

VITOR ROMITO DE MENDONÇA

**ESTUDO BIOMONITORADO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO
FUNGO *Fusarium oxysporum***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M539e
2011

Mendonça, Vitor Romito de, 1985-

Estudo biomonitorado do extrato acetato de etila do fungo
Fusarium oxysporum / Vitor Romito de Mendonça. – Viçosa,
MG, 2011.

x, 53f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 43-53

1. *Fusarium oxysporum*. 2. Agentes antibacterianos.
3. Metabólitos. 4. Extração por solventes. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5677

VITOR ROMITO DE MENDONÇA

**ESTUDO BIOMONITORADO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO
FUNGO *Fusarium oxysporum***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 18 de julho de 2011.

Prof^a. Deusanilde de Jesus Silva

Dr^a. Maria Esther Ricci da Silva

Prof. Gaspar Diaz Muñoz
(Coorientador)

Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira

Prof^a. Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

*A meus pais, Cleotônio e Maria Helena,
por tudo que representam na minha
vida, pelo amor, amizade e confiança,
Ao meu irmão Vagner, pelo
companheirismo e amizade de uma
vida,
E à minha esposa Marcela, pelo amor,
amizade, companheirismo e respeito.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

À professora Dra. Marisa Alves Nogueira Diaz, pela orientação.

Ao professor Dr. Gaspar Diaz Muñoz pela co-orientação.

A FAPEMIG e a CAPES pela ajuda financeira.

Ao núcleo de Biomoléculas, casa 21, Vila Gianet, UFV e a Dra. Esther pela operação e obtenção do cromatograma e espectro de massas.

Aos meus colegas de laboratório, pela ajuda nos experimentos e companheirismo.

À professora Dra. Andréa Ribon, pelo fornecimento das cepas de bactérias utilizadas nos experimentos.

Ao professor Dr. Onkar Dhingra pela gentileza de ceder o fungo de trabalho.

Aos meus amigos de Cachoeiro, Carlos, Léo e Ulisses, pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus sogros, Clara e Jairo, e aos meus cunhados, Mateus e Milena, pelo carinho que me acolheram.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

E principalmente, aos meus pais, Cleotônio e Maria Helena, ao meu irmão Vagner e à minha esposa Marcela, pois sem eles, este trabalho não teria continuidade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1Produtos naturais.....	4
2.2Produtos naturais provenientes de fungos.....	8
2.3 <i>Fusarium oxysporum</i>	11
2.4Mastite bovina.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Cultivo do fungo.....	17
3.2 Obtenção dos extratos.....	17
3.3 Ensaio de atividade antibacteriana.....	18
3.4 Ensaio de purificação biomonitorada.....	19
3.5 Ensaio de concentração inibitória mínima.....	24
3.6 Ensaio de partição com água em pH básico e ácido da fração F _{p6.2}	24
3.7 Caracterização do composto F _{p6.2}	25
3.7.1 Varredura na região do UV-vis.....	25
3.7.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Atividade biológica dos extratos.....	27
4.2Biomonitoramento.....	27
4.3Ensaio de partição com água em pH básico e ácido para F _{p6.2}	30
4.4Espectroscopia no ultravioleta e visível.....	31
4.5Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas para a fração F _{p6.2}	32
4.6 Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono para F _{p6.2}	34

4.7	Teste de concentração inibitória mínima para $F_{p6.2}$	35
5	DISCUSSÃO.....	37
6	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Drogas baseadas em produtos naturais (PN) lançadas mercado entre os anos de 2005-2007.....	7
Tabela 2: Relação grupo, fração e massa da cromatografia em coluna da fração F _{f3}	21
Tabela 3: Relação grupo, fração e massa da cromatografia em coluna do extrato do meio líquido.....	23
Tabela 4: Concentração dos eluentes usados durante o CLAE/EM para a primeira condição.....	25
Tabela 5: Concentração dos eluentes usados durante CLAE/EM para a segunda condição.....	26
Tabela 6: Teste de atividade antibacteriana para os extratos.....	27
Tabela 7: Valores de concentração inibitória mínima (µg/mL) obtidos para a fração F _{p6.2}	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Patentes de produtos naturais na indústria farmacêutica mundial.....	6
Figura 2: Estrutura química do micofelonato de sódio e da rosuvastatina	10
Figura 3: Estrutura de algumas micotoxinas isoladas de <i>Fusarium oxysporum</i>	13
Figura 4: Fluxograma de obtenção dos extratos do micélio e do meio de cultura.....	18
Figura 5: Fluxograma de purificação para a fração do filtrado.....	20
Figura 6: Fluxograma de purificação para a fração do precipitado.....	22
Figura 7: Fluxograma de purificação para o meio líquido.....	23
Figura 8: Teste antibacteriano para as frações do micélio.....	28
Figura 9: Teste de atividade para as frações F _{f3}	28
Figura 10: Teste qualitativo para as frações F _{p6.2} e F _{p7}	29
Figura 11: Teste antibacteriano para as frações do extrato do meio líquido.....	30
Figura 12: Ensaio de partição com NaOH e HCl.....	31
Figura 13: Gráfico de varredura no UV-Vis (200-700 nm) para a amostra F _{p6.2}	32
Figura 14: Cromatograma do CLAE da fração F _{p6.2} para a primeira condição.....	33
Figura 15: Cromatograma do CLAE da fração F _{p6.2} para a segunda condição.....	33
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H da fração F _{p6.2} em CDCl ₃	34
Figura 17: Espectro de RMN de ¹ H da fração F _{p6.2} em CDCl ₃	35

Figura 18: Foto do teste de concentração inibitória mínima do composto
F_{p6.2}.....

36

RESUMO

MENDONÇA, Vitor Romito de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Estudo biomonitorado do extrato acetato de etila do fungo *Fusarium oxysporum***. Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz e Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Fusarium oxysporum é um fungo fitoparasita facultativo, encontrado na rizosfera de várias plantas. Essa espécie é responsável por atacar diversas plantas do agronegócio brasileiro, causando grandes perdas devido à produção de micotoxinas. Contudo, ele pode produzir outros metabólitos que possam ser de interesse humano. O presente trabalho procurou investigar a ação antibacteriana de metabólitos produzidos por *Fusarium oxysporum*. Para isso, o fungo foi crescido em meio líquido, caldo de batata e dextrose, durante 10 dias. Extratos orgânicos foram obtidos tanto do micélio quanto do meio líquido e atividade antibacteriana foi avaliada. Os extratos que apresentaram atividade foram purificados por biomonitoramento. Do extrato do micélio foi isolada uma substância de intensa coloração vermelha em forma de cristais de agulha que apresentou atividade antibacteriana ($31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas determinou-se sua massa molecular [M+H] de 419,2646. Varredura de espectroscopia no ultravioleta-visível mostrou que a substância apresenta absorção máxima em 259 e 520 nm, respectivamente. Contudo, espectros de RMN de hidrogênio e de carbono não puderam ser obtidos com precisão devido à baixa solubilidade da substância em solventes deuterados. O ensaio de partição demonstrou que o composto apresenta solubilidade em solvente orgânico quando em meio ácido e forma uma emulsão quando em meio básico, sugerindo que o mesmo sofre ionização na presença de base. Técnicas de cristalografia serão posteriormente efetuadas para se determinar a estrutura da substância. Os resultados obtidos sugerem uma potencial utilização da substância como biosensor devido a mudança de pH e a sua atividade antibacteriana, assim como corante devido a sua intensa coloração.

ABSTRACT

MENDONÇA, Vitor Romito de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Biomonitored study of the ethyl acetate extract of the fungus *Fusarium oxysporum***. Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Gaspar Diaz Muñoz and Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Fusarium oxysporum is a fungal plant parasites optional, found in the rhizosphere of various plants. This species is responsible for attacking several plants of the Brazilian agribusiness, causing large losses due to mycotoxin production. However, it can produce other metabolites that may be of human interest. This study aimed to investigate the antibacterial activity of metabolites produced by *Fusarium oxysporum*. For this, the fungus was grown in liquid medium, potato dextrose broth for 10 days. Organic extracts were obtained from both the mycelium and the liquid medium and antibacterial activity was evaluated. The extracts that showed activity were purified by biomonitoring. Extract of the mycelium was isolated a substance of intense red color in the form of needle crystals which showed antibacterial activity (31.25 µg.mL⁻¹). Using liquid chromatography coupled to mass spectrometry we determined its molecular mass [M + H] 419.2646. Scanning ultraviolet-visible spectroscopy showed that the substance presents maximum absorption at 259 and 520 nm, respectively. However, NMR spectra of hydrogen and carbon could not be obtained accurately because of the low solubility of the substance in deuterated solvents. Partition test showed that the compound has solubility in organic solvent when in an acidic medium and forms an emulsion when in basic medium, suggesting that it undergoes ionization in the presence of base. Crystallographic techniques will then be made to determine the structure of the substance. These results suggest a potential use of the substance as a biosensor due to change of pH and its antibacterial activity, as well as a dye due to its intense color.

1 INTRODUÇÃO

Muitos compostos orgânicos utilizados pelo homem ao longo da história recente são provenientes de fontes naturais. No tocante à medicina e farmacologia, a penicilina foi um dos compostos que ocasionaram uma revolução nestas áreas. Descoberta pelo bacteriologista e médico Alexander Fleming, isolada a partir fungo *Penicillium notatum*, o uso da penicilina como antibiótico constituiu o chamado “milagre medicinal” das décadas de 40 e 50 (Butler e Buss, 2006). Além do grande avanço para a saúde humana, esta descoberta também impulsionou no mundo a pesquisa de produtos naturais com atividade biológica.

Contudo, o uso incorreto de antibióticos tem levado a uma pressão seletiva grande sobre os micro-organismos. Essa pressão, muito decorrente do mau uso dos antibióticos pela população, ocasionou a seleção de bactérias resistentes a várias classes de antibióticos. Essas são denominadas de bactérias multi-droga resistentes (Pfeifer *et al.*, 2010). Um exemplo desse tipo de bactéria são as capazes de sintetizar a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC, mesma sigla que a mídia brasileira denomina o micro-organismo), que confere resistências a vários agentes antimicrobianos, como carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Dienstmann *et al.*, 2010). Segundo a Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), 135 pessoas apresentaram infecção por esse tipo de organismo, dos quais 15 levaram a óbitos. Os registros foram notificados até o dia 15 de outubro de 2010, em hospitais públicos e privados do Distrito Federal. Outro exemplo aconteceu na Alemanha, onde várias pessoas sofreram infecção de uma cepa de *Escherichia coli* resistente provenientes de legumes contaminados, sendo que 25 mortes foram confirmadas, além de ter causado perda econômica (cerca de US\$ 4,05 mi) para os produtores da região (Heath, 2011).

Não somente infecções causadas por micro-organismos resistentes a vários antibióticos afetam a saúde humana, mas a animal também. No caso da pecuária leiteira, um dos principais problemas é a mastite, que é uma inflamação das glândulas mamárias de vacas. Segundo a literatura especializada, as infecções bacterianas são as principais causas desta

enfermidade (Tozzetti *et al.*, 2008). Essa injúria é um dos principais fatores de perda econômica referentes ao produtor e à indústria de laticínios. A doença influencia na produtividade e qualidade do leite, devido a mudanças no número de células somáticas e no padrão de constituintes do leite, como: redução de cálcio, de fósforo, de proteínas e de gorduras totais e lactose, além de aumento de sódio e de cloro (Zafalon *et al.*, 2008). Além disso, os custos com tratamento dos animais infectados, o abate de animais com a doença na fase crônica e prevenção da doença são grandes (Holanda Júnior *et al.*, 2005). Outro fator que determina a qualidade do leite é a presença de traços de antibióticos (Barkema *et al.*, 2006), sendo que o uso indiscriminado tem gerado uma pressão seletiva grande sobre essas bactérias. Diversos estudos encontrados na literatura científica mostram que cepas isoladas de bovinos acometidos de mastite são resistentes a vários antibióticos comerciais (Nunes *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008; Fleβer *et al.*, 2011). Como Minas Gerais é um dos principais produtores de leite do país, a busca pelo controle e tratamento dessa doença apresenta um enfoque sócio-econômico importante para a região.

Os micro-organismos representam uma fonte quase inexplorada no campo de produtos naturais devido ao pouco conhecimento acerca dos mesmos e a grande diversidade metabólica que apresentam. Dados na literatura científica mostram a importância dos mesmos na descoberta de compostos com atividade biológica e farmacológica (Cragg e Newman, 2007). Sabe-se que os micro-organismos representam a principal fonte de compostos com potencial ação antibacteriana. Diversas classes de antimicrobianos foram isolados de fungos e de bactérias, tais como: β -lactâmicos, cefalosporinas, peptídeos macrolídeos (Fischbach, 2009). Assim, a pesquisa de produtos antibacterianos proveniente de micro-organismos torna-se muito interessante.

Os fungos do gênero *Fusarium* são importantes fitopatógenos, mas alguns são de ocorrência livre no ambiente. Embora, diversos estudos são voltados para o controle do crescimento em hospedeiros, vários trabalhos mostram que o gênero apresenta potencial para produção de compostos de interesse no campo medicinal e industrial, tais como: corantes (Nagia e El-Mohammed, 2006), antifúngicos (Jayasinghe *et al.*, 2006), antibacteriano

(Takahashi *et al.*, 2008), anticâncer (Chakravarthi *et al.*, 2008), bem como uso desses micro-organismos para biotransformação (El-Rafie *et al.*, 2010).

Buscando ampliar os conhecimentos sobre metabólitos secundários provenientes de micro-organismos e apresentar uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade biológica, o presente trabalho teve como objetivos:

- Purificação e isolamento biomonitorado de compostos produzidos pelo fungo *Fusarium oxysporum* com atividade antibacteriana;
- Identificação do(s) composto(s);
- Testes com os compostos puros para atividade antibacteriana frente a bactérias isoladas de mastite bovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produtos naturais

Produtos naturais, também denominados de metabólitos secundários, são compostos orgânicos produzidos por diversos organismos, mas de distribuição restrita a um organismo ou comum a um pequeno número de organismos próximos na sua filogenia.

Diferentemente dos metabólitos primários (carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos), os produtos naturais não são compostos essenciais para a sobrevivência dos organismos. Contudo, apresentam um papel importante na adaptação dos mesmos, uma vez que são oriundos da resposta do indivíduo a pressões do meio externo (Leite, 2009).

Partindo de precursores bio-orgânicos simples, como acetato, malonato e ácido chiquímico, a ação das enzimas das diferentes rotas biossintéticas de metabólitos secundários proporciona produtos de grande diversidade com finalidades biológicas distintas (Pieters e Vlietinck, 2005; apud Yuliana *et al.*, 2011). Assim, muitos compostos naturais apresentam efeitos biológicos em humanos e outras espécies. Essa sentença pode ser explicada pela co-evolução de comunidades biológicas: organismos que interagem próximos com outros desenvolvem compostos que podem influenciar na fisiologia de comunidades vizinhas. Dada a similaridade entre aspectos fisiológicos de humanos e de outras espécies, seria fato que esses compostos apresentassem efeitos biológicos no homem (Ji *et al.*, 2010). Compostos sintetizados por plantas que atuam em herbívoros são usados pelo homem como laxantes, cardiotônicos e relaxantes musculares nos dias atuais (Briskin, 2000; Ji *et al.*, 2010).

