

COMPLEXO TECNOLÓGICO DE MEDICAMENTOS
FARMANGUINHOS

Suellen de Carvalho Mendonça

**NOVOS METABÓLITOS FÚNGICOS COM PROMISSORAS
PERSPECTIVAS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Rio de Janeiro

2011

Suellen de Carvalho Mendonça

**NOVOS METABÓLITOS FÚNGICOS COM PROMISSORAS
PERSPECTIVAS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Monografia apresentada ao curso de Pós-Graduação *Latu Sensu*
como requisito para obtenção do título de Especialista em
Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza

Rio de Janeiro

2011

G635a Mendonça, Suellen de Carvalho

Novos metabólitos fúngicos com promissoras perspectivas no tratamento da Tuberculose. Rio de Janeiro: [s.n.].2011. 51 f.

Trabalho de Conclusão de Curso. Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos. Coordenação de Ensino.

Orientador: Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza

1- Tuberculose 2- Fármacos 3- Fungos

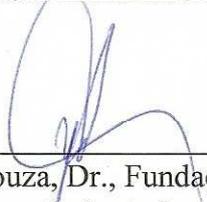
CDD 616.9883

Suellen de Carvalho Mendonça

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação Lato Sensu do Instituto de Tecnologia de Fármacos-Farmanguinhos/FIOCRUZ, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza

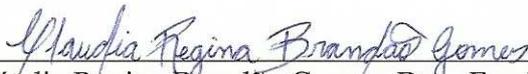
BANCA EXAMINADORA



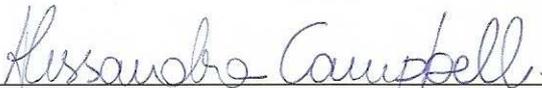
Marcus Vinícius Nora de Souza, Dr., Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ
Orientador



Marcelle de Lima Ferreira, MSc, Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ



Cláudia Regina Brandão Gomes, Dra., Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ



Alessandra Campbell Pinheiro, Dra., Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ
Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, que sempre me apoiou em meus estudos e ao meu pai “*In Memoriam*” que, com certeza, esteve ao meu lado durante todo o meu percurso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar com saúde e força.

À minha mãe, por toda ajuda e compreensão mesmo nos tempos em que eu estava longe.

Ao Vinícius, que além de ser um companheiro perfeito, é um exemplo para mim.

Aos meus queridos sogros, Carlos e Denise, por todo o apoio oferecido desde que me conheceram.

Aos meus amigos, em especial o Emanuel Jr., por ter consertado minha pen-drive, o que salvou esta monografia.

Ao Departamento de Ensino de Farmanguinhos, pela oportunidade de cursar uma especialização tão importante para meu futuro profissional.

Ao meu orientador, Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza por aceitar, em meio a tantos compromissos, me orientar e fazê-lo com tanta dedicação.

“Eu desejo uma doença grave, perigosa, longa mesma (sic), pois já me cansa essa monotonia da boa saúde. Mas queria a tísica com todas as suas peripécias, queria ir definhando liricamente, soltando sempre os últimos cantos da vida e depois expirar no meio de perfumes debaixo do céu azulado da Itália, ou no meio dessa natureza sublime que rodeia o Queimado.”

Casimiro de Abreu – 1858

RESUMO

A tuberculose (TB) tornou-se, novamente, um sério problema de saúde pública, sendo responsável pela morte de 1,7 milhões de pessoas a cada ano e com estimativas de infecção de 30% da população mundial. Tendo em vista a importância da TB em nossos dias, sobretudo no que diz respeito às dificuldades do tratamento e as crescentes limitações nos fármacos empregados, devido ao surgimento de bactérias super resistentes, o objetivo desse trabalho é destacar o fundamental papel dos fungos e seus metabólitos como promissora fonte de novos candidatos a fármacos na luta contra a tuberculose. Para tanto, realizou-se uma pesquisa bibliográfica dos últimos 11 anos a fim de encontrar diversos metabólitos baseados em fungos na busca de novos protótipos que pudessem servir de base para novos fármacos anti-tuberculose. Assim, dos diversos fármacos avaliados, dois se mostraram muito promissores, a pleuromutilina e a capuromicina, que servirão como base na síntese de novas substâncias baseadas nesses tipos de produtos naturais, sendo avaliadas como novos tuberculostáticos.

