-04

3.3.2 – EXTRATOS BRUTOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae).

As folhas de *Casearia sylvestris* foram coletadas na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu, fazenda Campininha e identificadas pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo. As exsiccatas (AGS-103) encontram-se devidamente classificadas e depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

Este material vegetal foi processado pela Dra. Mariana Carrara Cafêu que obteve o isolamento de 5 linhagens fúngicas (fungos endofíticos), que receberam os seguintes códigos: CSY-01, CSY-02, CSY-03, CSY-04, CSY-05. A sigla CSY refere-se ao nome da espécie vegetal *Casearia sylvestris* e o número refere-se à sequência de isolamento.

Destes cinco fungos endofíticos isolados, obteve-se os respectivos extratos brutos provenientes de metabólitos secundários secretados no caldo MBD (DIFCO), obtidos após partição líquido-líquido com o solvente Acetato de Etila (AcOEt) (Tabela 3). Somente foram testados os extratos brutos codificados CSY-01 e CSY-02.

As linhagens fúngicas foram enviadas para a classificação para o Prof. Dr. Ludwing H. Pfenning, do departamento de fitopatologia da Universidade Federal de Lavras/MG. Sendo que o fungo endofítico codificado como CSY-01 não foi identificado e CSY-02 foi identificado como *Colletotricum crassipes*.

Tabela 3. Relação dos Extratos Brutos Obtidos de Fungos Endofíticos Isolados de Folhas da Espécie Vegetal *Casearia sylvestris*.

PARTE DO VEGETAL	FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO	SOLVENTE UTILIZADO	TIPO DO METABÓLITO BIOATIVO	SIGLA DO EXTRATO
Folhas	CSY-01	AcOEt	Extrato bruto	ECSY-01
Folhas	CSY-02	AcOEt	Extrato bruto	ECSY-02

3.3.3 – EXTRATOS BRUTOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS E RAÍZES DA ESPÉCIE VEGETAL *Michelia champaca* (Magnoliaceae).

As folhas e raízes de *Michelia champaca* foram coletadas nas dependências do Instituto de Química – UNESP Araraquara e identificadas pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo. As exsiccatas encontram-se devidamente classificadas e depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

Este material vegetal foi processado pelo Dr. Ioanis Hcristos Leptokarydis que obteve o isolamento de 2 linhagens fúngicas (fungos endofíticos), que receberam os seguintes códigos: MC-7F (folhas) e MC-8R (raízes). A sigla MC refere-se ao nome da espécie vegetal *Michelia champaca* e o número refere-se à sequência de isolamento.

Destes dois fungos endofíticos isolados, obteve-se respectivamente, dois extratos brutos (Tabela 4).

A linhagem MC-8R por apresentar atividade em potencial, frente a fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, foi cultivada em larga escala em caldo PDB (DIFCO) e cultivada sob agitação por 28 dias. Após este período o micélio foi separado por filtração e o caldo contendo os metabólitos secundários bioativos, submetido à partição líquido/líquido com AcOEt, fornecendo o extrato bruto. Este foi submetido à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando coluna C-fenil-hexil e como eluente MeOH/H₂O (40:60). Deste procedimento foi

isolada a substância pura codificada FR-4.3 que posteriormente foi identificada como ácido pirenochaético A.

As linhagens fúngicas foram enviadas para a identificação para o Prof. Dr. Ludwing H. Pfenning, do departamento de fitopatologia da Universidade Federal de Lavras/MG. O fungo endofítico codificado como MC-7F foi identificado como *Colletotrichum gloesporioides* e o MC-8R ainda não foi identificado.

Tabela 4. Relação dos Extratos Brutos Obtidos de Fungos Endofíticos Isolados de Folhas e Raízes da Espécie Vegetal *Michelia champaca*

PARTE DO VEGETAL	FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO	SOLVENTE UTILIZADO	TIPO DO METABÓLITO BIOATIVO	SIGLA DO EXTRATO
Folhas	MC-7F	AcOEt	Extrato bruto	EMC-7F
Raízes	MC-8R	AcOEt	Extrato bruto	EMC8F
Raízes	MC-8R	MeOH/H ₂ O	Substância pura Obtida do EMC-8R	FR 4.3 Ácido Pirenochaético A

3.4 – CULTURA DE CÉLULAS

3.4.1 – Macrófagos de Murino da linhagem celular J774 foram utilizados para o cultivo celular. As células ficaram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂, em garrafas (TPP) com superfície em torno de 12,5 cm², contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 10 µL de estreptomicina/ampicilina (solução estoque 10000 µg/mL) e 10µL de anfotericina B (solução estoque 5,6 µg/mL).

.

3.5 - METODOLOGIA

3.5.1 – PREPARO DAS SUSPENSÕES BACILARES

Para a realização do MABA, foi utilizada cultura de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. A cepa foi mantida em meio de Lowestein-Jensen (LJ) até o momento do uso. Uma alçada da cultura correspondente a 5,0 mg de peso seco bacteriano, foi semeada em meio de cultura Middlebrook 7H9 (DIFCO) suplementado de OADC (BD) e incubado por 10 dias a 37°C. Após obtenção de quantidade ideal de microrganismo (compatível com a escala nº 1 de McFarland - 10⁷ UFC/mL), a suspensão de micobactérias obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos e o sedimento foi lavado duas vezes com salina tamponada com fosfato (tampão PBS pH 7.0), acrescido de Tween 80 estéril.

3.5.2 – PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS, DA SUBSTÂNCIA PURIFICADA E DA DROGA DE REFERÊNCIA

Os extratos brutos e substância purificada de fungos endofíticos foram solubilizados com a adição de aproximadamente 100 a 200 µL de dimetilsulfoxido (DMSO – Sigma) e agitação em aparelho de ultra-som UNIQUE USC 1450. Após solubilização dos extratos brutos e substância purificada (solução estoque 10.000 µg/ml), estes foram guardados em frascos escuros (para evitar perda de atividade por foto-decomposição) e armazenados sob refrigeração a 4°C. A isoniazida foi diluída em água destilada (solução estoque 10000 µg/ml).