Portanto, os produtos naturais consistem em uma grande premissa para a busca por compostos de interesse humano. Esses apresentam características bastante favoráveis à descoberta e ao desenvolvimento de novas substâncias com interesse farmacêutico, devido a sua elevada diversidade estrutural e a sua especificidade bioquímica (Clardy e Walsh, 2004; Monneret, 2010). Apresentam grande número de centros quirais, elevado número de átomos de oxigênio em vez de nitrogênio, enxofre e

halogênio que são encontrados com mais frequência em sintéticos, além de ro de doadores e receptores de hidrogênio solvatados considerável (Yuliana *et al.*, 2011). Outra premissa importante para a pesquisa de produtos naturais de interesse ao homem é que muitas classes de produtos naturais apresentam mecanismos de ação conhecidos. Essas características levaram ao desenvolvimento de compostos baseados em produtos naturais obtidos pela síntese clássica e química combinatorial, bem como de compostos semissintéticos que tinham produtos naturais como protótipos (Cragg e Newmann, 2007).

O ácido acetil-salicílico é um exemplo de composto derivado de produtos naturais. Essa é uma droga semissintética baseada no ácido salicílico extraído do salgueiro. Estudos etnobotânicos mostraram que durante centenas de anos o chá de salgueiro era usado em combate ao reumatismo e às dores de cabeça. Entretanto, quando pacientes ingeriram o ácido salicílico apresentaram náuseas. Uma modificação estrutural (acetilação da hidroxila do grupamento fenol) evitou esse efeito, levando a obtenção do ácido acetil-salicílico, podendo, assim, ser administrado oralmente. Após a absorção, o composto é transformado em ácido salicílico, que é o metabólito que atua como analgésico (Rhiston, 2008).

A investigação de produtos naturais como fontes para a terapêutica humana atingiu o seu auge na indústria farmacêutica ocidental durante as décadas de 1970 e 1980, o que resultou numa busca por moléculas não sintéticas. Das 877 pequenas moléculas introduzidas no mercado, cerca da metade (49%) são produtos naturais, derivado semissintético ou compostos sintéticos baseado em produtos naturais (Koehn E Carter, 2005). Ainda hoje, os produtos naturais apresentam um papel relevante na aprovação de fármacos no mundo. A análise de um quadro estatístico de patentes aprovadas ao redor do mundo mostra que os produtos naturais apresentam ainda um papel fundamental. A Figura 1 mostra um quadro de patentes envolvendo produtos naturais no período entre 1984-2003 (Koehn e Carter, 2005). Em adição, um total de 13 novas drogas que são produtos naturais ou derivados destes foram aprovadas para o comércio mundial entre os anos de 2005 e 2007 (Tabela 1), dos quais cinco são produtos naturais e oito são seus derivados. Alguns desses, apesar de serem classificados como produtos

naturais, são obtidos em escala industrial por síntese total (ziconotídeo, exanatídeo). Além disso, os já citados ziconotídeo, exanatídeo, mais retapamulina, trabectedina e ixabepilona são os primeiros membros de uma nova classe de drogas (Butler, 2008).

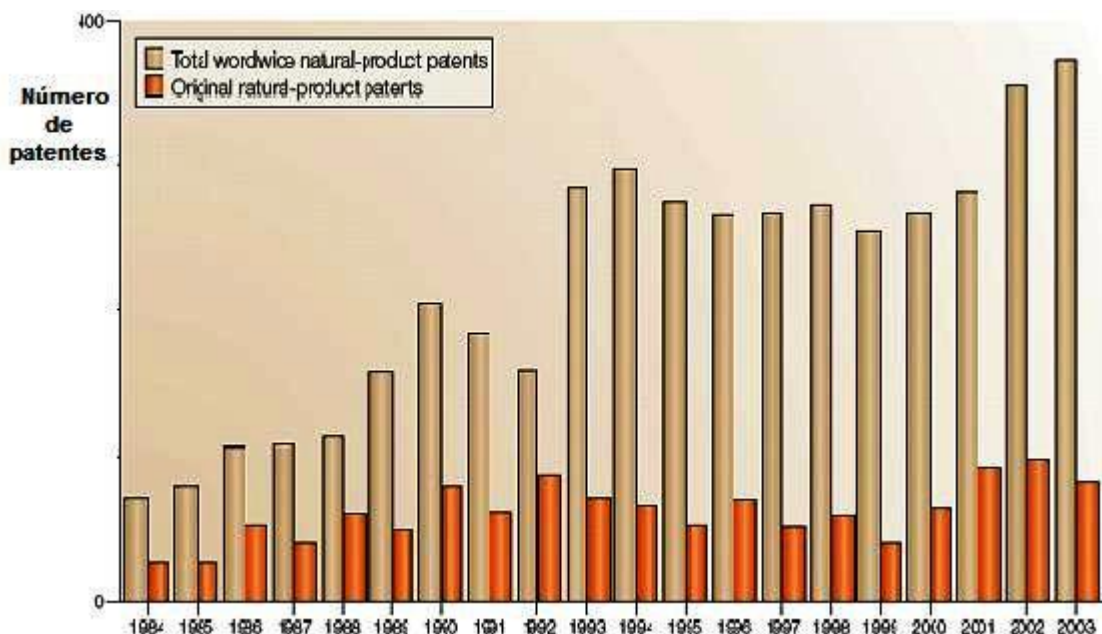


Figura 1: Patentes de produtos naturais na indústria farmacêutica mundial. O gráfico em salmão mostra o total de patentes obtidas no mundo para pequenas moléculas com fins farmacêuticos. O gráfico em laranja demonstra o número de patentes originadas de produtos naturais. Adaptado de Koehn e Carter (2005).

Os produtos naturais apresentam, contudo, pontos negativos para o desenvolvimento de compostos com interesse farmacêutico, tais como: dificuldade de acesso e demanda, já que alguns organismos são de ambientes restritos, além de alguns produzem metabólitos potencialmente ativos em baixas concentrações; demora no desenvolvimento de estudos relacionados aos produtos naturais; a própria alta diversidade estrutural, que é um fator positivo, também é um entrave, pois dificulta no processo de determinação estrutural; a presença de sinergismo, pois, assim como é uma vantagem para o uso de extratos, é, ao mesmo tempo, um empecilho para a purificação das moléculas bioativas; além de dificuldades quanto ao processo de direitos intelectuais e patentes em outras partes do globo. Esses aspectos, juntamente

com a demanda do desenvolvimento de novos protótipos para medicamentos levaram ao declínio no interesse por produtos naturais pela indústria farmacêutica durante a última década do século 20 (Harvey, 2008; Li e Vederas, 2009).

Tabela 1. Drogas baseadas em produtos naturais (PN) lançadas no mercado entre os anos de 2005-2007

Ano	Nome genérico (nome comercial)	Composto	Classificação	Área de atuação
2005	Dronabinol/canabinol (Sativex®)	Dronabinol/canabinol	PN	Dor
2005	Fumagilina (Flisint®)	Fumagilina	PN	Antiparasitário
2005	Doripenemo (Finibax®/Doribax™)	Tienamicina	PN derivado	Antibacteriano
2005	Tigeciclina (Tygacil®)	Tetraciclina	PN semissintético	Antibacteriano
2005	Ziconotida (Prialt®)	Ziconitida	PN	Dor
2005	Zotarolimos (Endeavor™)	Sirolimus	PN semissintético	Disfunção Cardiovascular
2006	Anidulafugina (Eraxis™/Ecalta™)	Equinocadina	PN semissintético	Antifúngico
2006	Exenatida (Byetta™)	Exenatida	PN	Diabetes
2007	Lisdexamfetamina (Vyvanse™)	Anfetamina	PN derivado	ADHD
2007	Retapamulina (Altobax™/Altargo™)	Pleuromutilina	PN semissintético	Antibacteriano
2007	Tensirolimus (Torisel™)	Sirolimus	PN semissintético	Oncológico
2007	Trabectedina (Yondelis™)	Trabectedina	PN	Oncológico
2007	Ixabepilona (Ixempra™)	Epotilona	PN semissintético	Oncológico

Logo, o desenvolvimento da química combinatória, juntamente com o de técnicas para testes direcionados, como *Highthrough-screening* (HTS), que permitiu uma triagem *in vitro* de uma biblioteca de compostos alvo-específico e o estudo do metaboloma de organismos biológicos, que se tornou uma ferramenta útil para a verificação do mecanismo de ação e de possíveis efeitos tóxicos, acabaram por resgatar o estudo dos produtos naturais (Galloway *et al.* 2010, Yuliana *et al.*, 2011). Exemplos recentes mostraram que mais de 100 compostos derivados de produtos naturais (tendo como principais fontes os

metabólitos de vegetais e micro-organismos) estão sendo testados em ensaios pré-clínicos e clínicos, tendo como alvo, principalmente, o câncer e as doenças infecciosas (Harvey 2008).

2.2 Produtos naturais provenientes de fungos

A natureza tem sido fonte de agentes medicinais por milhares de anos e continua sendo uma abundante fonte de novos quimiotipos e farmacóforos. Menos de 1% das bactérias e de 5% das espécies de fungo são conhecidos e o potencial de novas fontes microbianas parece ilimitado (Cragg e Newman, 2007).

Fungos endofíticos, que habitam tecidos internos de plantas sem causar-lhes danos, são uma promissora fonte de produtos naturais bioativos com interesse para as aplicações na medicina ou agroquímica (Wang *et al.*, 2011). Além desses, fungos de ambientes marinhos também apresentam uma promissora fonte de novos compostos bioativos, apesar do pouco conhecimento sobre o papel ecológico dos mesmos (Imhoff *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstraram que fungos isolados de macro-organismos, como esponjas e algas, apresentam compostos bioativos (Zhang *et al.*, 2009, Paz *et al.*, 2010). Rateb e Ebel (2011) listaram 690 pequenas moléculas isoladas de fungos marinhos entre o período de 2006 e meado de 2010, sendo que metade delas pertence à classe dos policetídeos.

Considerando a diversidade metabólica de um número limitado de espécies de fungos utilizados comercialmente e a diversidade ainda não explorada, os fungos representam uma vasta fonte de pesquisa para novos fármacos e outros compostos de interesse (Jin *et al.*, 2010). Um exemplo clássico de moléculas com atividade biológica provenientes destes micro-organismos são os compostos com ação antibiótica. Mais de dois terços de antimicrobianos usados no tratamento para humanos são provenientes de fontes microbiológicas. São fenótipos que resultaram da mutação e pressão natural e muitas classes apresentam mecanismos de ação bastante claros (Fischbach, 2009).

A introdução de fármacos provenientes de substâncias isoladas de micróbios iniciou-se nas décadas de 1930 e 1940, devido às pesquisas envolvendo a penicilina, o que resultou num decréscimo de óbitos decorrentes

de infecções bacterianas durante essa época, representando uma revolução na medicina ocidental. Assim, os antibióticos foram considerados “drogas milagrosas” e os anos seguintes resultaram na descoberta e desenvolvimento das principais classes de antibióticos conhecidos (Butler e Buss, 2006; Saleem *et al.*, 2009). Infelizmente, o uso indiscriminado e indevido de antibióticos nos anos seguintes levou a uma pressão seletiva sobre os micro-organismos-alvo, gerando a seleção de cepas resistentes, que apresentam diversos mecanismos para contornar essa pressão (Pfeifer *et al.*, 2010; Simons *et al.*, 2010).

O gênero *Penicillium* é conhecido na literatura por apresentar vários compostos identificados com atividade biológica que se transformaram em produtos de interesse, como a citada penicilina, (Saleem *et al.*, 2009). Segundo Chin e colaboradores (2006), dois produtos extraídos do fungo *Penicillium brevicompactum*, ácido micofenólico e mevastatina, são protótipos para a síntese do micofenolato de sódio e rosuvastatina de cálcio, respectivamente (Figura 2). O primeiro é o princípio ativo do medicamento Myfortic[®], utilizado por pacientes recém-transplantados (principalmente, transplante de rim) como imunossupressor. Já o segundo, utilizado no controle dos níveis de colesterol, é o princípio ativo do Crestor[®].

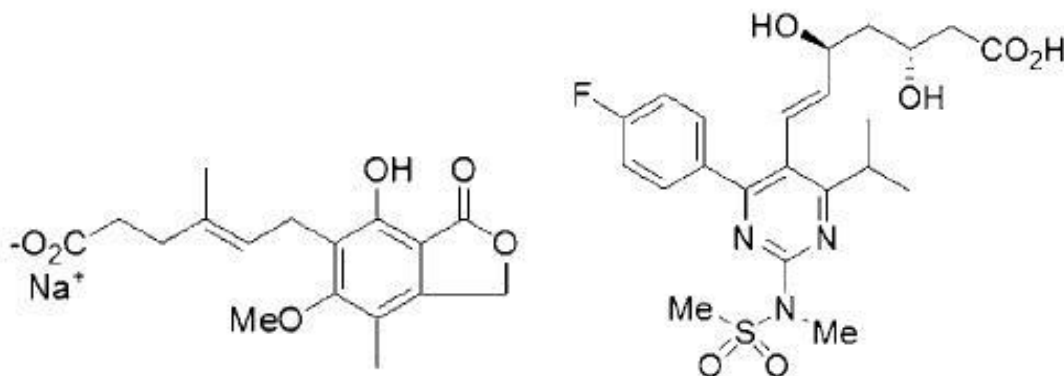


Figura 2: Estrutura química do micofelonato de sódio e da rosuvastatina.

Estudos *in vitro* mostraram que compostos bioativos do gênero *Penicillium* apresentam grande potencial de atividade biológica. Exemplos como o alcalóide Fumiquinazolina F, isolado do fungo *Penicillium corylophilum*, que também foi encontrado em algumas espécies de *Aspegillus*, apresentou atividade biológica contra isolados de *Staphylococcus aureus*, em baixas concentrações (Silva *et al.*, 2004).

Takahashi e colaboradores (2008) realizaram testes de atividade antimicrobiana de extratos provenientes de treze espécies de fungos isolados do solo do cerrado brasileiro. Dos extratos que apresentaram atividade, os obtidos de *Penicillium sclerotium* e de *P. simplicimum* apresentaram melhor ação antibacteriana. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas mostrou a presença de quatro compostos: esclerotionina, isocromofilina, pencolideo e ácido penicílico. Esses, segundo os autores, são descritos na literatura pela atividade antibiótica.

Algumas cumarinas produzidas por fungos são de relevância para a medicina. Um exemplo é a aflatoxina, que é um potente agente carcinogênico e mutagênico em diversos órgãos. Entretanto, a 7-amino-4-metilcumarina, isolada do extrato da cultura do fungo endofítico *Xylaria* sp., apresentou um amplo espectro antibacteriano e antifúngico (Liu *et al.*, 2008).

Zheng e colaboradores (2006) isolaram cinco epiditiodioxopiperazinas do fungo *Bionectra byssicola*, sendo que quatro desses, bionectina A e B e verticilina D e G, apresentaram atividade antibacteriana frente aos isolados de *S. aureus* metilciclina e quinolonas resistentes, sendo que a verticilina G foi a mais ativa com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 3 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

2.3 *Fusarium oxysporum*

Os fungos do gênero *Fusarium* têm ampla distribuição geográfica, apresentando espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes. Ocorre, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas. Algumas espécies têm íntima associação com os hospedeiros sem causar danos, sendo, portanto, endofíticos, enquanto que outras são importantes fitoparasitas, causadores de doenças em vegetais, como a giberela ou fusariose em cereais (Desjardins, 2006; Osborne e Stein, 2007).