Palavras – chave: Tuberculose, fármacos, fungos.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) has become, again, a serious problem in the public health, it is responsible for over 1,7 Million people dying every year and with a estimative of infection of about 30% of the worldwide population. Having in mind the importance of TB nowadays, especially regarding the difficulties of treatment and the rising limitation on appointed drugs due to the forthcoming of super resistant bacteria, the objective of this report is to outstand the main role of fungi and their metabolites as a promising source of kinds of drugs in the fight against Tuberculosis. Therefore, a biological survey about the last 11 years was held in order to find out several metabolites based on fungi in search of new prototypes that could be the base for new anti tuberculosis drugs. Thus, from several kinds of drugs evaluated two were shown to be quite promissory, the pleuromutilin and the capreomycin which will fit as a base in the synthesis of new substances based on those sorts of natural products, being evaluated as new drugs against tuberculosis.

Key – words : Tuberculosis, drugs, fungi.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Taxa de incidência de tuberculose por país em 2007.....	13
Figura 2: Casos de co-infecção TB-HIV em 2007.....	14
Figura 3: Distribuição da taxa de incidência de tuberculose no Brasil em 2007.....	15
Figura 4: Fármacos comumente utilizados no tratamento da TB.....	16
Figura 5: Fármacos de segunda escolha no tratamento de TB.....	17
Figura 6: Países com casos de TB altamente resistente.....	19
Figura 7: Estrutura química da penicilina.....	26
Figura 8: Estrutura química da Estreptomicina isolada do fungo <i>Streptomyces griseus</i> e seus co-descobridores Selman Waksman e Albert Schatz.....	29
Figura 9: Estrutura de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose isolados a partir de fungos.....	31
Figura 10: Estrutura da rifampicina.....	32
Figura 11: Pleuromutilina e seus derivados.....	35
Figura 12: Relação estrutura atividade da pleuromutilina.....	35
Figura 13: Mecanismo de ação dos derivados pleuromutilínicos.....	37
Figura 14: Estrutura da retapamulina.....	37
Figura 15: Metabólitos inativos da azamulina.....	38
Figura 16: Representação da parede celular de bactérias.....	40
Figura 17: Biossíntese do peptidoglicano.....	41
Figura 18: Biossíntese do Lipídeo I.....	41
Figura 19: Estrutura da Capuramicina.....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Utilização de espécies fúngicas.....	24
Quadro 2: exemplos de fármacos obtidos a partir de fungos.....	27
Quadro 3: Análogos da Capuramicina e sua atividade antimicrobiana.....	43
Quadro 4: Análogos acilados da Capuramicina e sua atividade antimicrobiana.....	44
Quadro 5: Análogos da capuramicina sintetizados pela empresa japonesa Sankyo e sua atividade antimicrobiana.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 A Doença.....	12
1.2 Dados Estatísticos.....	12
1.3 Fármacos Utilizados no Tratamento da Tuberculose.....	15
1.4 MDR e XDR: Os Novos Nomes da Tuberculose.....	18
2 FUNGOS.....	20
2.1 Classificação.....	21
2.2 Estrutura.....	21
2.3 Metabolismo.....	22
2.4 Utilização.....	24
3 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS EM QUÍMICA MEDICINAL.....	25
4 METABÓLICOS FÚNGICOS NA MEDINA.....	26
5 A DESCOBERTA DA STREPTOMICINA: a Substância que revolucionou o tratamento da tuberculose.....	29
6 PROMISSORES PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE FUNGOS.....	34
6.1 Pleuromutilina.....	34
6.1.1 Mecanismo de ação dos derivados pleuromutilínicos.....	36
6.2 Capuramicina.....	39
6.2.1 <i>Mycobacterium sp.</i> e Translocase I.....	39
6.2.2 Classe das Capuramicinas.....	42
7 CONCLUSÃO.....	46
8 REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Após várias décadas de negligência, a tuberculose (TB) está começando a receber atenção de vários setores da sociedade como um problema de saúde pública global. Governos, indústrias e organizações filantrópicas estão começando a investir esforços para controlar essa doença. Embora a maior parte desses recursos seja direcionada a programas de controle em países onde a epidemia é mais severa, há também financiamentos em diversos outros setores como, por exemplo, em pesquisa básica e desenvolvimento de novos diagnósticos, tratamentos e fármacos.