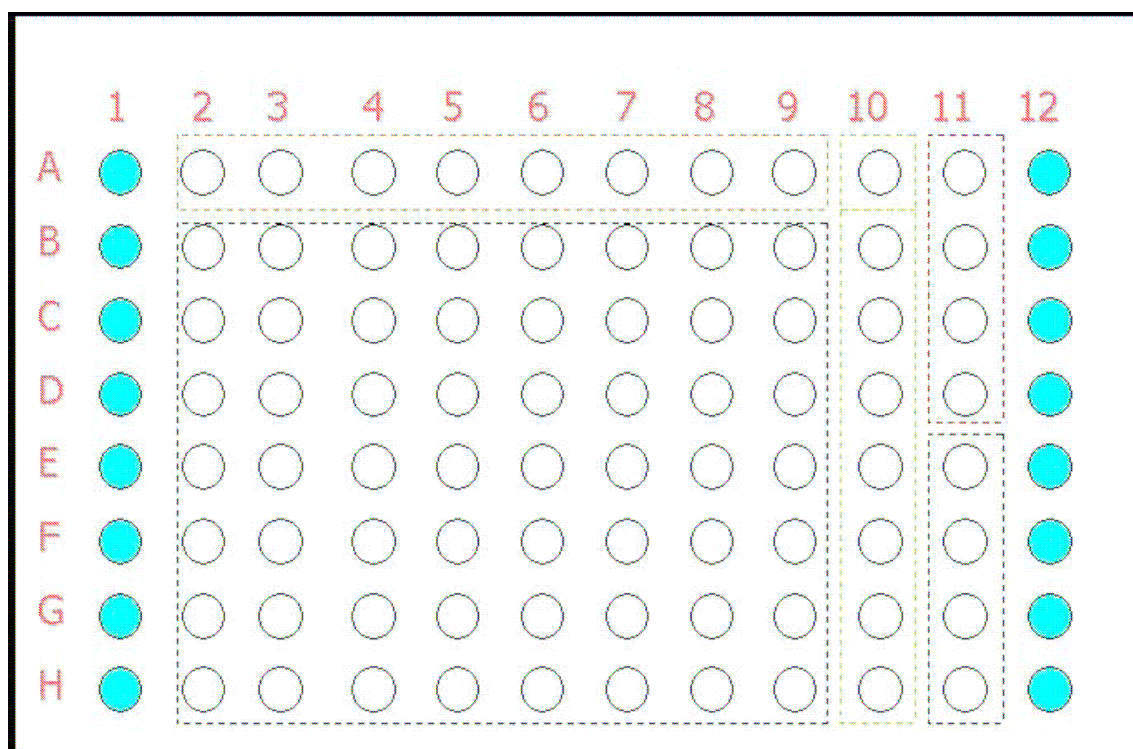
3.5.3 – ATIVIDADE BIOLÓGICA

Inicialmente os extratos brutos e o ácido pirenochaético A, foram testados contra o *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294, pelo MABA para avaliar a atividade antimicobacteriana extracelular. Foram considerados promissores, aqueles que apresentaram valores de CIM ≤ 125 µg/mL (Gu et al, 2004). Os extratos brutos promissores (ESC-03, ESC-04, EMilho-04, ECZ-04, ECSY-02, EMC-7F e EMC-8R) e o ácido pirenochaético A, foram avaliados quanto a citotoxicidade empregando macrófagos de murino da linhagem celular J774. Foram considerados metabólitos secundários de interesse, aqueles com índice de citotoxicidade 10 vezes superior ao valor do CIM.

3.5.3.1 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- *M. tuberculosis* DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PELA TÉCNICA DO MICROPLATE ALAMAR BLUE ASSAY (MABA)

O estudo foi realizado empregando a metodologia padronizada por Collins e Franzblau (1997). Para a realização do MABA, foi utilizada uma microplaca (NUNC) estéril de 96 orifícios transparente (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática da técnica do MABA.



Linha Tracejada: (marrom=controle das substâncias testadas; vermelho=controle positivo; azul=controle negativo; verde=controle da droga de referência; preto=diluição seriada das substâncias testadas); Orifício preenchido: (azul claro=água destilada).

Nas colunas 1 e 12 em linhas de A a H foram adicionados 200 µL de água destilada estéril, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa.

A seguir, os orifícios de A a D da coluna 11 receberam 100 µL de meio Middlebrook 7H9 (DIFCO) (controle positivo), os orifícios correspondentes de E a H da coluna 11 receberam 200 µL de Middlebrook 7H9 (controle negativo). Os orifícios correspondentes da linha A de colunas de 2 a 10 receberam 150 µL de meio Middlebrook 7H9 (controle do metabólito bioativo) e os de linha B a H referentes à coluna 2 a 10, receberam 100 µL de meio Middlebrook 7H9 (para diluição seriada dos extratos brutos, substância purificada e droga de referência).

Os orifícios da coluna 2 a 9 da linha A receberam 50 µL da diluição de 1000 µg/mL do extrato bruto correspondente e o orifício da coluna 10 da linha A recebeu 50 µL da diluição de 4 µg/mL da isoniazida (droga de referência) (SIGMA). Os orifícios da linha B referentes às colunas de 2 a 9 receberam 100 µL da diluição de 1000 µg/mL do extrato bruto correspondente e o orifício da coluna 10 e da linha B recebeu 100 µL da diluição de 4 µg/mL da droga de referência isoniazida. Após a homogeneização da linha B, procedeu-se à diluição dos orifícios das linhas B a H das colunas 2 a 10, ao final desprezou-se o volume de 100 µL. Os extratos brutos partiram da diluição de 250 µg/mL (linha B); 125 µg/mL (linha C); 62,5 µg/mL (linha D); 31,2 µg/mL (linha E); 15,6 µg/mL (linha F); 7,8 µg/mL (linha G); 3,9 µg/mL (linha H), e a droga de referência isoniazida partiu da diluição de 1 µg/mL (linha B); 0,5 µg/mL (linha C); 0,25 µg/mL (linha D); 0,12 µg/mL (linha E); 0,06 µg/mL (linha F); 0,03 µg/mL (linha G); 0,01 µg/mL (linha H).