Este gênero inclui espécies que produzem uma ampla diversidade de metabólitos secundários, alguns dos quais são de interesse para a saúde humana, principalmente em pacientes imunossuprimidos (Desjardins, 2006). Além disso, membros deste gênero também podem causar doenças em animais, seja devido à infecção propriamente ou em decorrência de compostos secretados por estes organismos (Desjardins e Proctor, 2007; Avalos e Estrada, 2010).

Dentre os compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos destacam-se as micotoxinas, que compreendem um grupo de compostos com características químicas diversas e que atuam prejudicando outros indivíduos. O gênero *Fusarium* é um dos mais importantes produtores de micotoxinas no mundo. Esses metabólitos secundários apresentam grande relevância na saúde animal e humana, devido à alta toxicidade de alguns representantes, além de ocasionar perdas econômicas, como a contaminação de grãos e cereais por esses compostos (Gutleb *et al.*, 2002; Proctor *et al.*, 2008).

Segundo Desjardins e Proctor (2007), as principais micotoxinas produzidas por espécies deste gênero são: tricotecenos, que atuam, entre outras formas, inibindo a síntese de proteínas ribossomais; fumonisinas, atuantes na inibição do metabolismo de esfingolipídeos, devido a sua semelhança estrutural, podendo, assim, causar danos em células do sistema nervoso; zearelona, uma micotoxina estrogênica não-esteroidal que está associada à síndrome estrogênica em suínos e animais experimentais; ciclopeptídeos não-ribossomais, como beuveracina e eniantinas, com

atividades antibióticas (devido a sua capacidade ionófora), de baixa a moderada toxicidade em animais e plantas.

Apesar de muitos dos metabólitos produzidos por esses fungos serem danosos a saúde, alguns desses compostos são de baixa toxicidade e poderiam apresentar implicações biotecnológicas (Avalos e Estrada, 2010). Estudos presentes na literatura específica mostram compostos de interesse para a medicina podem ser obtidos por fungos deste gênero. Exemplos como o paclitaxel, um composto semissintético produzido a partir de um metabólito produzido por plantas do gênero *Taxus*, que fora usado como antitumoral, mas a sua produção foi paralisada (Monneret, 2010). Essa molécula foi obtida de cepas *F. solani* isolados de *Taxus celebica*, porém em uma concentração baixa (Chakravarthi *et al.*, 2008).

A espécie *Fusarium oxysporum* é um parasita facultativo de vegetais, ou seja, possui ambos os mecanismos de alimentação: biotrófico e necrotrófico. É responsável pela doença conhecida como murcha de fusarium, assim como o brotamento de raízes pré-emergentes e podridão de mudas pós-emergentes. Esse é um fungo comum na rizosfera de várias plantas, sendo que a maioria das espécies são saprófitas vivendo em substratos orgânicos (Steinkellner *et al.*, 2008).

As formas patogênicas apresentam alto nível de especificidade pelo hospedeiro e são classificados de acordo com a sua habilidade de causar doença em um hospedeiro ou um grupo de hospedeiros. Contudo muitos isolados do solo não são patogênicos. A diferença entre as formas patogênicas ou não está apenas na observação da colonização do hospedeiro (Édel *et al.*, 2001). Mais de 150 formas especiais de *F. oxysporum* foram relatadas como patógenos de plantas em todo mundo (Baayen *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2009). No Brasil, esta espécie ataca várias culturas do agronegócio, como feijão e algodão, ocasionando perdas econômicas devido à presença de micotoxinas e, conseqüentemente, queda da qualidade do produto (Cândida *et al.*, 2009; Couto *et al.*, 2009).

Diversos metabólitos secundários já foram isolados desta espécie. Destacam-se as micotoxinas do grupo dos tricotecenos e das fumonisinas devido à relevância para saúde (Gutleb *et al.*, 2002; Desjardins, 2006). Outras pesquisas envolvem bases genéticas para a rota metabólica das diferentes

fumonisin, como meio de reprimir a produção destas substâncias (Proctor *et al.*, 2008). Além desses, destacam-se também os ciclopeptídeos beuvaricina e enantianina, em que diversos trabalhos mostraram atividade antibacteriana. Isso, segundo a literatura, devido às características de quelante de cátions e ionófora (Desjardins e Proctor, 2007; Wang *et al.*, 2011). Já a beuvaricina apresentou atividade antiangiogênica de células HUVEC-2 em concentrações subletais, além de ser tóxica para linhagens de células cancerosas de pulmão e pâncreas (Zhan *et al.*, 2007).

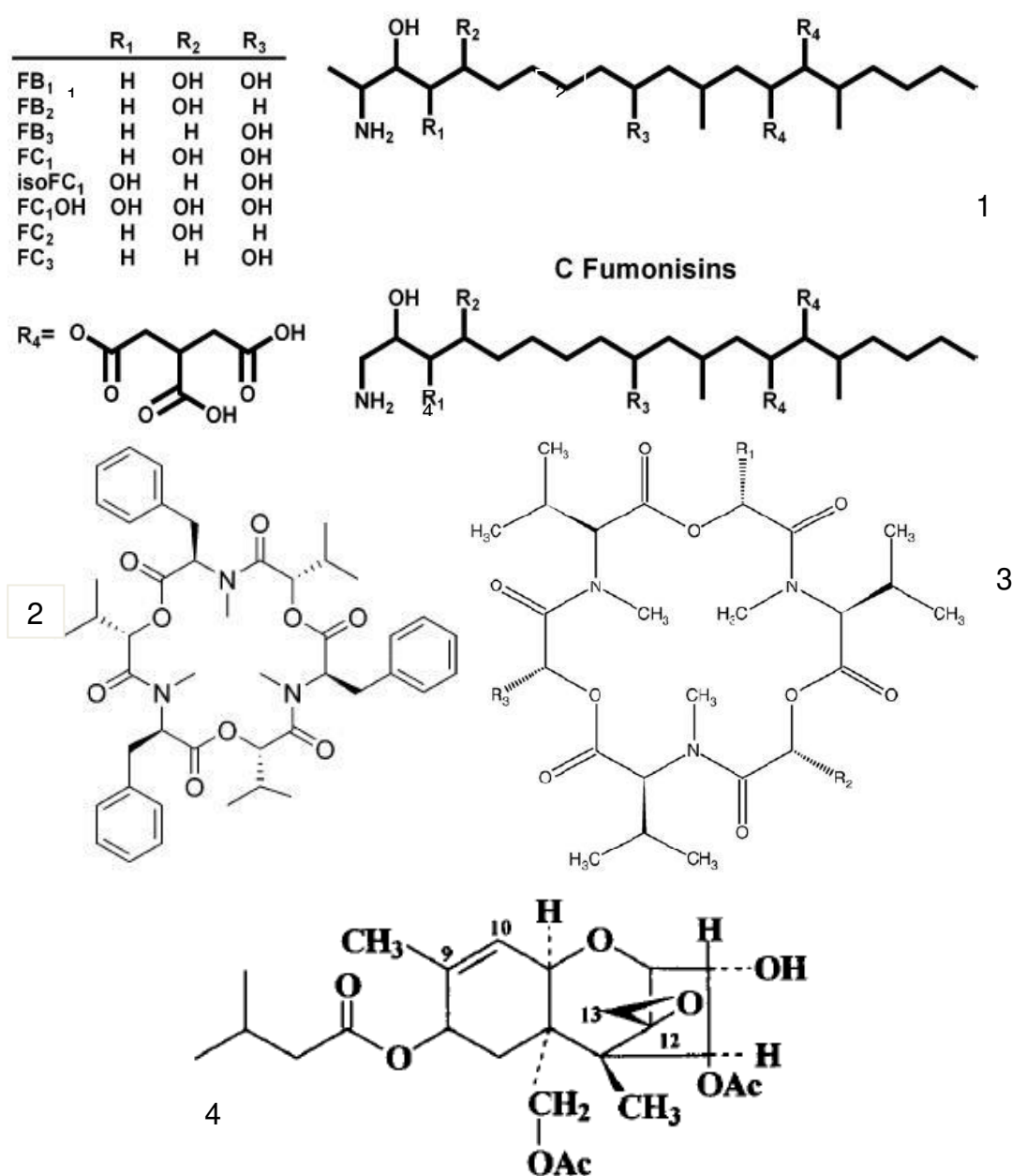


Figura 3: Estrutura de algumas micotoxinas isoladas de *Fusarium oxysporum*. As classes são: fumonisin (1); ciclopeptídeos enantianinas (2) e beuvaricina (3); tricotecenos (4).

2.4 Mastite Bovina

A mastite é uma inflamação da glândula mamária acompanhada, geralmente, da redução da secreção de leite e mudança de permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue. É considerada a doença mais comum e mais cara do gado leiteiro mundial. Esta enfermidade é causada principalmente por bactérias, mas outros micro-organismos ou até mesmo choques e lesões podem levar a esta inflamação (Tozzetti, 2008).

Essa doença infecto-contagiosa que acomete o gado leiteiro é um fator de limitação para a produção de produtos lácteos, influenciando nas propriedades físico-químicas e alterando a qualidade do leite (Zafalon *et al.*, 2008). Em estudo realizado por Holanda Júnior e colaboradores (2005), foi feito um levantamento de perdas ocasionadas pela mastite em rebanhos da região de Araxá, Minas Gerais. Os pesquisadores constataram que o custo fora de, aproximadamente, U\$126,00/vaca/ano, em que 75% desse total fora decorrente da redução da produção de leite e derivados provocada pela mastite e outros 6% fora decorrente do tratamento.

As infecções da glândula mamária podem apresentar-se sob duas formas, a clínica e a subclínica. A mastite clínica é reconhecida por perceptíveis anomalias no leite e no úbere, como grumos no leite, vermelhidão e inchaço no úbere. A doença é usualmente local, mas pode se tornar sistêmica, embora raramente, em animais imunossuprimidos (Hillerton e Berry, 2005). Na mastite subclínica não se observa alterações macroscópicas no animal, sendo que ela pode ser confirmada através de testes no leite e na glândula mamária, como o teste *California Mastitis Test* (CMT) (Cullor *et al.*, 1994). A prevalência da infecção é um risco significativo para contaminação de animais não infectados no rebanho. A forma subclínica é normalmente a mais prevalente, sendo responsável por, aproximadamente, 70% das perdas, podendo reduzir a secreção de leite em até 45% (Müller, 2002).

Quanto às bactérias isoladas de animais com mastite contagiosa na forma clínica e subclínica, estudos mostram que a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* é uma das principais causadoras desta enfermidade ao redor do mundo (Tozzetti, 2008), com taxas de isolamento variáveis. Estudos

mostram que variam também em decorrência da forma clínica (44%) ou subclínica (26%) (Martins *et al.*, 2010). Contudo outras bactérias gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* e *Corynebacterium* sp.) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*) foram isoladas (Hillerton e Berry, 2005; Martins *et al.* 2010).

S. aureus está comumente associado a infecções crônicas, possivelmente devido à capacidade da bactéria em viver intracelularmente (Hebert *et al.*, 2000), além disso, é uma bactéria que apresenta grande resistência às condições ambientais adversas, configurando-o como um importante patógeno (Matouskova e Janout, 2008)

O tratamento da mastite bovina é feito através da administração de antibióticos. Além disso, os antibióticos também são utilizados como forma de prevenção e no crescimento animal (Barkema *et al.*, 2006). Contudo, o uso de antibióticos indiscriminadamente têm selecionado cepas resistentes à maioria dos antibióticos mais comuns, dificultando, assim, as opções para o tratamento da doença (Jayaraman e Rammakrishnan, 2008). Estudos mostram que cepas de bactérias de *S. aureus* isoladas de bovinos da Europa apresentaram altos níveis de resistência a diferentes antibióticos (Nunes *et al.*, 2007; Fleßer *et al.*, 2010). Machado e colaboradores (2008), ao analisar cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de vários rebanhos enfermos de diferentes regiões brasileiras, notaram alto grau de resistência a vários antibióticos: Penicilina (93,5%), sulfonamida (88,9%), novobiocina (88,6%) e ampicilina (85,3%). Sendo que, um décimo dos isolados testados apresentou resistência a todas as drogas antimicrobianas testadas. Isso reforça a necessidade urgente em se encontrar novos antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina (Lacasse *et al.*, 2008).

Outras bactérias isoladas de mastite bovina também apresentaram alta resistência a antibióticos comumente utilizados. Cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de gado acometidos de mastite apresentaram alta resistência a ampicilina e penicilina, a qual pode ser em decorrência da produção de beta-lactamases (Nunes *et al.*, 2007). *E. coli* isoladas de casos de mastite bovina também apresentaram alto índice de resistência a ampicilina, amoxicilina, sulfadiazina e sulfametoxidiazina (Wang *et al.*, 2008).

Portanto, esses dados reforçam a necessidade em se encontrar novos compostos antimicrobianos, a partir de fontes alternativas, para o desenvolvimento de drogas que visam o tratamento da mastite bovina. Uma das premissas é o desenvolvimento da química de produtos naturais (Lacasse *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *Fusarium oxysporum* foi cedido pelo professor Dr. Ongkar Dev Dhingra do departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa. O cultivo do fungo foi feito no laboratório de doenças de plantas da Clínica de Doenças de Plantas casa 36 da Vila Giannetti campus UFV/Viçosa.

Os solventes utilizados foram das marcas Vetec Química Fina Ltda e LabSynth Produtos para Laboratório Ltda, em graus P.A. e cromatográficos. Para CLAE, foi usado o solvente acetonitrila grau CL/EM 99,9%.

As cromatografias em camada planar foram feitas em Sílica gel 60 G-F₂₅₄ da Vetec® e cromatofolhas de alumínio sílica gel 60 G-F₂₅₄ da Merck. Para a cromatografia em coluna, foi utilizado Sílica gel 60 (70-230 Mesh) da Vetec®.

Para a revelação dos resultados cromatográficos, foram utilizados ácido fosfomolibdico P.A ACS da Vetec® diluído em etanol comercial 93,6% da Flop's com concentração de 1% m/v e câmara escura de luz UV (254 e 366 nm) modelo MA-544 da Marconi® também foi utilizado.

Meios de cultura Müller-Hinton e Müller-Hinton-Ágar são da marca Difco™ e preparados de acordo com as especificações do fabricante.

Para a manipulação das bactérias foi utilizada capela de fluxo laminar Classe II A – NSF 49 da Marconi®.

Para os testes antibacterianos, foram utilizadas bactérias isoladas de animais com manifestação de mastite, fornecidas pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, pertencentes ao laboratório de Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CL/EM) foi realizada no laboratório Núcleo de Biomoléculas, casa 21, Vila Gianet, UFV. O cromatógrafo foi um Shimadzu com detector do tipo DAD. Para o espectrômetro de massas foi um MicroTOFQ-II. Ionização por eletrospray (ESI) íon positivo, com nitrogênio a 8 L.min⁻¹, a 180 °C, voltagem do capilar 4500 V, final a -500V.

O espectro de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetros Mercury-300. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl₃) usando-se como referência interna tetrametilsilano (TMS).