Até hoje, o progresso no desenvolvimento de novos fármacos tuberculostáticos tem sido impedido por dois fatores principais: primeiro a crença de que não há grande necessidade de novos medicamentos no mercado, e segundo a percepção de que o alto custo do investimento é insuficiente para garantir retorno ao mesmo. As multinacionais farmacêuticas alegam que o custo para se desenvolver um fármaco, desde o laboratório até o mercado, é aproximadamente da ordem de 300 a 500 milhões de dólares, tendo os maiores custos com a fase clínica. Além disso, essas indústrias estimam que o mercado potencial retornaria cerca de 150 milhões de dólares por ano, insuficiente para muitas empresas, que não consideram mercados de menos de 200 milhões de dólares anuais. Outro fator que impede o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB é a alta concentração de casos dessa doença em países em desenvolvimento, e dessa forma as companhias farmacêuticas temem não haver mercado, pois poucas pessoas poderiam pagar altos preços por novos medicamentos (TBALLIANCE, 2001).

Com o objetivo de proporcionar uma melhor compreensão dessa doença, as próximas seções irão abordar importantes aspectos da TB tais como sua história, dados estatísticos, tratamentos utilizados, mecanismos de ação e fármacos em fase de testes clínicos.

1.1 A Doença

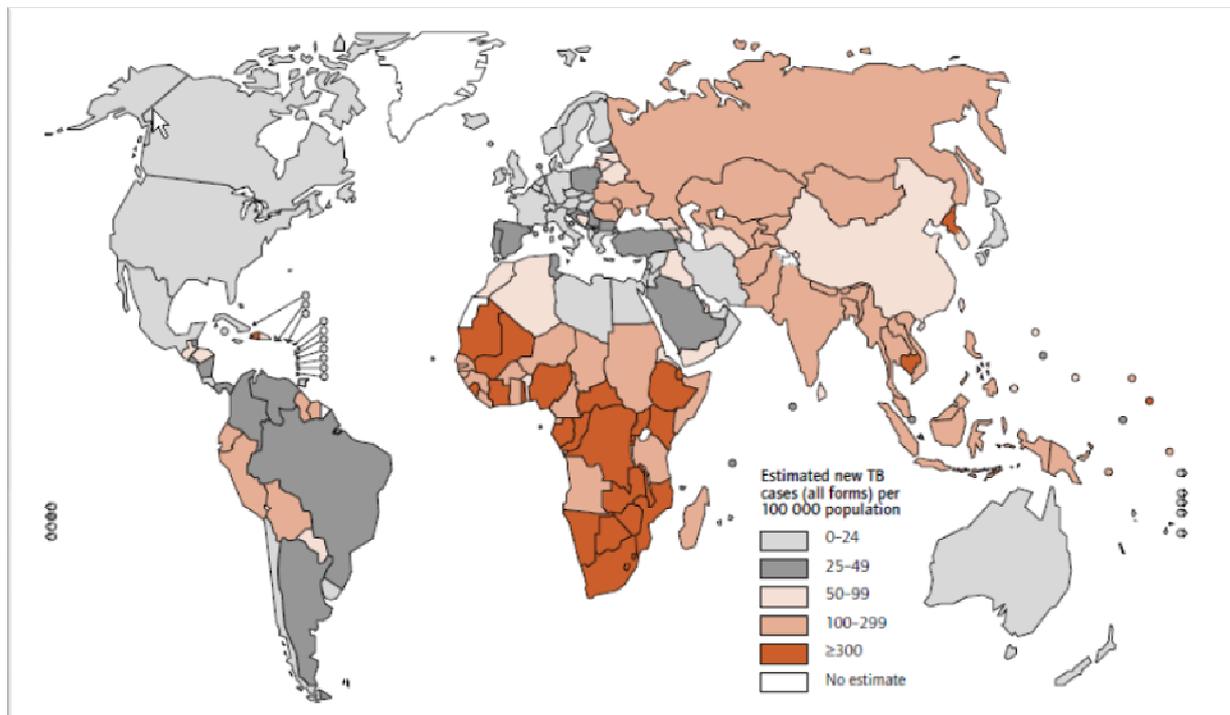
A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa grave, com relatos médicos na Grécia e Roma antiga e, atualmente, acredita-se que essa doença já era conhecida também no antigo Egito, já que pesquisadores encontraram lesões pulmonares em múmias (MUNCH, 2003; KAUFMANN, 2003). No entanto, somente em 1882 o agente etiológico responsável pela doença, o *Mycobacterium tuberculosis*, foi isolado pelo cientista alemão Robert Koch e, em sua homenagem, essa bactéria ficou conhecida também como bacilo de Koch (BK) (MUNCH, 2003; KAUFMANN, 2003).