Ao final foi adicionada a suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294, diluída 1:25 a partir da comparação com a escala McFarland nº 1. Os orifícios das colunas 2 a 10 e linhas B a H (contendo as soluções do extrato bruto e isoniazida) receberam 100 µL da suspensão bacilar, os orifícios da coluna 11 das linhas A a D também receberam 100 µL da suspensão bacilar, com o intuito de ser controle positivo da bactéria.

A microplaca foi selada com filme de polietileno e incubada em estufa bacteriológica a 37° C. Após cinco dias de incubação os orifícios da coluna 11 linha A (Controle positivo) e linha E (controle negativo), receberam 25 µL da solução reveladora de Alamar Blue (mistura de Tween 80 a 10% e Alamar Blue 1:1). A microplaca foi reincubada a 37°C por 24 horas, após foi realizada a leitura visual. Ao se obter desenvolvimento de cor rósea no orifício controle de cepa micobacteriana (indica crescimento microbiano), foram adicionados 25 µL da solução reveladora de Alamar Blue nos demais orifícios, sendo as microplacas reincubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura visual final.

A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de droga capaz de inibir o crescimento de 90% da cepa de *M. tuberculosis*, ou seja, a menor concentração do extrato bruto ou substância purificada capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa. Cada extrato bruto e substância pura foram testados em duplicata e o mesmo teste foi repetido três vezes em semanas consecutivas.

3.5.3.2 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Macrófagos de murinos da linhagem celular J774 foram utilizados para determinação de Índice de Citotoxicidade (IC) ou Viabilidade e o Alamar Blue foi utilizado como reagente revelador pelo método preconizado por O' Brien et al, (2000).

A linhagem celular J774 que estava mantida a 37°C, com 5% de CO₂, em garrafas (TPP) com superfície em torno de 12,5 cm², contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 10 µL de estreptomicina/ampicilina (solução estoque 10.000 µg/mL) e 10µL de anfotericina B (solução estoque 5,6 µg/mL), foram coletadas através da raspagem do tapete celular (utilizando *scraper*). As células foram transferidas para um tubo de centrifuga e centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram resuspensas em 2 mL do meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO). 10µL da suspensão celular foi diluída na proporção 1:10 e após a adição de uma gota do corante Turk as células foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 1×10^5 células por mL.

Para a preparação da monocamada de macrófagos da linhagem J774, em uma microplaca estéril de 96 orifícios transparente (TPP), foi depositado, em cada orifício, 200 µL da suspensão celular (1×10^5 cels/mL) e a microplaca foi incubada a 37°C com 5% de CO₂, por 48 horas, para formação do tapete celular. A seguir, retirou-se 100 µL da cultura de todos os orifícios.

Em um microplaca estéril de 96 orifícios transparente (TPP) os extratos brutos promissores (CIM $\leq$ 125 µg/mL) e o ácido pirenochaético A (3,9 µg/mL)

em duplicata, foram diluídos de forma seriada, partindo da seguinte diluição: 500 µg/mL até 3,9 µg/mL. A seguir todo o conteúdo dessa microplaca foi transferido para a microplaca contendo o tapete celular. A microplaca foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Na sequência, foram adicionados em cada orifício da microplaca 15 µL do agente revelador Alamar Blue 1:1, procedendo à leitura após 6 horas de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata e em dias alternados (AHMED, 1994).

3.5.3.3 – DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE

De acordo com Protopopova (2005), o índice de seletividade dos extratos brutos e da substância pura, foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ sobre CIM para estudos de compostos promissores. Foi considerado que, quanto maior o valor de IS, o agente analisado é mais ativo contra o bacilo da tuberculose e menos citotóxico para o hospedeiro.

4. RESULTADOS

4.1 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI - *Mycobacterium tuberculosis*

Os resultados de CIM dos extratos brutos e da substância pura obtidos de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *Styrax camporum*, *Casearia sylvestris* e *Michelia champaca* estão apresentados nas tabelas abaixo 5, 6 e 7. Todos os resultados obtidos foram confrontados com o valor de CIM da Isoniazida utilizada como droga de referencia para o controle de qualidade metodológica.

Tabela 5. Resultados de CIM dos Extratos Brutos de Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal *Styrax camporum*.

ESPÉCIE VEGETAL E DROGA DE REFERÊNCIA	FUNGO ENDOFÍTICO/ IDENTIFICAÇÃO	SIGLA DO EXTRATO	CIM (µg/mL)
<i>Styrax camporum</i>	SC-01	ESC-01	> 250
<i>Styrax camporum</i>	SC-02 <i>Phomopsis sp</i>	ESC-02	250
<i>Styrax camporum</i>	SC-03 <i>P. stipata 1</i>	ESC-03	125
<i>Styrax camporum</i>	SC-04 <i>P.stipata 2</i>	ESC-04	62,5
<i>Styrax camporum</i>	SC-05	ESC-05	250
<i>Styrax camporum</i>	SC-06	ESC-06	> 250
<i>Styrax camporum</i>	SC-07	ESC-07	> 250
<i>Styrax camporum</i>	SC-04 <i>P.stipata 2</i>	EMilho-04 EArroz-04 EME-04 ECZ-04 EYM-04 ENU-04	31,25 250 250 125 250 250
Isoniazida INH	-	-	0,03

O extrato bruto ESC-04 produzido pelo fungo endofítico SC-04 apresentou valor de CIM promissor de 62,5 µg/mL. Este fungo, identificado como *P.stipata* 2, cultivado no meio com milho, produziu extrato bruto mais ativo contra *M. tuberculosis* com valor de CIM de 31,25 µg/mL, ao passo que nos demais meios (Arroz, CZ, YM, NU), os valores de CIM dos extratos brutos foram $\geq$ a 125 ug/ml.

Tabela 6. Resultados de CIM dos Extratos Brutos de Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal *Casearia sylvestris*.