3.1 Cultivo do fungo

Para o preparo do meio de cultura, 200 g de batata inglesa foram lavadas, descascadas e fervidas em 2 L de água destilada por 30 minutos. O caldo de batata foi obtido pela filtração da solução em papel de filtro e transferido para frascos erlenmeyers de 1L contendo 400 mL de caldo. Posteriormente foram adicionados 8 g dextrose em cada frasco (20 g.L^{-1}) e os mesmos foram autoclavados.

O fungo foi repicado em meio sólido batata-dextrose-ágar para a ativação do crescimento, em placa de Petri. Após 10 dias, discos de, aproximadamente, 10 mm de diâmetro foram recortados e transferidos para cada frasco contendo o meio líquido.

O crescimento em batelada foi feito em fase estacionária e no escuro, por 10 dias.

3.2. Obtenção dos extratos orgânicos

Decorrido 10 dias de crescimento em batelada, o micélio foi separado do meio líquido através de filtração com papel Whatman nº 4. O micélio foi acondicionado em um béquer de 1 L enquanto que o meio líquido foi posto em um erlenmeyer de 6L.

O extrato foi preparado pela técnica de maceração em acetato de etila para o micélio e partição líquido-líquido para o meio de cultura, utilizando o mesmo solvente. Para o micélio foram utilizados 600 mL de solvente e 1 L foi usado no meio líquido. Estes foram deixados em contato com o solvente por sete dias, com agitação diária. Após esse período, ambos foram filtrados e a fase orgânica foi separada da aquosa em funil de separação de 1 L. O extrato foi destilado em rota-vaporador, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão reduzida, sendo, posteriormente transferido para um frasco de vidro e deixado em capela de exaustão para a completa evaporação do solvente. O solvente recuperado foi completado para os volumes iniciais e colocados em contato novamente com o micélio/meio líquido para a continuação da extração. Esses procedimentos foram repetidos por quatro vezes (Figura 4).

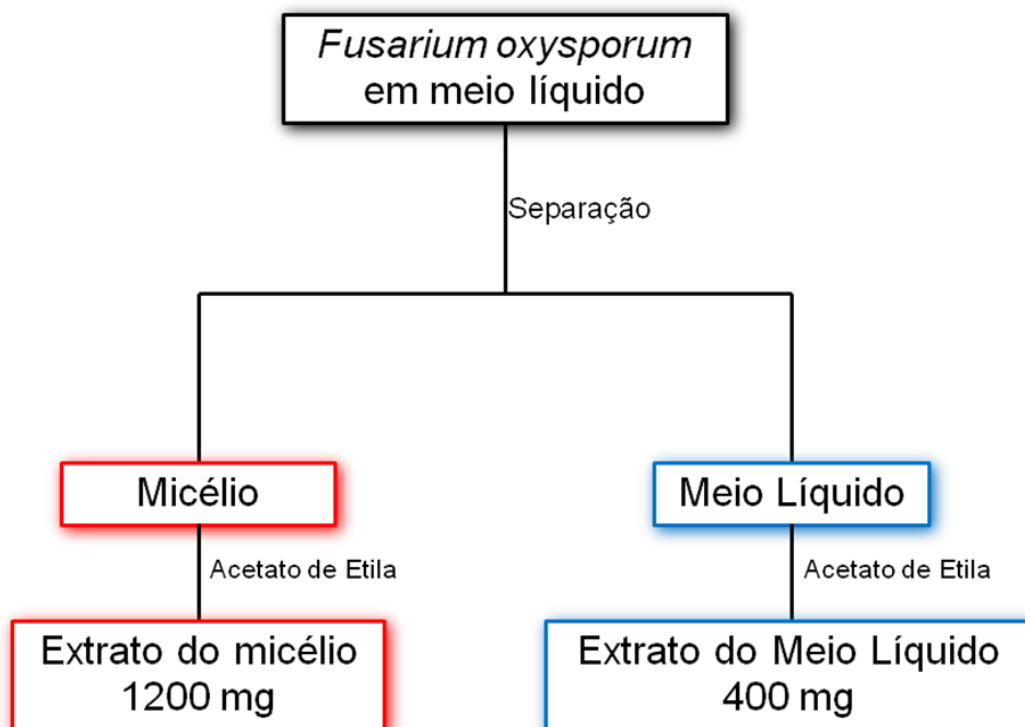


Figura 4: Fluxograma de obtenção dos extratos do micélio e do meio de cultura.

3.3 Ensaio de atividade antibacteriana

Para o ensaio antimicrobiano foram usados cinco isolados de *Staphylococcus aureus*, catalogados com a numeração 3022, 3828, 3974, 4075, 4157 e dois isolados de *Escherichia coli*, numerados como 24 e 25.

Em todos os testes, os micro-organismos foram crescidos previamente em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio Luria Bertani, LB (5 g.L⁻¹ de NaCl, 5 g.L⁻¹ de triptona, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura), por 16 h a 37 °C. Para o estoque, os micro-organismos foram crescidos em 3 mL de meio LB por 16 h a 37 °C, sendo posteriormente repicados em meio LB contendo ágar (15 g.L⁻¹). Esses foram levados a estufa a 37 °C e, após 24h, foram acondicionados a 4 °C. Uma nova repicagem foi feita a cada 60 dias.

A investigação da atividade antimicrobiana foi feita pela técnica de difusão em poço de Agar. Para isso, 134 µL de uma suspensão bacteriana contendo 10⁶ UFC.mL⁻¹ foram inoculados em frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de meio em placas ágar Mueller-Hinton (Himedia®) em torno de 50 °C. O meio foi vertido em placas de Petri. Após a solidificação, furos de aproximadamente 3 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no meio e

preenchidos com 10 μL dos extratos na concentração de 50 mg/mL. Controles foram realizados com 10 μL de DMSO e Ciclopirox olamina (Uci-Farma[®]) a 5 mg.mL⁻¹ (o antibiótico foi diluído em DMSO). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e os halos de inibição foram medidos em milímetros. Os testes foram realizados em triplicata.

O procedimento foi o mesmo para os testes com as frações. Contudo a concentração foi de 5-10 mg.mL⁻¹.

3.4 Ensaio de purificação biomonitorada

Para o ensaio biomonitorado foram usadas técnicas de cromatografia. Testes de atividade antibacteriana foram feitos para o monitoramento de frações. A bactéria *S. aureus*, isolado 3828, foi usada como micro-organismo indicador.

O extrato do micélio foi diluído em acetato de etila a quente, arrefecido e filtrado em papel de filtro. O precipitado foi recolhido e armazenado, formando uma fração distinta ($F_{fp} = 150$ mg). O filtrado foi cromatografado (100 mg por placa de cromatografia) em placas de cromatografia em camada planar preparativa (CCPP) 20X20 cm com Sílica-Gel 60GF₂₅₄, espessura de 1 mm, utilizando como eluente binário acetato de etila e hexano (4:6 v/v). Luz UV e ácido fosfomolibdico foram usados como revelador. Seis frações foram coletadas e as médias dos fatores de retenção foram calculadas como as médias de cada cromatografia feita. Ensaio de atividade antibacteriana foi feita com cada fração (cerca de 5 mg.mL⁻¹).

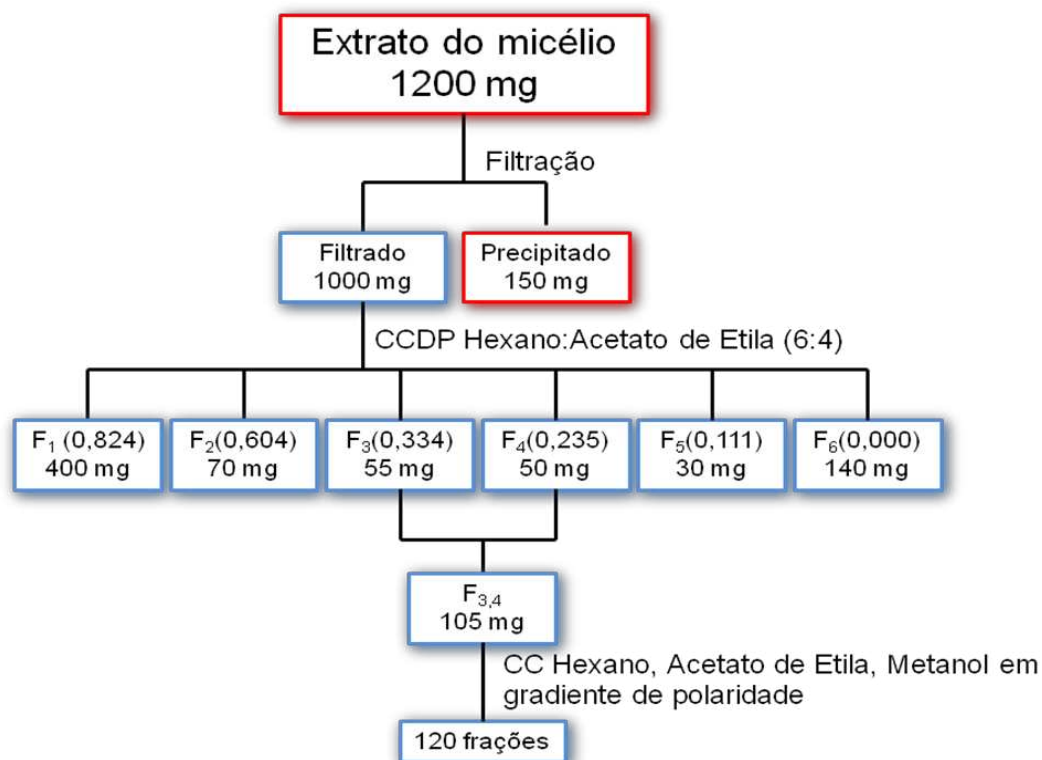


Figura 5: Fluxograma de purificação para a fração do filtrado. Os valores entre parênteses representam os Rf (fator de retenção) médios de cada fração em CCPP.

As frações F₃ e F₄ foram reunidas em um novo grupo de acordo com o perfil cromatográfico de cromatografia em camada delgada (CCD) e por apresentarem moderada atividade biológica. Esse foi cromatografado em coluna usando como eluentes hexano, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade, 120 frações de 20 mL foram coletadas e reunidas em grupos de acordo com o perfil em CCD (Tabela 2). Dos nove grupos coletados, apenas o grupo 3,4.1 apresentou atividade biológica.

Tabela 2. Relação grupo, fração e massa da cromatografia em coluna da fração F_{3.4}

Grupo	Fração	Massa (mg)
3.4.1	1-10	12
3.4.2	11-23	7
3.4.3	24-35	5
3.4.4	36-40	2
3.4.5	41-53	13
3.4.6	54-70	17
3.4.7	71-97	6
3.4.8	98-105	16
3.4.9	105-120	18
Total		96 mg

O precipitado (proveniente do extrato do micélio) foi cromatografado em CCPP na mesma condição do filtrado, com eluente binário clorofórmio e acetato de etila (8:2 v/v). Oito frações foram coletadas e submetidas a ensaios antibacterianos (Figura 6).

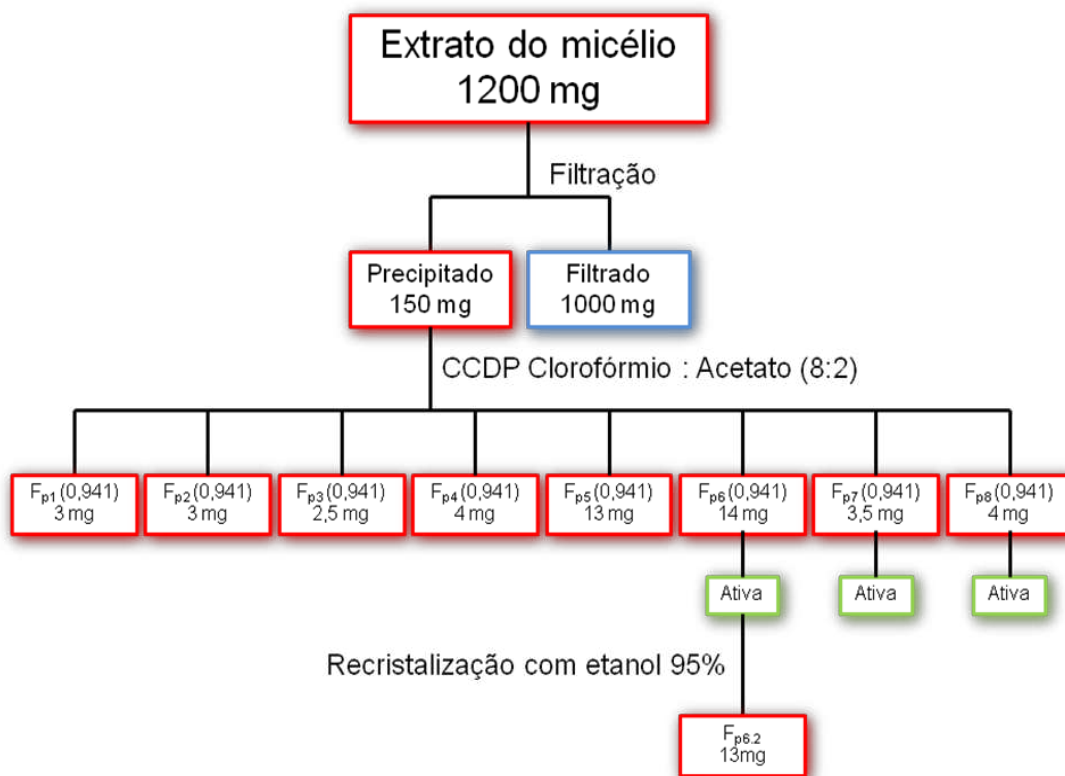


Figura 6: Fluxograma de purificação para a fração do precipitado. Os valores entre parênteses representam os Rf (fator de retenção) médios de cada fração. As frações Fp6, Fp7 e Fp8 apresentaram atividade.

As frações Fp6, Fp7 e Fp8 apresentaram atividade antibacteriana. A fração Fp6 apresentou cristais de coloração vermelha. Esta foi recristalizada com etanol e filtrada. O precipitado foi recuperado (Fp6.2 13 mg) apresentando atividade antibacteriana positiva.

O extrato do meio líquido foi diluído em acetato de etila a quente, arrefecido e filtrado. O precipitado foi recuperado (Fmp = 20 mg). O filtrado (330 mg) foi cromatografado em coluna utilizando-se como eluentes clorofórmio, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade. Um total de 180 frações de 20 mL foram coletadas e analisadas em CCD (Figura 7 e Tabela 3).

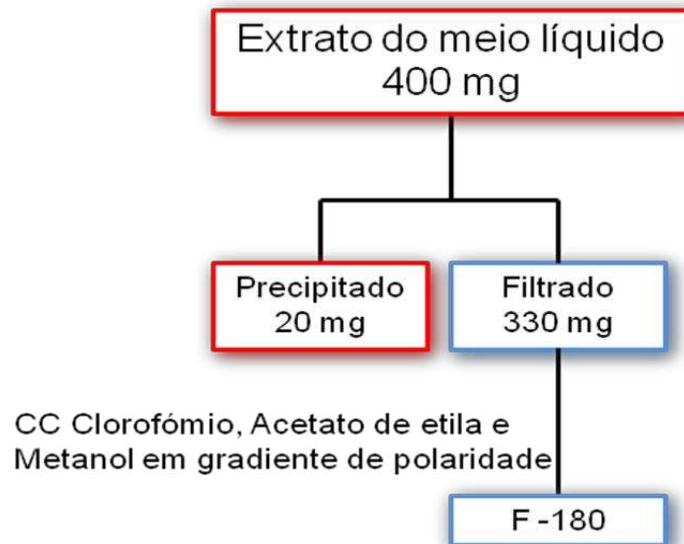


Figura 7: Fluxograma de purificação para o meio líquido.