A tuberculose é transmitida basicamente pelo ar e pode atingir todos os órgãos do corpo, porém como o BK se reproduz e se desenvolve rapidamente em áreas do corpo com muito oxigênio, o pulmão é o principal órgão atingido pela doença (SMITH, 2004). O espirro ou tosse de uma pessoa infectada dispersa no ar cerca de 2 milhões de bacilos que permanecem em suspensão durante horas. Os sintomas da doença geralmente são tosse crônica, febre, suor noturno, dor no tórax, anorexia (perda de apetite) e adinamia (falta de disposição). (DE SOUZA, 2005).

1.2 Dados Estatísticos

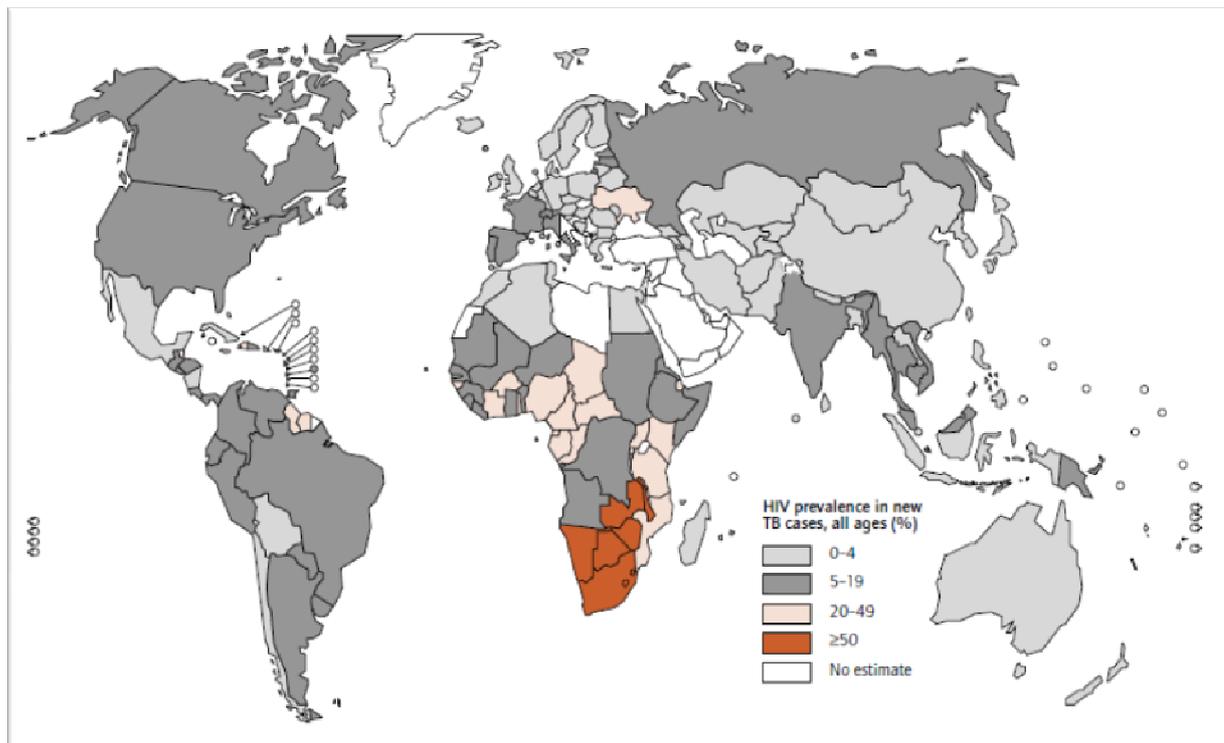
As estatísticas nacionais e internacionais não deixam dúvida e servem de alerta para o grave problema de saúde pública mundial que representa essa doença. Cerca de um terço da população mundial, aproximadamente 2 bilhões de pessoas, estão infectadas com o bacilo (Figura 1). Em 2007, das 9,27 milhões de pessoas que desenvolveram a doença (139 por 100.000 habitantes), 14,8% eram pessoas co-infectadas pelo vírus HIV e 3,1% desenvolveram tuberculose multi-resistente). Índia, China, Indonésia, Nigéria e África do sul englobam 50% dos casos