ESPÉCIE VEGETAL	FUNGO ENDOFÍTICO/ IDENTIFICAÇÃO	SIGLA DO EXTRATO	CIM (µg/mL)
<i>Casearia sylvestris</i>	CSY-01 (Não identificado)	ECSY-01	250
<i>Casearia sylvestris</i>	CSY-02 <i>Colletotrichum</i> <i>crassipes</i>	ECSY-02	62,5

Os extratos brutos ECSY-02 e ECSY-01 apresentaram respectivamente valores de CIM de 62,5 µg/mL e de 250 µg/mL indicando ser o ECSY-02 mais promissor .

Tabela 7. Resultados de CIM dos Extratos Brutos e Substância Pura de Fungos Endofíticos Isolados da Espécie Vegetal *Michelia champaca*.

ESPÉCIE VEGETAL	FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO	SIGLA DO EXTRATO E SUBSTÂNCIA PURA	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Michelia champaca</i>	MC-7F <i>(Colletotrichum gloesporioides)</i>	EMC-7F	125,0
<i>Michelia champaca</i>	MC-8R (Não identificado)	EMC-8R	31,25
<i>Michelia champaca</i>	MC-8R (Não identificado)	Ácido Pirenochaético A	3,9

Com valor de CIM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, o extrato bruto EMC-8R produzido pelo fungo endofítico MC-8R foi o mais promissor para esta espécie vegetal. Deste extrato foi obtido uma substância pura (FR-4.3) cuja identificação estrutural revelou ser o ácido pirenochaético. A substância pura apresentou atividade anti – *M. tuberculosis* em potencial, com valor de CIM de 3,9 $\mu\text{g/mL}$.

4.2 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E IS

Os resultados de CIM, IC₅₀ e IS dos metabólitos secundários bioativos promissores (CIM ≤125µg/mL) estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Resultados de CIM, IC₅₀ e IS dos Extratos Brutos e Ácido Pirenochaético A Promissores.

ESPÉCIE VEGETAL	FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO	SIGLA DO EXTRATO E SUBSTÂNCIA PURA	CIM (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
<i>Styrax camporum</i>	SC-03	ESC-03	125	> 250	> 2
<i>Styrax camporum</i>	SC-04	ESC-04	62,5	> 500	> 8
<i>Styrax camporum</i>	(SC-04) Milho	EMilho	31,25	> 250	> 8
	CZ	ECZ	125	> 500	> 4
<i>Casearia sylvestris</i>	CSY-02	ECSY-02	62,5	> 125	> 2
<i>Michelia champaca</i>	MC7F	EMC7F	125	> 125	> 1
<i>Michelia champaca</i>	MC8R	EMC8R	31,25	> 250	> 8
<i>Michelia champaca</i>	MC8R	Substância Ácido Pirenochaético A	3,9	> 62,5	> 16

Os extratos brutos ESC-04, EMilho-04, EMC-8R e o ácido pirenochaético A, além de apresentar excelente atividade anti- *M. tuberculosis* foram pouco citotóxicos apresentando IS igual ou superior a 4 vezes ao valor do CIM. No caso do ácido pirenochaético A, foi verificado valor de IS 16 vezes superior ao do CIM.

5. DISCUSSÃO

O surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas múltiplas é um problema mundial e tem sido associado ao abandono da terapia pelo paciente, ou falha no tratamento (FRIEDEN et al., 2003), tornando urgente à busca de novos princípios ativos tanto de extratos brutos de plantas ou outras fontes naturais (COWAN, 1999).

Produtos naturais são explorados há muitos anos e as plantas sempre representaram a principal fonte natural de compostos usados na medicina popular (STROBEL et al., 2004). Entre os 520 novos fármacos aprovados entre 1983 e 1994, 39% são produtos naturais ou derivados de produtos naturais, predominando na área de antibacterianos e antitumorais (CRAGG et al., 1997; CRAGG et al., 2006).

Após a descoberta da penicilina por Fleming e Chain em 1930, os microrganismos, representados maciçamente pelos fungos, também começaram a ser investigados como fonte de princípios bioativos. (STROBEL et al., 2004, CAFÊU, 2007). Além da alta capacidade de produção metabólica, os fungos apresentam vantagens sobre outras fontes naturais, uma vez que são recursos renováveis e a produção em larga escala dos metabólitos bioativos pode ser obtida em meios de cultura utilizando a tecnologia existente (CAFÊU, 2007).

Segundo Dreyfuss e Chapela (1994), dentre os fungos filamentosos, os fungos endofíticos constituem o grupo mais produtivo quimicamente, apresentando uma produção de metabólitos secundários 73% superior a de outros fungos. A alta produtividade dos endofíticos pode ser explicada pela

teoria ecológica que prediz que existem dois fatores chaves para promover a diversidade metabólica em organismos: alto nível de “stress” ambiental e intensas interações com outros organismos. Organismos submetidos a um ou ambos os fatores são mais prováveis de produzirem metabólitos secundários biologicamente ativos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994).

Neste estudo foi avaliada a atividade anti - *M. tuberculosis* dos extratos brutos e substância pura produzidos pelos fungos endofíticos obtidos das espécies vegetais: *Styrax camporum*, *Casearia sylvestris* e *Michelia champaca* utilizando o MABA.

Os extratos brutos ESC-03 e ESC-04 produzidos respectivamente pelos fungos *Phomopsis stipatia* 1 e *Phomopsis stipatia* 2, provenientes da espécie vegetal *Styrax camporum* apresentaram atividade anti- *M. tuberculosis* promissora com valor de MIC de 125 e de 62,5 µg/mL . O gênero *Phomopsis* é conhecido por ser uma fonte rica em metabólitos secundários bioativos de estruturas diversas. Levantamento bibliográfico sobre as substâncias isoladas de *Phomopsis* revela que, apesar do grande potencial deste gênero, os seus metabólitos ainda são pouco estudados (SORDI, 2007).