Tabela 3. Relação grupo, fração e massa do extrato do meio líquido

Grupo	Fração	Massa (mg)
1	1-17	33
2	17-26	15
3	27-39	13
4	40-47	26
5	48-55	7
6	56-70	15
7	71-80	13
8	88-105	17
9	105-120	18
10	120-133	40
11	133-150	38
12	151-163	23
13	164-180	30
Total		288 mg

As frações com o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas no mesmo grupo (tabela 3). Os grupos G3, G5, G6 e G7 apresentaram atividade antibacteriana. Os grupos G6 e G7 foram reunidos e cromatografados em coluna, usando os eluentes clorofórmio e metanol em gradiente de polaridade. Testes de atividade antibacteriana foram feitos e nenhuma fração apresentou atividade.

3.5 Ensaio de concentração inibitória mínima

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da fração $F_{p6.2}$ foi feita por diluição em microplaca de 96 poços. As microplacas foram esterilizadas por exposição à luz ultravioleta em capela de fluxo laminar (Marconi®) por 30 min antes da realização dos testes. Os poços foram preenchidos com 180 μL de meio Müller-Hinton e uma suspensão bacteriana ajustada para concentração final de 10^6 UFC/mL. Em seguida, adicionou-se 20 μL a fração $F_{p6.2}$ diluída em DMSO nas seguintes concentrações: 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 15,62 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3,90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A microplaca foi mantida a 37 °C por 24 h e a CIM foi determinada como a menor concentração na qual não foi visualmente observada turbidez do meio ou crescimento bacteriano (Ferraro *et al.*, 2003). A CIM do controle positivo sobre os isolados foi feita utilizando o mesmo procedimento, variando-se as concentrações de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Meio Müller Hinton acrescido de DMSO foi utilizado como controle negativo. O teste foi realizado em duplicata.

3.6 Ensaio de partição com água em pH básico e ácido da fração $F_{p6.2}$

Ensaio de partição foi feito utilizando soluções de NaOH (0,01M) e HCl (0,01M). Para isso, 2 mg do composto $F_{p6.2}$ foram diluídos em 4 mL de clorofórmio P.A. 2 mL de solução foram transferidas para dois tubos de ensaios previamente limpos e catalogados. 2 mL de solução de NaOH foram adicionados no primeiro tubo, enquanto que o mesmo volume de HCl foi transferido para outro tubo. Ambos os tubos foram agitados e deixados em repouso por 10 minutos.

No tubo contendo a partição com solução de NaOH, o meio aquoso foi retirado, deixando a interface intacta e, posteriormente, foi adicionada a solução de HCl. O tubo foi agitado e deixado em repouso por 10 minutos.

3.7 Caracterização do composto F_{p6.2}

3.7.1 Varredura na região do UV e visível

Para o composto F_{p6.2} foi feita uma análise em espectroscopia na região do ultravioleta e ultravioleta-visível. Para isso, a amostra foi diluída em clorofórmio P.A. numa concentração de 1 mg.mL⁻¹. A varredura foi feita no intervalo de λ de 200-700 nm. O branco foi feito com clorofórmio puro, no mesmo intervalo de λ , para retirar a presença de interferentes. Os dados coletados foram inseridos no programa Microsoft® Excel 2007 e o gráfico foi plotado.

3.7.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A fração F_{p6.2} foi injetada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado a espectrometria de massas. Para tal, foi feita uma solução de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da amostra em acetonitrila. Foram injetados 20 μL no aparelho. A condição foi gradiente binário de eluição utilizando os solventes água e acetonitrila (Tabela 4), com um tempo de corrida de 30 minutos. A coluna utilizada foi sílica de fase reversa C18.

Tabela 4. Concentração dos eluentes usados durante o CLAE/EM para a primeira cromatografia.

Tempo (minutos)	água (%)	acetonitrila (%)
0	100	0
5	100	0
10	5	95
15	5	95
20	100	0
25	100	0

Posteriormente, foi feita uma nova análise cromatográfica. As condições desta cromatografia foram as mesmas da anterior, contudo os eluentes utilizados foram acetonitrila e solução de ácido fórmico 0,1% (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração dos eluentes usados durante CLAE/EM para a segunda cromatografia

Tempo (minutos)	ácido fórmico 0,01% (%)	Acetonitrila (%)
0	100	0
5	100	0
10	5	95
15	5	95
20	100	0
25	100	0

3.8 Análise estatística dos resultados de atividade antibacteriana dos extratos brutos

Foi realizada análise estatística dos testes antibacteriano utilizando o teste t (teste de Student), com nível de significância de 5%, entre as médias referentes às amostras de extrato do micélio e do meio líquido, com intuito de determinar se há diferença significativa entre as amostras. Também determinou se há diferença significativa de ação sobre cada bactéria.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade biológica dos extratos

O extrato do micélio rendeu 1200 mg enquanto que para o meio líquido obteve-se 400 mg.

Os resultados para os testes de atividade antibacteriana frente às bactérias *S. aureus* (5 cepas) e *E. coli* (2 cepas) estão apresentados na Tabela 6. Os extratos apresentaram atividade apenas para a bactéria *S. aureus*. Não houve diferença significativa entre os resultados do micélio e do meio líquido, mas houve diferença no resultado entre as cepas 3828 e 4075, para o extrato do micélio. Em posse destes resultados, a bactéria 3828 foi usada nas fases seguintes.

Tabela 6. Teste de atividade antibacteriana para os extratos

Bactéria	Extrato		Controle Positivo*
	Micélio	Meio Líquido	
<i>S. aureus</i> 3022	8,7 ± 0,58	7,7 ± 1,15	14,3 ± 0,58
<i>S. aureus</i> 3828	9,3 ± 1,15	9 ± 0	16,3 ± 1,15
<i>S. aureus</i> 3974	8,7 ± 0,58	8,3 ± 1,52	14 ± 0
<i>S. aureus</i> 4075	7,3 ± 0,58	8,3 ± 0,58	14,3 ± 0,58
<i>S. aureus</i> 4157	8,3 ± 0,58	8,3 ± 0,58	13,3 ± 0,58
<i>E. coli</i> 24	-	-	17,3 ± 1,15
<i>E. coli</i> 25	-	-	16,6 ± 1,15

* ciclopirox olamina 5 mg/mL

4.2 Biomonitoramento

Ambos os extratos foram obtidos e tratados separadamente. Após a solubilização do extrato do micélio, um precipitado era formado ao longo do tempo. Esse foi separado e armazenado.

O extrato do micélio apresentou um declínio de atividade antibacteriana após o processo de filtração (Figura 8), frente a cepa 3828. Na primeira cromatografia do micélio, 6 frações foram coletadas, sendo que as frações F_{f3} ($R_f = 0,343$) e F_{f4} ($R_f = 0,253$) apresentaram moderada atividade antibacteriana. Como o teste foi qualitativo, o halo de inibição não foi mensurado. As frações F_2 e F_5 , por serem coloridas, apresentaram manchas, mas percebe-se crescimento bacteriano (turvação). Testes com essas frações foram repetidos e comprovados que eram inativas.



Figura 8: Teste antibacteriano para as frações do micélio. A seta azul indica as frações 3 e 4. As três frações abaixo na cor abóbora indicam o extrato do micélio filtrado.

Testes cromatográficos mostraram que as frações F_3 e F_4 apresentavam perfis cromatográficos parecidos, assim estes foram reunidas em um grupo denominado $F_{3,4}$. Essa foi cromatografada em coluna, obtendo-se 120 frações reunidas em 9 grupos. Destas a fração $F_{3,4.1}$ apresentou-se ativa, cuja média do halo de inibição foi de 5,6 mm (Figura 9). Testes de cromatografia analítica demonstraram que a fração não estava pura.

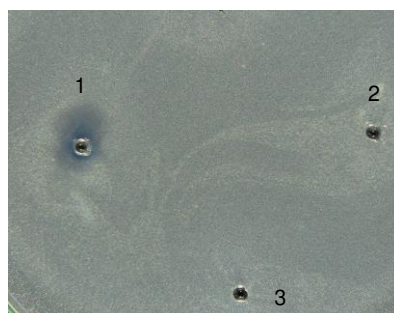


Figura 9: Teste de atividade para as frações $F_{3,4}$. A foto mostra as frações $F_{3,4.1}$, $F_{3,4.2}$ e $F_{3,4.3}$, representadas pelos números 1, 2 e 3, respectivamente.

A fração precipitado do extrato do micélio apresentava-se como um sólido vermelho, mas testes de cromatografia analítica revelaram impurezas. Após a recristalização da fração $F_{p6.2}$ (13 mg) com etanol 95% P.A., a mesma apresentou como um sólido vermelho em forma de agulhas. Já a fração F_{p7} apresentou um sólido amorfo azulado. Ambas as frações apresentaram atividade antibacteriana (Figura 10). As médias dos halos de inibição para $F_{p6.2}$ e F_{p7} foram: 6,5 mm e 16 mm para o isolado 3828 e 7 mm e 16 mm para o isolado 4157. Já para o isolado 4075, a amostra $F_{p6.2}$ apresentou um halo de inibição de apenas 5 mm, enquanto que F_{p7} apresentou um halo de 11 mm. No caso desta cepa, o controle positivo não apresentou uma completa inibição do crescimento bacteriano, mostrando um halo perceptível, mas turvo. Testes de cromatografia analítica para ambas as frações foram feitos e demonstrando-se puros.

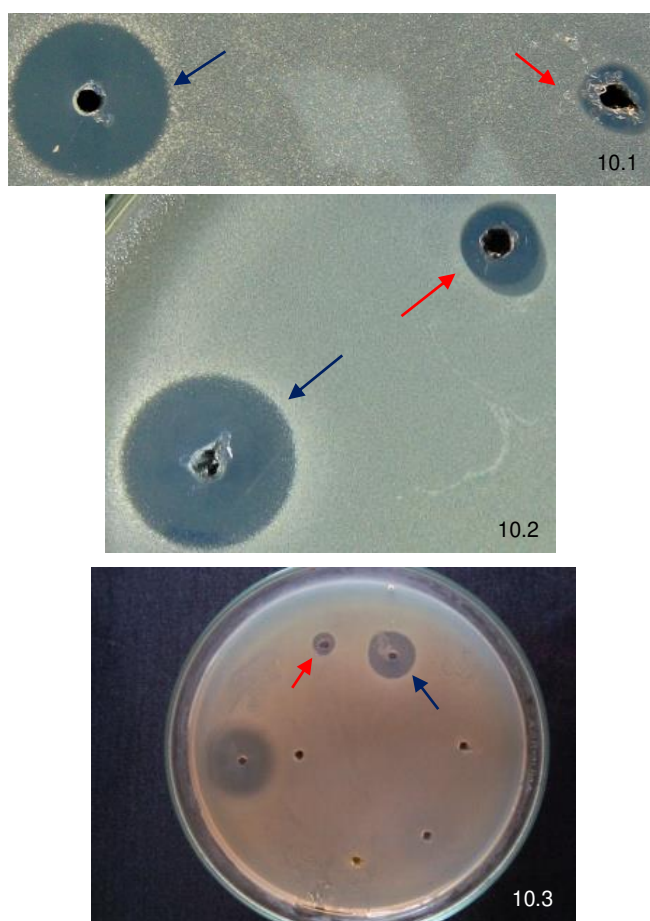


Figura 10 Teste qualitativo para as frações $F_{p6.2}$ e F_{p7} . As setas azul indicam a F_{p7} e a vermelha a $F_{p6.2}$. 10.1, 10.2 e 10.3 correspondem respectivamente às cepas de *S. aureus* 3828, 4157 e 4075.

Quanto ao meio líquido, quatro grupos foram ativos (Figura 11). A fração F_{m5} (representada pelos números 10 e 11 na Figura 11) apresentou alguns cristais amorfos de cor abóbora. Testes de cromatografia analítica mostraram que as frações estavam impuras. As frações F_{m6} e F_{m7} , por apresentarem perfil semelhante em testes de CCD, foram reunidas em um grupo distinto e cromatografadas em coluna, porém as frações obtidas não apresentaram atividade antibacteriana.

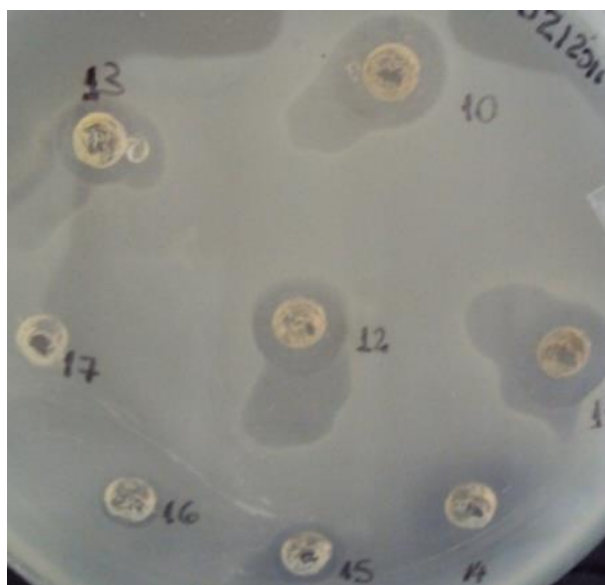


Figura 11: Teste antibacteriano para as frações do extrato do meio líquido. As frações F_{m5} (10 e 11) e F_{m6} (12 e 13) foram ativas.

4.3 Ensaio de partição com água básica e ácida para $F_{p6.2}$.

Foi feita a análise de partição do composto (solubilizado em clorofórmio) em solução NaOH e HCl, com intuito de determinar a presença características ácido-base do composto (Figura 12). Após agitação, a partição com solução de HCl 0,01 M no primeiro tubo (Figura 12.1.a) nota-se que não houve mudança visível nas características das soluções, ao passo que no tubo dois (contendo a solução de NaOH 0,01 M) houve a presença de uma interface entre o solvente orgânico e a água de coloração roxa (Figura 12.1.b).

Ao realizar a acidificação do tubo 2 com a solução de HCl, após retirada de 1 mL da solução aquosa alcalina, observa-se que após o intervalo de tempo de 10 minutos, o solvente orgânico adquire a cor avermelhada do experimento

inicial. Percebe-se que a solução torna-se visualmente mais diluída que a inicial (Figura 12.2), sugerindo que parte do composto ficou solúvel na solução aquosa alcalina após a retirada da mesma.