de tuberculose no mundo (só na Índia uma pessoa morre de TB a cada minuto). Entre os 15 países com maior taxa de incidência de tuberculose 13 estão na África, em decorrência das altas taxas de co-infecção pelo vírus HIV (Figura 2). (OMS (a), 2009).

Figura 1. Taxa de incidência de tuberculose por país em 2007.



Fonte: OMS (a), 2009

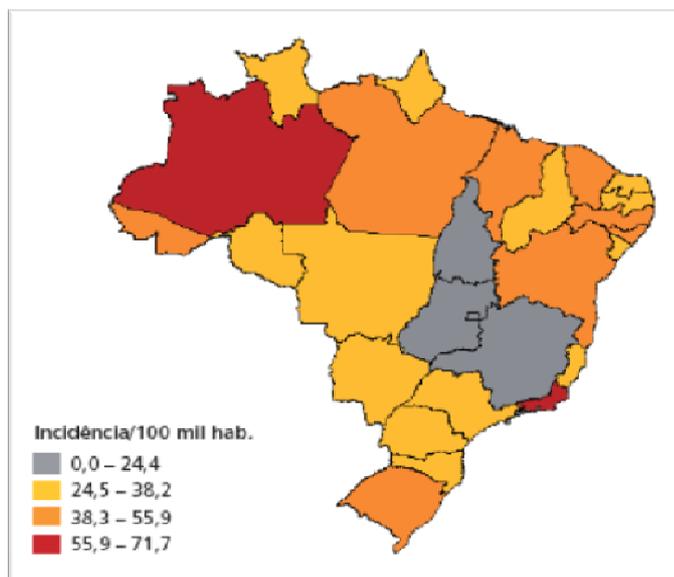
Figura 2. Casos de co-infecção TB-HIV em 2007.



Fonte: OMS (a), 2009

O Brasil ocupa o 14º lugar no *ranking* dos 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo (OMS (a), 2009). De acordo com os dados oficiais do Ministério da Saúde, em 2007, foram notificados 72049 novos casos de tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE (a), 2009). Em Estados como o Amazonas e o Rio de Janeiro, a taxa de incidência de tuberculose quase dobra em relação à média nacional (Figura 3). Algumas áreas, como a comunidade da Rocinha no Rio de Janeiro ou a região do Murialto em Porto Alegre, apresentam taxas acima dos 500 casos por 100.000 habitantes, o que representa mais de 12 vezes a média nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE (b), 2009).