Na análise química, o extrato bruto ESC-03 revelou a presença do ácido 3-nitropropiónico (SORDI, 2007). De acordo com Chomcheon, et. al. (2005), a produção deste ácido é comum entre os fungos do gênero *Phomopsis* e que este é um potente composto antibacteriano. Os autores verificaram que o ácido 3-nitropropiónico apresentava forte atividade contra *M. tuberculosis*, com valor de CIM de 3,3 uMol (CHOMCHEON, et. al., 2005). Sendo assim a atividade anti – *M. tuberculosis* encontrada no extrato ESC-03 (Tabela 5), deve estar

relacionada à presença do ácido 3-nitropropionico, fato que poderá ser confirmado com o isolamento da substância a partir do extrato bruto ESC-03.

O extrato bruto ESC-04, apresentou excelente atividade anti - *M. tuberculosis* com valor de MIC de 62,5 µg/mL (Tabela 5). O fracionamento deste extrato por Sordi (2007), promoveu o isolamento de 2 substâncias inéditas, que apresentam esqueletos carbônicos semelhantes aos das substâncias denominadas koningininas produzidas por fungos do gênero *Trichoderma*. As koningininas segundo Cutler et. al. (1989; 1991; 1999), apresentam diversas atividades biológicas.

O cultivo do fungo *Phomopsis stipata* 2 (SC-04) em 6 outros meios de cultura (EM, YM, Nutriente e Czapek e dois com cereais milho e arroz), resultou em seis extratos brutos (EEM-04, EYM-04, ENU-04, ECZ-04, EMilho-04 e EArroz-04), dentre os quais, o EMilho-04 apresentou CIM de 31,25 µg/mL. Os outros extratos brutos não apresentaram atividade antimicobacteriana promissora, sendo que, os valores de CIM ficaram em torno de 250 e 125 µg/mL (Tabela 5). Este resultado indicou que o meio de cultura contendo milho favoreceu a produção de metabólitos secundários bioativos contra *M. tuberculosis* pelo fungo endofítico *Phomopsis stipata* 2 (SC-04). Por outro lado, outros meios de cultura influíram negativamente na produção de metabólitos antimicobacterianos. Sordi (2007) comparou a composição dos extratos brutos, produzido pelo *Phomopsis stipata* 2 cultivado em diferentes meios (MDB EM, YM, Nutriente, Czapek e com cereais). Verificou maior quantidade de metabólitos secundários nos extratos brutos originários do cultivo em caldo MDB e no meio com milho. A maior produção de metabólitos, encontrado por Sordi (2007), talvez possa explicar a maior atividade anti – *M. tuberculosis* dos

extratos brutos obtidos a partir do cultivo do fungo em caldo MDB e no meio com milho. Provavelmente, estes meios possibilitaram ao fungo produzir maior diversidade metabólica, bem como estimular a produção de metabólitos potencialmente bioativos.

Sordi (2007) ainda verificou que apenas os extratos produzidos em cereais (arroz e milho), apresentaram atividade antifúngica, inibindo o crescimento das linhagens fúngicas fitopatogênicas (*Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*).

Dos extratos brutos ECSY-01 e ECSY-02 produzido pelo fungo endofítico *Colletotrichum crassipes*, proveniente da espécie vegetal *Casearia sylvestris*, somente o extrato bruto ECSY-02 apresentou atividade anti - *M. tuberculosis* promissora com MIC de 62,5 µg/mL.

Segundo Cafêu (2007), fungos do gênero *Colletotrichum*, na forma endofítica, são reconhecidos como produtores de uma gama de metabólitos bioativos. Por exemplo, o fungo *C. gloesporioides* isolado da espécie vegetal *Artemisia mongólica* produziu o ácido colletotrico, que apresentou atividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (ZOU et al., 2000). Na cultura de *Colletotrichum sp.* isolado de *Artemisia annua*, foram encontrados diversos metabólitos tais como ergosterol, 3-oxo-ergost-4-ene, 3-indol-ácido acético, 6-isoprenillindol-3-ácido carboxílico, 3β, 5α-diidroxi-6β-acetóxi-ergosta-7, 22-dieno e 3β, 5α, 6β-triidroxi-ergosta-7,22-dieno, todos com atividade antimicrobiana e antifúngica (LU et al., 2000). Outros metabólitos secundários também foram produzidos por fungos *Colletotrichum sp.* como aspergillomarasmina A e B, gloesporona, ferricrocina, uracila e lumichroma (INACIO et al., 2006). Estes dados revelam a potencialidade dos fungos do

gênero *Colletotrichum* na produção de substâncias com esqueleto químico diverso, além de bioativas (CAFÊU, 2007).

O estudo químico do extrato bruto ECSY-02, produzido por *Colletotrichum crassipes*, apresentou uma alta e diversificada produção metabólica tais como, dicetopiperazína, tirosol, N-(2-fenetil) cetamina, e duas substâncias 1-hidroxi-1-feniletil-tirosol e 6-metil-3- (feniletóxi)-1,4-dioxan-2-il) metanol, ainda não relatadas (CAFEU, 2007).

Dentre os metabolitos identificados no ECSY-02, Maskey et al. (2002) e Fdhila et al. 2003, relataram potente atividade antimicrobiana para o N - (2-fenetil) acetamina e dicetopiperazina. Tirosol foi identificado como um agente antifúngico em potencial (GUIMARÃES, 2006). Neste sentido, a atividade anti - *M. tuberculosis* encontrada no extrato bruto ECSY-02 pode estar relacionada a presença destes metabolitos no extrato. Devido à diversidade metabólica apresentada, este fungo se revela como microrganismo promissor na busca de agentes produtores de novos e potenciais metabólitos secundários bioativos.

Os extratos brutos EMC-7F e EMC-8R produzidos por fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *Michelia champaca* apresentaram atividade anti - *M. tuberculosis* promissora com MIC de 125µg/mL e 31,25µg/mL respectivamente. Apesar do extrato bruto EMC-8R ter apresentado melhor atividade anti - *M. tuberculosis*, o fungo responsável pela sua produção ainda não foi identificado. Por outro lado, o fungo endofítico *Colletotricum gloesporioides* foi identificado como o produtor do EMC-7F.