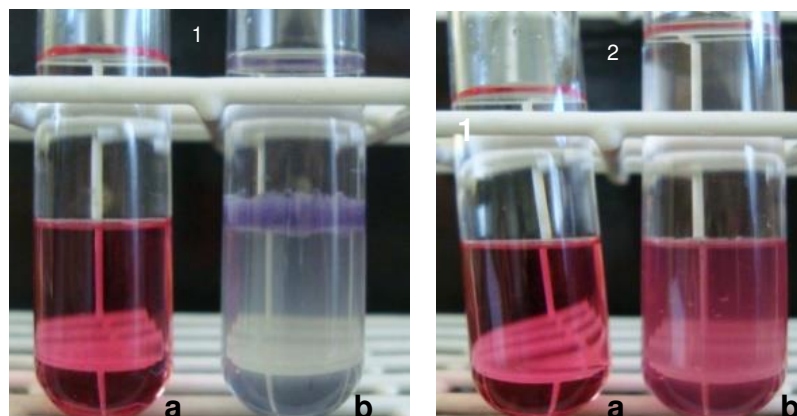


Figura 12: Ensaio de partição com NaOH e HCl. Partição com HCl está representado por **a**, enquanto que partição com NaOH está representado por **b**. Em 1 está representado pela primeira adição das soluções aquosas. Já em 2, o **b** mostra o resultado após a adição da solução de HCl.

4.4 Espectroscopia no ultravioleta e visível

Dados de espectroscopia no ultravioleta mostram que o composto $F_{p6.2}$ apresentou duas absorções (Figura 13) . A banda mais intensa está na região do ultravioleta de absorção máxima de 259 nm. Outra banda característica está na região de absorção máxima é em 525 nm. A varredura do solvente puro mostrou que o mesmo não apresenta absorção na varredura do λ testado.

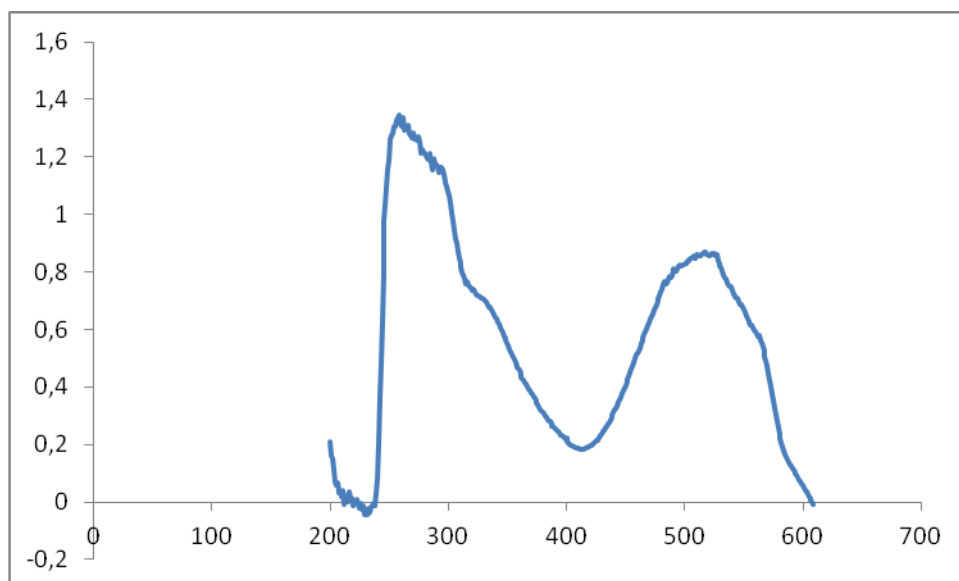


Figura 13: Espectro de varredura no UV-vis (200-700 nm) para a amostra $F_{p6.2}$

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas para a fração $F_{p6.2}$

A análise da fração $F_{p6.2}$ por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que a fração apresentou com alto grau de pureza em ambas as condições (Figura 14 e 15). Para a primeira condição (acetonitrila e água) foi observado apenas um pico majoritário cujo tempo de retenção foi de 22,5 minutos, cuja concentração do eluente era 100% de água. Três picos majoritários foram detectados no espectro de massas. Contudo, os picos com m/z 122,0837 e 201,1024 foram detectados na corrida apenas com os solventes de trabalho. Com isso, infere-se que a provável massa do composto seja 419,2923.

Para a condição acetonitrila e solução de ácido fórmico 0,1%, um pico majoritário foi visto, cujo tempo de retenção foi de 14,5 minutos, aproximadamente. A massa detectada, de acordo com o espectro de massas, foi de 419,2946.

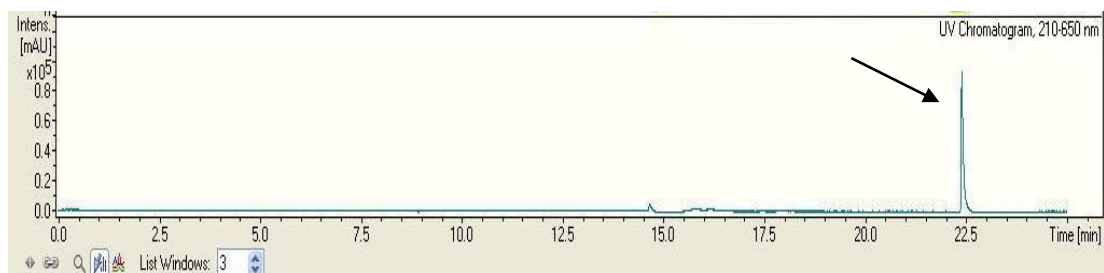


Figura 14 Cromatograma do CLAE da fração $F_{p6.2}$ para a primeira condição.

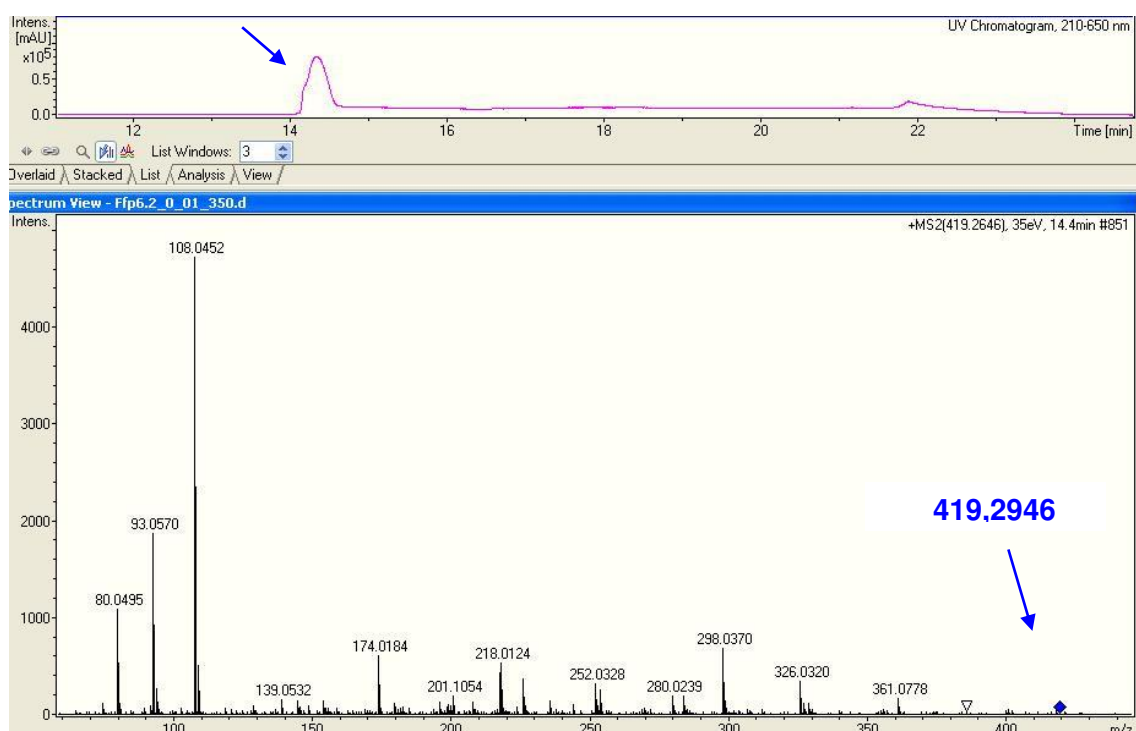


Figura 15 Cromatograma de CLAE da fração $F_{p6.2}$ para a segunda condição e espectro de massas do composto.

4.6 Espectro de ressonância magnética de ^1H e ^{13}C da fração $F_{p6.2}$

O espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos utilizando CDCl_3 , porém a substância é pouco solúvel neste solvente, precipitando após algum tempo. Isto dificultou a obtenção dos espectros, principalmente de carbono. Todavia, pode-se sugerir a partir do espectro de RMN de ^1H , que o composto apresenta um anel aromático, pela presença de três picos absorvendo entre 6 e 7 ppm. Sugere-se também a presença de hidrogênios benzílicos na região de 2,90 ppm. Em 3,95 ppm infere-se a

presença de metoxilas e entre 1 e 2 ppm. observa-se a presença de dois singletos intensos provavelmente atribuídos a presença hidrogênios de metilas e/ou metilenos (Figura 16).

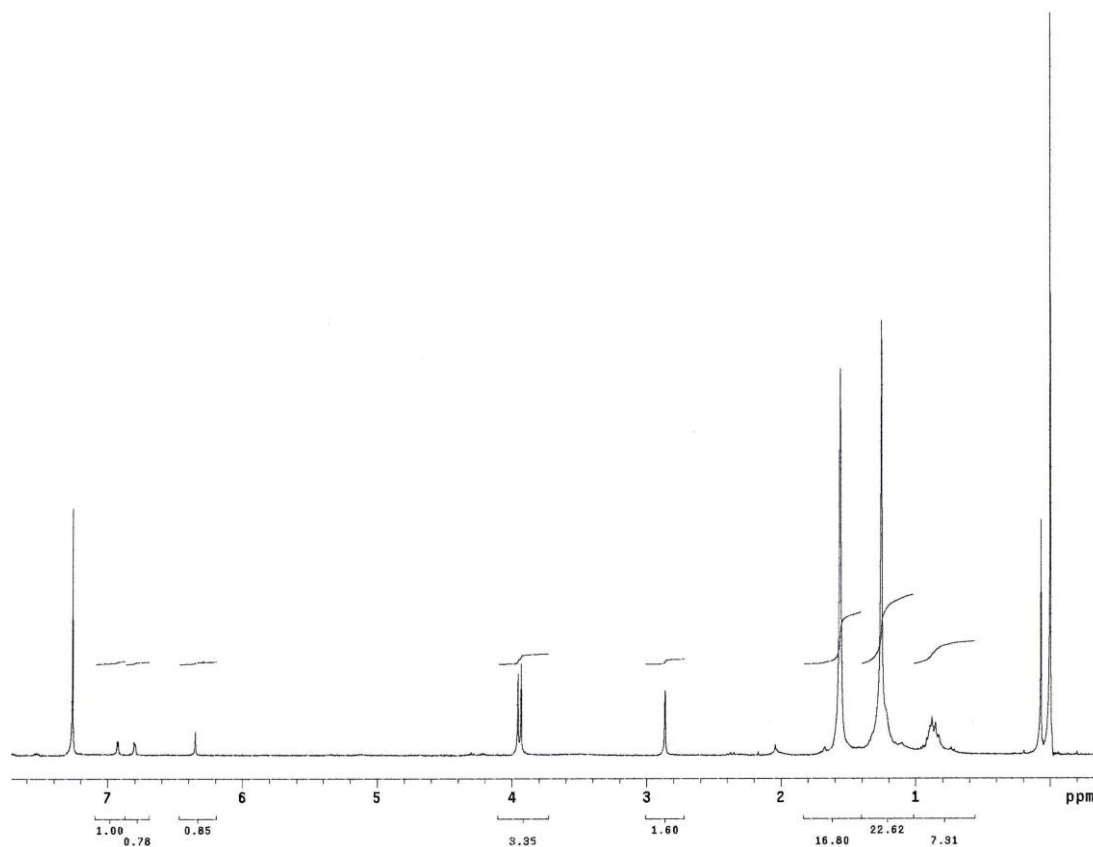


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H da fração $F_{p6.2}$ em CDCl_3

No espectro de carbono 13 observa-se a presença de sinais de carbonos blindados na região de 20 ppm, podendo ser uma metila ou metileno. Contudo, os demais sinais estão fracos, apresentando-se como traços, o que dificulta a análise (Figura 17).

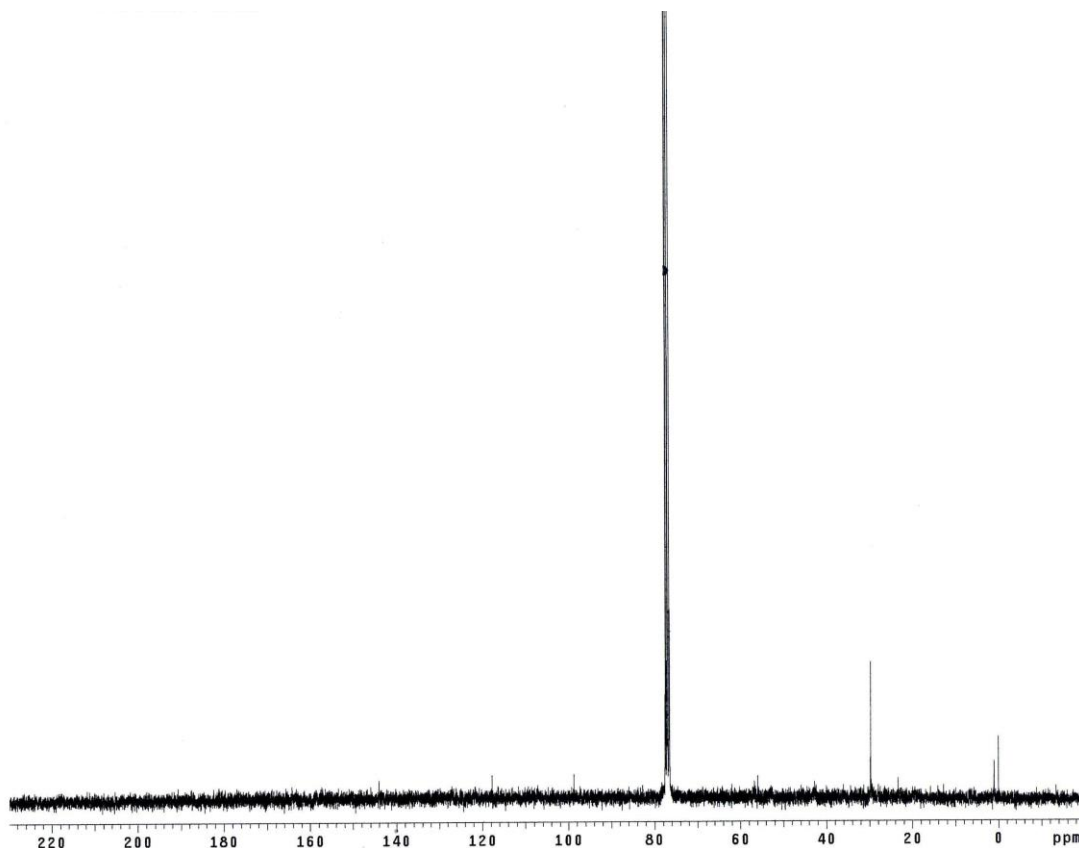


Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C da fração $F_{p6.2}$ em CDCl_3

4.7 Teste de concentração inibitória mínima para a fração $F_{p6.2}$

A concentração inibitória mínima para a fração $F_{p6.2}$ foi testada (Tabela 7 e figura 18). De acordo com os resultados, uma moderada atividade ($31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi obtida para os isolados de *Staphylococcus aureus* 3828 e 4157, enquanto que o isolado *S. aureus* 4075 mostrou-se mais resistente ($62,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Esses testes mostraram-se diferentes dos testes em meio sólido, no qual a fração apresentou uma baixa atividade antibacteriana. Como comprovado no teste preliminar com os extratos, a fração $F_{p6.2}$ não mostrou atividade antibacteriana frente a bactéria *Escherichia coli*. Essa bactéria foi usada como referência de crescimento para o teste frente à fração testada. Na figura 18 o isolado usado como controle é o 4075. Controle positivo e negativo para os isolados de *E. coli* 24 e as *S. aureus* 3828 e 4157 foram feitos em outra placa.