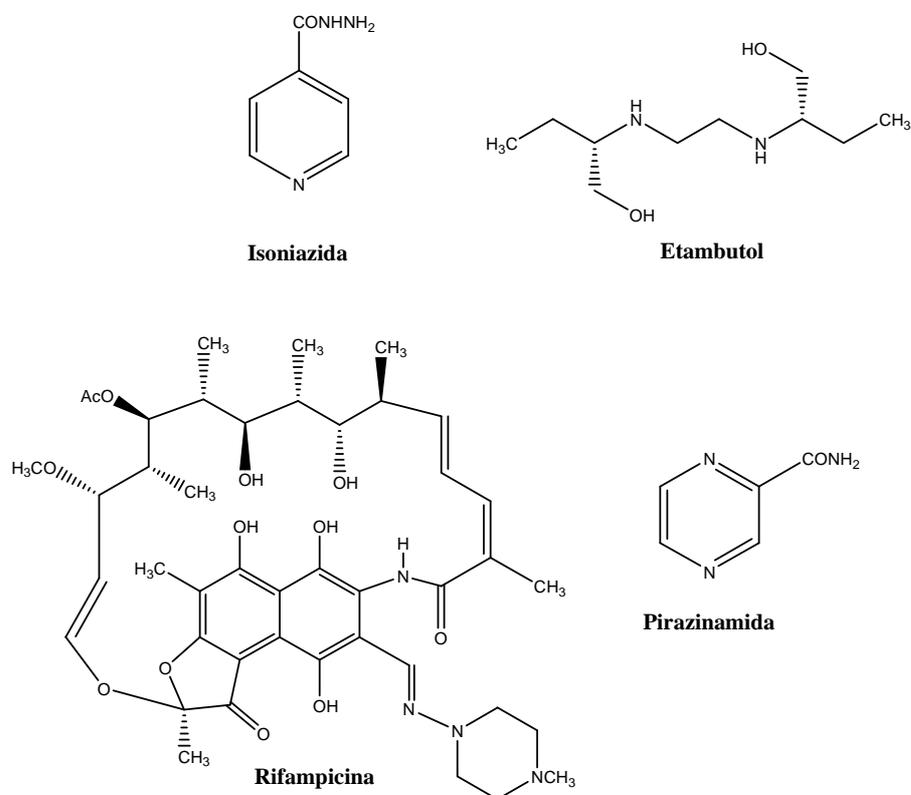
Figura 3. Distribuição da taxa de incidência de tuberculose no Brasil em 2007.