O extrato bruto EMC-8R submetido ao fracionamento, resultou no isolamento de uma substância pura cuja identificação estrutural revelou ser o ácido pirenochaético A (LEPTOKARYDIS et al., 2006). O ácido, testado contra

M. tuberculosis, apresentou excelente atividade anti - *M. tuberculosis* com MIC de 3,9 µg/mL. Sendo assim a atividade anti - *M. tuberculosis* determinada no extrato bruto deve estar relacionada à presença deste ácido.

A atividade anti - *M. tuberculosis* apresentada por ácido pirenochaético A é inferior ao da INH (CIM de 0,03 µg/mL) entretanto é superior a de outros quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico da tuberculose como o etambutol (CIM de 1-5 µg/mL), a estreptomicina (CIM de 2-8 µg/mL) e a pirazinamida (CIM de 20-100 µg/mL) (MÉDECINS SANS FRONTIÈRES, 2007).

Em relação aos ensaios para determinar a citotoxicidade dos extratos e compostos promissores, foi verificado valor do IC₅₀ no intervalo de 500 e 250 µg/mL para o extrato EMC-8R e entre 125 e 62,5 µg/mL para o ácido pirenochaético A. Uma vez que os valores de CIM foram respectivamente de 31,25µg/mL e 3,9 µg/mL, é possível inferir que ambos (EMC-8R e ácido pirenochaético A) apresentam baixa citotoxicidade, devido ao IC₅₀ ser superior a 10 vezes aos valores de CIM.

Um IS (Índice de Seletividade) surpreendente de 16 vezes do ácido pirenochaético A indica que este ácido além de apresentar potente atividade anti - *M. tuberculosis* (CIM de 3,9 µg/mL) é de extrema inocuidade (IC₅₀ entre 125 e 62,5 µg/mL), tornando-se um candidato promissor como agente anti-tuberculose. O ácido pirenochaético A além de se apresentar como metabólito promissor, pode ser utilizado como modelo em potencial para estudo de novas drogas tuberculicidas ou tuberculostáticas.

Em relação ao emprego do MABA como método analítico para avaliação da atividade anti - *M. tuberculosis*, esta técnica, têm sido largamente utilizada na triagem de compostos com suposta atividade antimicobacteriana sejam eles

naturais (PIETRO *et al.*, 2000; JANUÁRIO *et al.*, 2002; LEAL *et al.*, 2003) ou sintéticos (De SOUZA *et al.*, 1999; De SOUZA *et al.*, 2001a; De SOUZA *et al.*, 2001b; STEPHENS *et al.*, 2001; RANDO *et al.*, 2002; De SOUZA *et al.*, 2002; ULUSOY, 2002). O emprego desta metodologia permitiu inúmeras facilidades metodológicas como facilidade no manejo, reprodutibilidade dos resultados, e principalmente o uso de micro-quantidades de extratos e compostos por ser uma micro-técnica. Este último fato é de extrema importância, pois normalmente os compostos puros são obtidos em quantidades escassas tornando inviáveis as análises por metodologias clássicas que necessitam de maior quantidade de amostras. Outras vantagens verificadas foram: rapidez nos resultados (6 dias), nenhuma interferência térmica por ser o ensaio realizado em meio líquido (não altera a constituição dos componentes termolábeis) e possibilidade de avaliar concentrações múltiplas e diversos extratos simultaneamente.

6. CONCLUSÃO

- 1- O fungo endofítico *Phomopsis stipata* 1 e 2 isolado de folhas de *Styrax camporum* e *Colletotrichum crassipes* isolado de *Casearia sylvestris*, são produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos contra o *M. tuberculosis*.
- 2- O meio contendo milho em comparação com outros meios de cultura, propiciou ao fungo *Phomopsis stipata* 2 substrato mais favorável para a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos contra o bacilo da tuberculose.
- 3- Por apresentar valor de CIM (3,9 µg/mL) e baixa citotoxicidade (IS de 16), o composto puro, ácido pirenochaético A, produzido pelo fungo endofítico codificado MC-8R isolado das raízes de *Michelia champaca*, se apresenta como candidato ou modelo em potencial para o estudo de novas drogas tuberculicidas ou tuberculostáticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170 n. 2, p. 211-224, 1994.

AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi, an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1995. p. 748.

AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi, an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1996. v. 2, p. 805.

AL-HAJJAJ, M. S.; AL-KASSIMI, F. A.; AL-MOBEIREEK, A. F.; ALZEER, A. H. Progressive rise of *Mycobacterium tuberculosis* resistance and streptomycin in Riyadh, Saudi Arabia. **Respirology**, v. 6, n. 4, p. 317-322, 2001.

ALCANO, I.E. **Fundamentals of Microbiology**. 4.ed. Redwood City: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1994. p. 421-450.

ARECHABALA, B.; COIFFARD, C.; RIVALLAND, P.; COIFFARD, L.J.; de ROECKHOLTZHAUER, Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. **J. Appl. Toxicol.**, v. 19, p. 163-165, 1999.

AZEVEDO, J. L. IN: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed). **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: 1998. cap. 4, p. 116-147.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A. Antiulceration of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Med**, v. 60, n. 1, p. 118-120, 1994.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Med**, v. 61, n. 1, p. 204-207, 1995.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentakide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **J. Nat. Prod**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Plano nacional de controle da tuberculose**. Brasília, 1999. p. 1-15.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**. Brasília, 2002. 64 p. (Série A. Normas e manuais técnicos, 148).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2005.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J Nat Prod**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacoutiaceae).** 2007. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: **Editora Argos**, Chapecó, 2001.

CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med**, v. 67, p. 1-10, 2001.

CANTREL, C. L.; LU, T.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H.; ADAMS, L. B.; FRANZBLAU, S. G. Antimycobacterial cycloartanes from *Barrichia frutescens*. **J. Nat. Prod**, v. 59, p. 1131-1136, 1996.