Tabela 7. Valores de concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para a fração $F_{p6.2}$.

Bactéria	$F_{p6.2}$	Controle positivo*
<i>S. aureus</i> 3828	31,25	15,62
<i>S. aureus</i> 4157	31,25	15,62
<i>S. aureus</i> 4075	62,50	62,50
<i>E. coli</i> 24	-	-

*Ciclopirox olamina

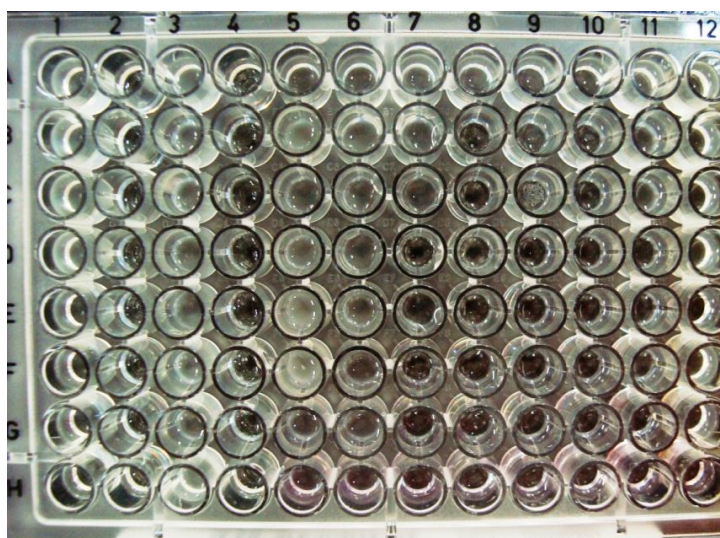


Figura 18: Foto do teste de concentração inibitória mínima do composto $F_{p6.2}$. Canaletas 1 e 3 são os controles positivo e negativo, respectivamente. *E. coli* 24 está no par 5-6. As cepas de *S. aureus* 3828, 4157 e 4075 estão nos pares de canaletas 7-8, 9-10 e 11-12, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, testes de atividade antibacteriana mostraram que o fungo *Fusarium oxysporum* produz compostos capazes de inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos acometidos com mastite, quando cultivados em meio líquido caldo de batata-dextrose. É bem conhecido que a composição do meio de cultura tem um grande impacto no crescimento de micro-organismos, bem como na produção de metabólitos secundários pelos mesmos (Berdy, 2005; Nielsen *et al.*, 2004).

Estudos mostram que compostos isolados desta espécie apresentaram atividade frente a bactérias droga-resistentes (Wang *et al.*, 2011). Apesar de experimentos denotarem valores de atividade abaixo ao do controle positivo em testes de difusão em meio sólido, deve-se levar em consideração que alguns fatores influenciam o resultado, dentre eles a difusão da amostra sobre o meio de cultura e espessura do meio de cultura na placa, bem como a concentração da amostra para a realização dos testes (Otrotsky *et al.*, 2008). Contudo, em testes antibacterianos utilizando esta metodologia, amostras são consideradas positivas quando apresentam halos de inibição de pelo menos 7 mm (Leite *et al.*, 2000). Para cepas de *Escherichia coli*, ambos os extratos apresentaram resultados negativos. Sabe-se que alguns antibióticos apresentam amplo espectro de ação para bactérias gram-positivas, mas são de baixa atividade ou mesmo ineficazes contra bactérias gram-negativas. Esta diferença pode está relacionada à metabolização da substância, tornado-a não tóxica. Algumas cepas de bactérias gram-negativas, como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, são capazes de sintetizar a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que é capaz de metabolizar diversos antibióticos usados no controle de infecções causadas por esses micro-organismos (Dienstmann *et al.*, 2010). Outros sugerem que a diferença relaciona-se a capacidade de retenção das moléculas pela membrana externa de bactérias gram-negativas (Levy e Marshall, 2004). Um exemplo é o antibiótico vancomicina que não consegue atravessar a membrana externa destas bactérias, sendo, portanto, ineficaz no combate à infecções provocadas por este tipo de micro-organismo (Walsh, 2003).

A partir do extrato do micélio obteve-se uma fração como um sólido em forma de agulha de cor vermelha, purificado através de técnicas cromatográficas e recristalização. Na indústria farmacêutica moderna, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a principal ferramenta empregada em todos os estágios de descoberta, desenvolvimento e produção de drogas (Kazakevich e LoBrutto, 2007). O composto obtido foi cromatografado em CLAE em duas condições diferentes, mudando apenas o pH da solução aquosa. O resultado mostrou que o composto tem um alto grau de pureza e com provável polaridade média, devido à análise do tempo de retenção e a concentração dos eluentes durante este tempo. A fração F_{p7} obtida apresentou maior atividade antibacteriana, contudo a quantidade obtida foi baixa, impossibilitando a continuação dos testes posteriores.

Ensaio de partição com água levemente básica (NaOH 0,01M) mostrou que ocorre uma mudança de coloração e o composto apresenta-se na interface dos solventes, sugerindo que o mesmo reage numa reação ácido-base. A ressolubilização em clorofórmio ocorre após a acidificação do meio, formando uma solução de coloração semelhante a inicial. Isso sugere que a reação é reversível, entretanto, testes de identificação do composto torna-se necessário para confirmar esta hipótese. Esse resultado sugere que o composto pode ser purificado através de técnica de partição água e solvente orgânico, mudando o pH do solvente aquoso em cada etapa, semelhante ao que é utilizado para extração de alcalóides totais em vegetais (Henriques *et al.*, 1999). Esse ensaio veio a elucidar o que foi visto no cromatograma de CLAE. Para a primeira condição, o tempo de retenção da amostra foi acima do esperado, saindo na concentração de 100% de água MilliQ (cujo pH é neutro). Por outro lado, quando acidifica a solução aquosa (ácido fórmico 0,01%) percebe-se que o composto apresenta maior afinidade pela acetonitrila, uma vez que ele foi detectado com o gradiente de 100% deste solvente. Assim, confirma-se que perante a solução ácida, o composto não sofre reação ácido-base, contudo já em pH neutro este composto ioniza-se, aumentando assim a afinidade com água.

O composto $F_{p6.2}$ apresentou grande solubilização em clorofórmio, contudo, em solventes deuterados, utilizados para ensaios de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, ocorre a formação de precipitado,

impossibilitando, assim, a análise do composto. A solubilização incompleta da amostra no solvente deuterado compromete a qualidade do espectro. A espectroscopia no ultravioleta mostrou que o composto apresenta bandas de absorção na região do visível, sugerindo que o composto apresenta um grau de conjugação elevado, com estabilização da estrutura devido à deslocalização eletrônica entre os átomos que participam da conjugação. Esses dados são condizentes, uma vez que o composto apresenta uma intensa cor vermelha. Devido a esta característica de absorção, infere-se que a substância apresenta dois graus de conjugação eletrônica independentes. Outro fator importante é que este perfil de absorção foi usado na detecção do composto por CLAE com detector UV, uma vez que neste comprimento de onda um número menor de compostos apresentam absorção neste comprimento de onda.

Esses resultados sugerem que o composto F_{p6.2} apresenta um potencial uso como biosensor, já que ocorre mudança de coloração com a mudança de pH, bem como corante, devido a intensa coloração avermelhada que assume. Dados na literatura mostram que a espécie de estudo deste trabalho produz metabólitos com potencial uso como corantes naturais (Nagia e El-Mohamedy, 2007). Outros compostos com uso potencial para corantes também foram isolados em outras espécies de micro-organismos (Guella *et al.*, 2010). Esses compostos agem principalmente como fotorreceptores, mas em alguns casos também podem atuar na defesa do organismo contra outras espécies (Buonanno *et al.*, 2005).

Testes de concentração inibitória mínima mostraram que o composto F_{p6.2} apresenta uma atividade antibacteriana moderada. São consideradas atividade forte com concentrações $\leq 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderada concentrações entre $10\text{-}50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e fracas $\geq 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Wang *et al.*, 2011). O teste de CIM mostrou que existe diferença dos resultados obtidos entre os testes em meio líquido e em meio sólido, no qual este último apresentou atividade antibacteriana baixa para o composto F_{p6.2}. Dos compostos isolados desta espécie, destaca-se a beuvarecina, no qual Wang e colaboradores demonstram que a concentração inibitória mínima foi de $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Contudo, este ciclopeptídeo pode estar relacionado à disfunção mitocondrial e na homeostase de íons, devido à propriedade de atuar como ionóforo (Tonshin *et*

al., 2010). Zhan *et al.* (2007) também demonstraram que esse composto apresenta alta atividade anti-angiogênica. Além da beuvarecina, diversos metabólitos foram isolados desta espécie de fungo como: derivados de oxisporidonona (Breinholt *et al.*, 1997; Jayasinghe *et al.*, 2006), sambutoxina (Kim *et al.*, 1995), vortimanina (Abbas e Mirocha, 1988; Jayasinghe *et al.*, 2006), derivados de enantianinas (Jayasinghe *et al.*, 2006) e fumonisinas (Proctor *et al.*, 2008). Os dados obtidos não são comparáveis a nenhum dos metabólitos isolados que foram pesquisados. Entretanto, o composto mostra relativa similaridade com a bicaverina, um pigmento vermelho isolado do micélio de fungos do gênero *Fusarium* (Kjaer *et al.*, 1971; Zhan *et al.*, 2007), porém as massas moleculares entre o composto isolado e a bicaverina são diferentes. Isso sugere que o composto em questão possa ser um derivado da bicaverina. Diversos trabalhos na literatura mostram que a bicaverina apresenta forte atividade antileishmania (*Leishmania brasiliensis*), mas é ineficaz contra outros protozoários (Balan *et al.*, 1970); antinematóide frente a *Bursaphelencus xylophilus*, com uma ação moderada (Kwon *et al.*, 2007); e antifúngica, frente a diversos fungos filamentosos (Kim *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2008). Todavia, atividade antibacteriana para bicaverina e derivados ainda não foram descritas.

O extrato do meio líquido apresentou atividade parecida ao do extrato do micélio. Contudo, a quantidade obtida de extrato foi pequena e não conduziu ao isolamento de composto puro. A fração F_{m6}, antes ativa, após a cromatografia, não apresentou atividade, sugerindo que o(s) composto(s) ativo(s) foi(ram) perdido(s) durante o processo ou houve a ocorrência de sinergismo.

Os resultados obtidos comprovam a eficiência de atividade antibacteriana para compostos produzidos por *F. oxysporum* frente à bactérias gram-positivas (*S. aureus*) isoladas de bovinos com mastite, exemplificado pelo composto isolado, no qual apresentou uma atividade antibacteriana moderada. Além disso, o composto isolado apresenta um potencial uso como biossensor e corante, justificando, assim, estudos posteriores para a completa identificação estrutural e ensaios para validar este uso.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se:

- O fungo *Fusarium oxysporum* produz diversos compostos que apresentam potencial atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas (*S. aureus*) isoladas de mastite bovina;
- Parte da atividade antibacteriana é decorrente do composto F_{p6.2}, cuja atividade foi considerada moderada (31,25 e 62,50 µg.mL⁻¹);
- Apesar de dados cromatográficos mostrarem que o composto em questão apresentou um elevado grau de pureza e dados espectroscópicos denotarem um elevado grau de conjugação eletrônica na estrutura da molécula, há a necessidade de novas análises para a completa identificação estrutural do composto.
- Além disso, os dados obtidos neste trabalho justificam a continuidade dos estudos visando futuramente o desenvolvimento de biosensores e corantes, a partir deste composto, bem como estudos para otimização de produção do mesmo pelo fungo foco do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altomare, C.; Pengue, R.; Favilla, M.; Evidente, A.; Visconti, A. 2004. **Structure-activity relationship of derivatives of fusapyrone, na antifungal metabolite from *Fusarium semitectum***. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 52, p. 2997-3001.

Avalos, J.; Estrada, A.F. 2010. **Regulation by light in *Fusarium***. Fungal Genetics and Biology. v. 47, p. 930-938.

Baayen, R.P.; O'Donnell, K.; Bonants, P.J.J.M.; Cigelnik, E.; Kroon, L.P.N.M.; Roebroek, E.J.A.; Waalwijk, C. 2000. **Gene genealogies and AFLP analyses in *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease**. Phytopathology. v. 90, p. 891–900.

Balan, J.; Fuska, J.; Kuhr, I.; Kuhrová, V. 1970. **Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis***. Folia Microbiologia. v.15, p.479–484.

Barkema, H. W., Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks. 2006. **Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis**. Journal of Dairy Science. v.89, p.1877-1895.

Berdy, J. 2005. **Bioactive Microbial Metabolites**. The Journal Of Antibiotics. v. 58, n. 1, p. 1-26.

Briskin, D.P. 2000. **Medicinal chemicals and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health**. Plant Physiology. v. 124, p. 507–514.

Buonanno, F.; Saltalamacchia, P.; Myake, A. 2005. **Defence function of pigmentocysts in the karyorelictid ciliate *Loxodes striatus***. European Journal of Protistology. v. 41, p. 151-158.

Butler, M.S. 2008. **Natural Products to drugs: Natural products-derived compounds in clinical trials**. Natural Products Report. V.25:p.475-516.

Butler, M.S.; Buss, A.D. 2006. **Natural products – the future scaffolds for novel antibiotics?** Biochemical Pharmacology. v. 71, p. 919-929.

Butler, M.S.; Newman, D.J. 2008. **Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery.** Progress in Drug Research. v.65:p.3-44.

Cândida, D.V.; Costa, J.G.C.; Rava, C.A.; Carneiro, M.S. 2009. **Controle genético da murcha do fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum.** Tropical Plant Pathology. v.34, nº6, p.379-384.

Chakravarthi, B. V. S. K., Prasanta D., Surendranath, K., Karande, A. A., Jayabaskaran, C. 2008. **Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*.** Journal os Bioscience. v. 33(2),p., 259–267.

Chin, Y.W.; Balunas, M.J.; Chai, H.B.; Kinghorn, A.D. 2006. **Drug discovery from natural sources.** The APPS Journal. v. 8, article 2, p. 239-253.

Chung, W.H.; Chung, W.C.; Ting, P.F.; Ru, C.C.; Huang, H.C.; Huang, J.W. 2009. **Nature of Resistance to Methyl Benzimidazole Carbamate Fungicides in *Fusarium oxysporum* f.sp. lili and *F. oxysporum* f.sp. gladioli in Taiwan.** Journal of Phytopathology. v. 157, p. 742-747.

Clardy, J. e Walsh, C. 2004. **Lessons from natural molecules.** Nature, v.432, p.829-837.

Couto, E.F., Coelho, R.S.B., Suassuna, N.D., Oliveira, S.M.A. 2009. **Avaliação de indutores de resistência em algodoeiro a murcha de fusário: atividade enzimática e índice de infecção.** Tropical Plant Pathology. v.34, nº5, p.352-356.