CARROL, G. Fungal endophytes in stems and leaves from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CASA, C. LA.; VILLEGAS, I.; LASTRA, A. DE LA; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol**, v. 71, n. 1, p. 45-53, 2000.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is a 3-NPA in some plants produced by endophytes? **J. Nat. Prod**, v. 68, n. 7, p. 1103-1105, 2005.

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

COOPER, A. M.; DALTON, D.; STEWART, A.; GRIFFIN, J.; RUSSEL, D.; ORME, I. Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene-disrupted mice. **J. Exp. Med**, v. 178, p. 2243-2247, 1993.

CORBETT, E. L.; WATT, C. J.; WALKER, N.; MAHER, D.; WILLIAMS, B. G.; RAVIGLIONE, M. C.; DYE, C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. **Arch. Intern. Med**, v. 163, p. 1009-1021, 2003.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF, 1975. p. 514-516.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **J. Clin. Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; YANG, S. S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **J. Nat. Prod**, v. 69, p. 488-498, 2006.

CUTLER, H. G.; HIMMELSBACH, D. S.; ARRENDALE, R. E.; COLE, P. D.; COX, R. D. Koninginin A: a novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. **Agric. Biol. Chem**, v. 53, n. 10, p. 2604-2611, 1989.

CUTLER, H. G.; HIMMELSBACH, D. S.; YAGEN, B.; ARRENDALE, R. F.; JACYNO, J. M.; COLE, P. D.; COX, R. H.. Koninginin B: a biologically active congener of koninginin a from *Trichoderma koningii*. **J. Agric. and Food Chem**, v. 39, n. 5, p. 977-980, 1991.

CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J.; ROSS, S. A.; EL SAYED, K.; DUGAN, F. M.; BARTLETT, M. G.; HILL, A. A.; HILL, R. A.; PARKER, S. R. Koninginin G, a

new metabolite from *Trichoderma ureoviride*. **J. Nat. Prod**, v.62, n. 1, p. 137-139, 1999.

DALCOMO, M. P.; FORTES, A.; MOTTA, R. M.; BARRETO, A. M. W.; GERHARDT, F. G. Retrospective analysis of multidrug resistant tuberculosis (MDRTB) cases treatment. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med**, v. 157, n. 3, 1998.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnol. Adv**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

DE SOUZA, A. O.; ALDERETE, J. B.; SCHIMIDT, F.; SATO, D. N.; DURÁN, N. Structure-activity relationship analysis of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenyl methanone derivatives and activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Arzneimittelforschung**, v. 49, n. 12, p. 1025-1029, 1999.

DE SOUZA, A. O.; SANTOS Jr, R. R.; FERREIRA-JULIO, J. F.; RODRIGUEZ, J. A.; MELHO, P. S.; HAUN, M.; SATO, D. N.; DURAN, N. Synthesis, antimycobacterial activities and cytotoxicity on V79 of 3-[4'-Y-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-N,N-dimethyl-3-(4-Xphenyl)-propen-1-amine derivatives. **Eur. J. Med. Chem**, v. 36, n. 10, p. 843-850, 2001a.

DE SOUZA, A. O.; SANTOS JR, R. R.; MELO, P. S.; ALDERETE, J. B.; De CONTI, R.; HAUN, M.; SATO, D. N.; DURAN, N. Antimycobacterial activity of 4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl 4-X-phenylmethanone derivatives, and their acute toxicity and cytotoxicity. **Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 871-874, 2001b.

DE SOUZA, A. O.; HEMERLY, F. P.; BUSOLLO, A. C.; MELO, P. S.; MACHADO, G. M.; MIRANDA, C. C.; SANTA-RITA, R. M.; HAUN, M.; LEON, L. L.; SATO, D. N.; DE CASTRO, S. L.; DURAN, N. 3-[4'-Bromo-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-N,N-dimethyl-3-(2-thienyl)2-propen-1-amine: synthesis, cytotoxicity and leishmanicidal, trypanocidal and antimycobacterial activities. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 50, n. 5, p. 629-637, 2002.

DREYFUSS, M. M; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. cap. 3, p. 49-80.

FALZARI, K.; ZHU, Z.; PAN, D.; LIU, H.; HONGMANEE, P.; FRANZBLAU, S.G. *In vitro* and *in vivo* activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 1447–1454, 2005.

FDHILA, F.; VALZUEZ, V.; SANCHEZ, J. L.; RIGUERA, R. R. DD-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **J. Nat. Prod**, v. 66, n. 10, 2003.

FIELDS, R.D.; LANCASTER, M.V. Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. **Am. Biotechnol. Lab.**, v.11, p.48-50, 1993.

FRIEDEN, T. R.; STERLING, T. R.; MUNSIFF, S. S.; WATT, C. J.; DYE, C. Tuberculosis. **Lancet**, v. 362, p. 887-899, 2003.

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados à *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 208 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, 2006.

GU, J. Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; MONTENEGRO, G.; YANG, D.; TIMMERMAN, B. N. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. **Planta Med**, v. 70, p. 509-514, 2004.

HALLMANN, J.; QUADT – HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HART, C. A.; BEECHING, N. J.; DUERDEN, B. I. Tuberculosis into the next century. **J. Med. Microbiol**, v. 44, p. 1-34, 1996.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycol. Res**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HIGUCHI, C. T. ***Byrsonima* spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus**

derivados. 2007. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara.

INACIO, M. L.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; ARAUJO, A. R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloesporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocaria mandiocanna* Nees (lauraceae). **Biochem. Syst. Ecol**, v. 34, n. 11, p. 822-824, 2006.

JANIN, Y, L. Antituberculosis drugs: Ten years of research. **Bioorg. Med. Chem**, v. 15, p. 2479-2513, 2007.

JANUÁRIO, A. H.; FILHO, E. R.; PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; FRANÇA, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phytother. Res**, v. 16, n. 5, p. 445-448, 2002.