Cragg, G. M. e Newman, D. J. 2007. **Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos.** In: R. A. Yunes e V. C. Filho (Ed.). Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia. Itajaí: Univali, p.49-79

Cullor, J. S., Tyler, J. W., Smith, B. P. **Distúrbios da glândula mamária.**In: SMITH, B. P. Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais. São Paulo, 1994. v.2, p.1041-1060.

Cunha, R.P.L.; Molina, L.R.; Carvalho, A.V. **Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número e lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa.** Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, p.19-24, 2008.

Desjardins, A.E. 2006. **Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology.** St Paul, MN: APS Press.

Dienstmann, R.; Picoli, S.U., Meyer, G., Schenkel, T., Steyer, J. 2010. **Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteraceae* de ambiente hospitalar.** Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial. v. 46, nº 1, p.23-27.

Desjardins, A.E., Proctor, R.H. 2007. **Molecular biology of Fusarium mycotoxins.** International Journal of Food Microbiology. v.119, p.47–50.

Edel, V.; Steinberg, C.; Gautheron, N.; Recorbet, G.; Alabouvette, C. 2001. **Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France.** FEMS: Microbiology Ecology. v. 36, p. 61-71.

El-Rafie, M.H.; Mohamed, A.A.; Shaheen, Th.I.; Hebeish, A. 2010. **Antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics.** Carbohydrate polymers. v.80, p. 779-782.

Feßler, A.; Scott, C.; Kadlec, K.; Ehricht, R.; Monecke, S.; Schwarz, S. 2010. **Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 65, p. 619-625.

Ferraro, M. J.; Wikler, M.; Craig, W.; Dudley, M.; Eliopoulos, G.; Hecht, D.; Hindler, J.; Reller, L. B.; Sheldon, A.T.; Swenson, J.; Tenover, F.C.; Testa, R.T.; Weinstein, M.P. 2003. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão; NCCLS Norma aprovada.** Oitava edição, v.23, n.1.

Feldmann, R., Pinto, L.G. **Aumenta o número de hospitais com casos da bactéria KPC.** Globo. Seção DFTV. Disponível em: <<http://dftv.globo.com/Jornalismo/DFTV/0,,MUL1623403-10040,00.html>>. Acessado em: 26/06/2011.

Fischbach, M.A. 2009. **Antibiotics from microbes: converging to kill.** Current Opinion in Microbiology. v. 12, p. 520-527.

Galloway, W.R.J.D; Isidro-Lolobet, A.; Spring, D.R. 2010. **Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules.** Nature Communications. v.1, número do artigo 80.

Glenn A.E. 2007. **Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed.** Animal Feed Science and Technology, v. 137, p. 213-240.

Guella, G.; Frassinio, R.; Mancini I.; Sandron, T.; Modeo, L. Verni, F.; Dini, F.; Petroni, G. 2010. **Keronopsamides, a New Class of Pigments from Marine Ciliates.** European Journal of Organic Chemistry. p. 427-434.

Gutleb, A.C., Morrison, E., Murk, A.J. 2002. **Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 11, p. 309-320.

G1 notícias. ***E. coli* sobrecarrega hospitais e já chega a 22 mortes.** Atualizado em: 06/06/2011. Disponível em: <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2011/06/ecoli-sobrecarrega-hospitais-alemaes-e-chega-22-mortes.html>. Acessado em: 25/06/2011.

Harvey, A.L. 2008. **Natural products in drug Discovery.** Drug Discovery Today. v. 13, n. 19/20. p. 894-901.

Heath, B. 2011. Produtores do Reino Unido perdem US\$ 4,05 mi com *E.coli*. G1 notícias, globo.com. Atualizado em: 15/06/2011, as 13h58. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/06/produtores-do-reino-unido-perdem-us-405-mi-com-ecoli.html>. Acessado em: 25/06/2011.

Hebert, A.; Sayasith,K. ; Senechal, S. ; Dubreuil, P.; Lagace,J. 2000. **Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk.** Microbiology Letters. v.193, p.57-62.

Henriques, A. T., Kerber, V.A., Moreno, P.R.H. **Alcalóides: Generalidades e Aspectos Básicos.** In: C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, *et al* (Ed.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 1ª Edição, 1999. p.641-665.

Hillerton, J.E.; Berry, E.A. 2005. **Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism.** Journal of Applied Microbiology. v. 98, p. 1250-1255.

Holanda Júnior, E.V.; Madalena; F. E., Holanda, E.D.; Miranda, W.M., Souza, M.R. 2005. **Impacto econômico da mastite em seis fazendas da região de Araxá – Minas Gerais, Brasil.** Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal. v. 13, nº 2, p. 63-69.

Imhoff, J.F.; Labes, A.; Wiese, J. 2011. **Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products.** Biothechnology Advances. Avaliável online. JBA-06386, n pg 5.

Jayaram, R.; Ramakrishnan, N. 2008. **Cost of intensive care in India.** Indian Journal of Critical Care Medicine. v.12, p.55-61.

Jayasinghe, L; Abbas, H.K.; Jacob, M.R.; Herath, W.H.M.W.; Nanaykkara, N.P.D. 2006. **N-methyl-4-hidroxy-2-pyridinone Analogues from *Fusarium oxysporum*.** Journal of Natural Products. v.69, p.439-442.

Ji, H-F.; Li, X-J; Zhang, H-Y. 2009. **Natural products and drug discovery.** EMBO Reports. v. 10, n. 3, p. 194-200.

Jin, J.M.; Lee, S.; Lee, J.; Baek, S.R.; Kim, J.C.; Yum, S.H.; Park, S.Y.; Kang, S.; Lee, Y.W. 2010. **Functional characterization and manipulation of the apicidin biosynthetic pathway in *Fusarium semitectum*.** Molecular Microbiology. v. 76, n 2, p. 456-466.

Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. 2007. **HPLC theory and practice**. In: HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley. Cap. 1, p. 1-25.

Kettout, T.A.; Rahmania, F. 2010. **Identification par CG-SM de l'acide phtalique produit par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud**. Comptes Rendus Biologies. v. 333, p. 808-813.

Kim, H-Y.; Choi, G.J.; Lee, H.B.; Lee, S-W.; Lim, H.K.; Jang, K.S.; Son, S.W.; Lee, S.O. 2007. **Some fungal endophytes from vegetable crops and their antiomycete activities against tomato late blight**. Letters Applied Microbiology. v.44, p.332–227.

Kjaer, D.; Kjaer, A. Pedersen C. 1971. **Bikaverin And norbikaverin, benzoxanthetrione pigments Of *Gibberella fujikuroi***. Journal of Chemical Society. p. 2792-2797.

Koehn, F.E; Carter, G.T. 2005. **The evolving role of natural products in drug discovery**. Nature reviews: Drug Discovery. v. 4, p. 206-220.

Kwon, H.R.; Son, S.W.; Han, H.R.; Choi, G.J.; Jang, K.S.; Choi, Y.H.; Lee, S.; Sung, N.D.; Kim, J-C. 2007. **Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus***. Plant Pathology Journal. v.23, p.318–321.

Lacasse P, Lauzon K, Diarra MS, Petitclerc D. 2008. **Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens**. Journal of Animal Science.;v.83, p.66-71.

Lee, H-S.; Kan, J-W.; Kim, B.H.; Park, S-G.; Lee, C. 2011. **Statistical optimization of culture conditions for the production of enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P**. Journal of Bioscience and Bioengineering. v. 111, n. 3, p. 279–285

Leite, A.C.L.; Vieira, R.F.; Faria, A.R.; ; Wanderley, A.G.; Afiatpour, P.; Ximenes, .C.P.A.; Srivastava, R.M.; Oliveira, C.F.; Medeiros, M.V.; Antunes, E.; Brondani, D.J. **Synthesis anti-inflammatory and antimicrobial**

activities of new 1.2.4-oxadiazoles peptidomimetics. *Il Farmaco.* v. 55, p. 719- 724.

Leite, J.P.V. 2009. **Química de produtos naturais: uma abordagem biossintética.** In.: *Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas.* São Paulo: Atheneu. Cap. 3, p 48-94.

Levy, S.B.; Marshall, B. 2004. **Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses.** *Nature Medicine.* v. 10, n. 12, p. 122-129.

Li, J.H-W.; Vederas, J.C.; 2009. **Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?** *Science.* v. 325, p. 161-165.

Liu, X.; Dong, M.; Chen, X.; Jiang, M.; Lv, X.; Zhou, J. 2008. **Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin.** *Applied Microbiological Biotechnology.* v.78, p.241–247.

Machado, T.R.O.; Correa, M.G. e Marin, J.M. 2008. **Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococci* coagulase-negativa isoladas de leite de bovinos com mastite no Brasil.** *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia.* v.60, n.1, p. 278-282.

Martins, R.P.; da Silva, J.A.G.; Nakazato, L.; Dutra, V.; de Almeida Filho, E.S. 2010.**Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina namicrorregião de Cuiabá, MT.** *Ciências Animais Brasileiras.* v.11, n.1, 181-187.

Matouskova, I.; Janout, V. 2008. **Current knowledge of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Biomedic Pappers of Medicinal Faculty University of Palacky Olomouc, Czech Republic.* v.152, p.191–202.

Monneret, C. 2010. **Impact actuel dès produits natureles sur la découverte de nouveaux médicaments anticancéreux.** *Annales Pharmaceutiques Françaises.* v. 68, p. 218-232.

- Müller, E.E. 2002. **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite.** Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil. p. 206-217.
- Nagia, F.A.; El-Mohammed, R.S.R. 2007. **Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*.** Dyes and Pigments. v.75,p. 550-555.
- Nelson, P.E.; Dignani, M.C.; Anaissie, E.F. (1994). Taxonomy, **Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species.** Clinical Microbiology Review, v.7(4); p.479-504.
- Nielsen, K.; Larsen, T.; Frisvald, J. 2004. **Lightweight expanden clay aggregates (LECA), a new up-scaleable matrix for production of microfungal metabolites.** The Journal Of Antibiotics. v. 57, n. 1, p. 29-36.
- Nunes, S.F.; Cavaco, L.M.; Vilela, C.L.; Bexiga R. 2007. **Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal.** Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. v. 102, p. 275-280.
- Osborne, L.E.; Stein, J.M. 2007. **Epidemiology of fusarium head blight on small-grain cereals.** International Journal of Food Microbiology. v. 119, p. 103-108.
- Otrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, M.E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R. 2008. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 18, n. 2, p. 301-307.
- Paz, Z.; Komon-Zlezowska, M.; Druzhinina, I.S.; Aveskamp, M.M.; Shnaiderman, A.; Aluma, Y. 2010. **Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge.** Fungi Diversity. v. 42, p. 17–26.

Pfeifer, Y.; Cullik, A.; Witte, W. 2010. **Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens.** International Journal of Medical Microbiology. v. 300, p. 371-379.

Pieters, L., Vlietinck, A.J. 2005. **Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?** Journal of Ethnopharmacology v. 100, p.57–60.

Phillips, J. B.; Smith, A. E.; Kusche, B. R.; Bessette, Jr., B. A.; Swain III, P. W.; Bergmeier, S. C.; McMills, M. C.; Wright, D. L.; Priestley, N. D. 2010. **Natural product derivatives with bactericidal activity against Gram-positive pathogens including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. v. 20, p. 5936-5938.

Proctor, R.H.; Busman, M.; Seo, J.A.; Lee, Y.W.; Plattner, R.D. 2008. **A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production.** Fungal Genetics and Biology. v. 45, p. 1016-1026.

Rateb ME, Ebel R. 2011. **Secondary metabolites of fungi from marine habitats.** Natural Products Report. v.28, p.290–344.

Rhaston, G.M. 2008. **Natural products as a robust source of new drugs and new leads: Past successes and present day issues.** American Journal of Cardiology. v. 101, p. 43-49.

Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M.S.; Hussain, H.; Lee, Y.S.; Riaz, N.; Jabbar, A. 2009. **Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates.** Natural Products Reports. v. 27, p. 238-254.

Silva, M.G.; Furtado, N.A.J.C; Pupo, M.T.; Fonseca, M.J.V.; Said, S.; Filho, A.A.S.; Bastos, J.K. 2004. **Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx.** Microbiological Research. v. 159, p. 317-322.

Simmons, K.J.; Chopra, I.; Fishwick, C.W.G. 2010. **Structure-based discovery of antibacterial drugs.** Nature Reviews; Microbiology. v. 8, p. 501-510.

Son, S.W.; Kim, H.Y.; Choi, G.J.; Lim, H.K.; Jang, K.S.; Lee, S.O.; Lee, S.; Sung, N.D.; Kim, J.C. 2008. **Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*.** Journal Applied of Microbiology. v.104, p.692–698

Steinkellner S, Mammerler R, Vierheilig H. 2008. **Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains.** European Journal of Plant Pathology.; v. 122: p.395-401.

Takahashi, J.A.; Monteiro de Castro, M.C; Souza, G.G.; Lucas, E.M.F; Bracarense, A.A.P; Abreu, L.M; Marriel, I.E.; Oliveira, M.S.; Floreano, M.B.; Oliveira T.S. 2008. **Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*.** Journal de Mycologie Médicale. v. 18, p.198-204.

Toshin, A.A.; Teplova V.V.; Andersson, M.A.; Salkinoja-Salonen, M.S. 2010. **The *Fusarium* mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis.** Toxicology. v. 276, p. 49-57.

Tozzetti, D.S; Bataier, M.B.N., Almeida, L. R. 2008. **Prevenção, Controle E Tratamento Das Mastites Bovinas – Revisão De Literatura.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano VI. v. 10. Janeiro de 2008.

Wang, G.Q.; Cong-Ming, Wu; Du, X.D.; Shen, Z.Q.; Song, L.H.; Chen, X.; Shen, J.Z. 2008. **Characterization of integrons-mediated antimicrobial resistance among *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis.** Veterinary Microbiology. v.127, p.73-78.

Wang, Q-X.; Li, S-F.; Zhao, F.; Dai, H-Q.; Bao, L.; Ding, R.; Gao, H.; Zhang. L-X.; Wen, H-A.; Liu, H-W. 2011. **Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*.** Fitoterapia. v. 82, p. 777-781.

Walsh, C. 2003. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. ASM Press; 1 edition. USA.

Yuliana, N.D.; Khatib, A.; Choi, Y.H.; Verpoort, R. 2011. **Metabolomics for bioactivity assessment of natural products**. Phytoterpy Research. v. 25, p. 157-169.

Zafalon, L.F.; Nader Filho, A.; de Carvalho, M.R.B.; de Lima, T.M.A. 2008. **Influência da mastite subclínica bovina sobre as frações protéicas do leite**. Arquivos do Instituto Biológico. v. 75, n. 2, p. 135-140.

Zhan, J.; Burns, A.M.; Liu, M.X.; Faeth, S.H.; Gunatilaka, A.A.L. 2007. **Search for Cell Motility and Angiogenesis Inhibitors with Potential Anticancer Activity: Beauvericin and Other Constituents of Two Endophytic Strains of *Fusarium oxysporum***. Journal of Natural Products. v.70, p.227-232.

Zhang Y, Mu J, Feng Y, Kang Y, Zhang J, Gu PJ. 2009. **Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy**. Marine Drugs. v.7, p.97-112.