JUNGES, M. J.; SCHENKKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonóides de *Casearia sylvestris* (erva de bugre). **Cad. Farm**, v.1, p. 95-101, 1985.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Michelia champaca*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 744-748, 2002.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21 st century. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 53, p. 135-148, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Diagnóstico laboratorial de microbiologia: texto e atlas colorido. 5. ed. São Paulo: **Meds**i, 2001. p. 941 – 947.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 5, p. 709-711, 2003.

KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H.J.; DRAGER, S.; SCHULZ, B. Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 1, p. 155-157, 1999.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2520-2525, 2003.

LEE, J. C.; LOBOKOVSKY, E.; STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quione dimmer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **J. Org. Chem.**, v. 61, n. 10, p. 3232-3233, 1996.

LEPTOKARYDIS, I. H.; CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; ARAUJO, Â. R.; BOLZANI, V. S.; PFENNING, L. H. Ácidos pirenochaéticos produzidos pelo fungo endofítico MC-8R isolado das raízes de *Michelia champaca*

(Magnoliaceae). In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 29., 2006.

LI, J. Y.; STROBEL, G.; HARPER, J. K. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. **Org. Lett**, v. 2, n. 6, p. 767-770, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. p. 332.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. v. 1, ed. Plantarum LTDA, p.115, 1992.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, I.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Pant. Sci**, v. 151, p. 67-73, 2000.

MASKEY, R. P.; HELMKE, E.; FIEBIG, H. H.; LAATSCH, H. Parimycin: isolation and structure elucidation of a novel cytotoxic 2,3-dihydroquinizarin analogue of gamma-indomycinone from a marine streptomycete isolate. **J. Antibiot**, v. 55, n. 12, p. 1031-1035, 2002.

MASUREKAR, P. S. IN: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. (Ed.). **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. In: Butterworth-Heinemann, Boston, p. 241-301, 1992.

MÉDECINS SANS FRONTIÈRES: <<http://www.accessmed-msf.org/campaign/tb01.shtm>>, web, 08 february 2007.

MITSCHER, A. L. **The Chemistry of Tetracycline Antibiotics**, Medicinal Research Series, v. 9, 1988.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v.66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, p. 215-234, 2000.

OKUNADE, A. L.; ELVIN-LEWIS, M. P.; LEWIS, W. H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1017-1032, 2004.

O'BRIEN, J.; WILSON, L.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

ORME, I. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 45, p. 1943–1946. 2001.

PAULI, G. F.; CASE, R. J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N. H.; FRANZBLAU, S. G. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sci.**, v. 78, p. 485-494, 2005.

PERRY, L. M. Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. Cambridge: The MIT Press, 1980. p. 154,.

PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B.; SAMALA, R.; CHEN, P.; GEARHART, J.; EINCK, L.; NACY, C.A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 968-974, 2005.

PULICI, M.; SUGAWARA, F.; KOSHINO, H. Pestalotiopsis A and B: new caryophyllenes from an endophytic fungus of *Taxus bervifolia*. **J. Org. Chem**, v.61, p. 2122-2124, 1996.

RANDO, D. G.; SATO, D.N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C.Q.F.; Do

AMARAL, A. T.; FERREIRA, E. I.; TAVARES, L. C. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. **Bioorg. Med. Chem**, v. 10, n. 3, p. 557-560, 2002.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de Tuberculose. **Manual de orientação para coleta de escarro, e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose**. São Paulo, 2002. 26 p.

SATO, D.N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene da Luciferase**. 2003. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R. A. P. S. Guaçatonga (*Casearia sylvestris*): aspectos botânicos das plantas, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. **Na. Farm. Quím. São Paulo**, v. 19, n. 1, p. 73-81, 1979.

SEKIGUCHI, J. I.; AKIYAMA, T. M.; KOPÉC, E. A.; ZWOLSKA, Z.; KIRIKAE, F.; TOYOTA, E.; KOBAYASHI, I.; MORITA, K.; KUDO, K.; KATO, S.; KURATSUJI, T.; MORI, T.; KIRIKAE, T. detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol**, v.45, n. 1, p.179-192, 2007.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the *Casearia sylvestris*. **Pharm. Biol.**, v. 38, n. 2, p. 112-119, 2000.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. Associados com espécies vegetais de Cerrado.** 2005. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SORDI, R. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados das folhas de *Styrax camporum* Poh (Styracaceae).** 2007. (Dissertação Mestrado em Química) - Instituto de Química, UNESP, Araraquara,.

STEPHENS, C. E.; TANIOUS, F.; KIM, S; WILSON, W. D.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; FRANZBLAU, S. G.; BOYKIN, D. W. Diguanidino and “reversed” diguanidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. **J. Med. Chem**, v. 44, n. 11, p. 1741-1748, 2001.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; TORCZYNSKI, R.; BOLLON, A. *Acremonium* sp. – a lecinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). **Plant Sci**, v. 128, p. 97-108, 1997.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R. *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology-UK**, p. 440, 1996.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich search of functional metabolites. **Nat. Prod**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; MEENT, M. V.; RHEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

ULUSOY, N. Synthesis and antituberculosis activity of cycloalkyllidenehydrazide and 4-aza-1-thiaspiro[4.5]decan-3-one derivatives of imidazo[2,1-b]thiazole. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 7, p. 565-571, 2002.

VIMALA, R.; NAGARAJAN, S.; ALAM, M.; SUSAN, T.; JOY, S. Antiinflammatory and antipyretic activity of *Michelia champaca* Linn., (white variety), *Ixora brachiata* Roxb. and *Rhynchosia cana* (Willd.) D.C. flower extract. **Indian. J. Exp. Biol**, v.35, p. 1310-1314, 1997.

WAGENAR, M.M.; CLARDY, J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimmers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1006-1009, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing**. Geneva, 2007. 270 p.

YAJKO, D. M.; MADEJ, J. J.; LANCASTER, M. V.; SANDERS, C. A.; CAWTHON, V. L.; GEE, B.; BABST, A.; HADLEY, K. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2324-2327, 1995.

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEM, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.

ZUMIA, A.; GRANGE, J. M. Multidrug-reistance tuberculosis-can the tide be turned? **Lancet Infect. Dis**, v. 1, p. 199-202, 2001.