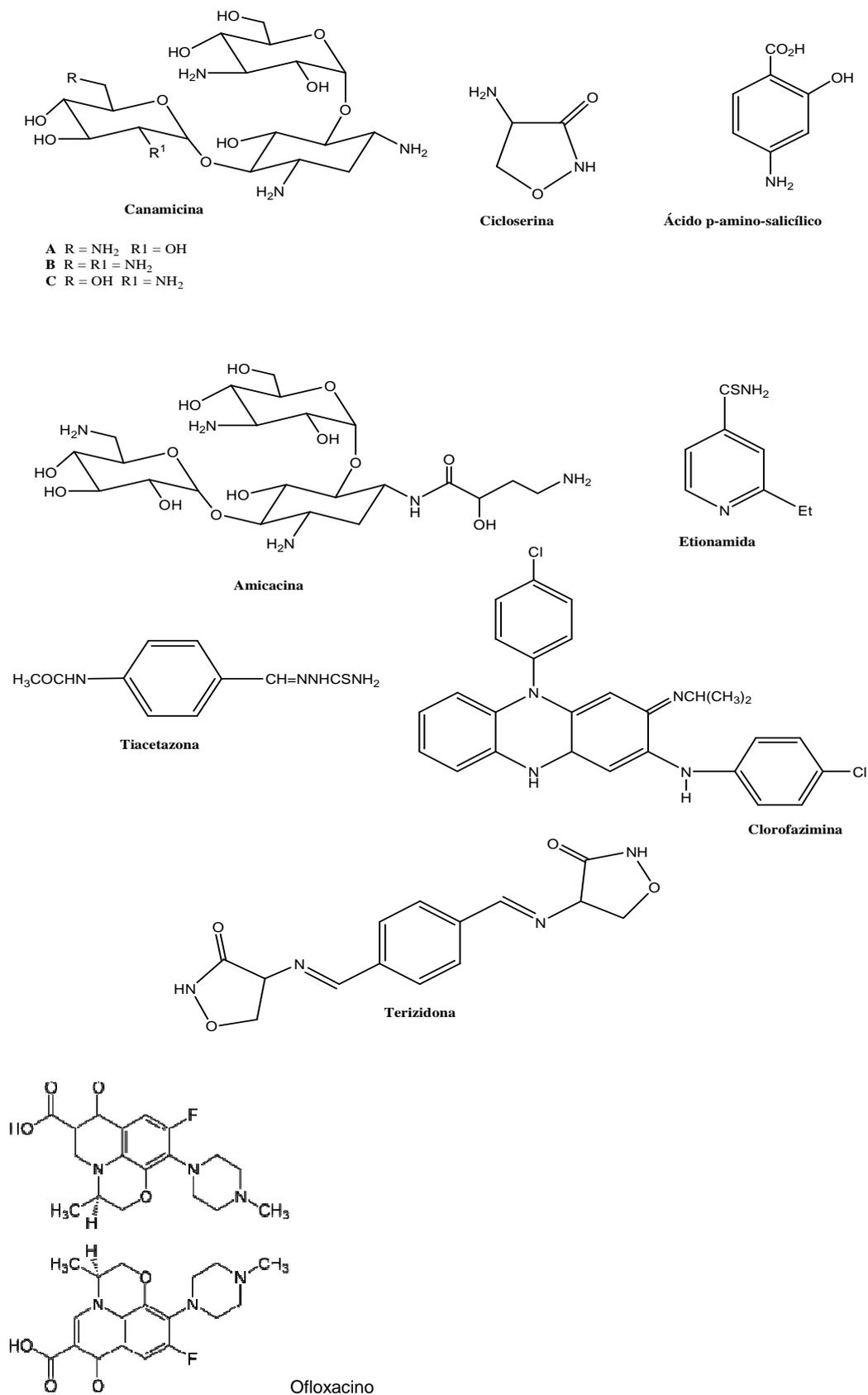
Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (c), 2009.

1.3 Fármacos Utilizados no Tratamento da Tuberculose

Os progressos mais significativos no desenvolvimento de fármacos anti-TB ocorreram a mais de 45 anos. O tratamento corrente utiliza uma combinação dos fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) (Figura 4). Todos os quatro fármacos são utilizados na fase inicial do tratamento, que dura dois meses e é conhecida como fase intensiva, e então a isoniazida e a rifampicina continuam sendo administradas durante os quatro meses seguintes, na fase de continuação. Quando seguido como recomendado, esse regime é altamente eficiente com aproximadamente 95% de cura.

Figura 4. Fármacos comumente utilizados no tratamento da TB.

Por não estarem mais protegidos por patentes, os fármacos de primeira escolha apresentam baixo custo, cerca de US\$10-20 para um período de seis meses de tratamento. No entanto, muitos pacientes relatam efeitos colaterais como náuseas, vômitos, icterícia, perda de equilíbrio, asma, alterações visuais, diminuição da audição, neuropatia periférica e até cegueira. Sendo assim, a aderência a este longo tratamento é frequentemente baixa (DE SOUZA, 2005). O abandono do tratamento comumente conduz ao desenvolvimento de bacilos resistentes, sendo necessária a utilização de fármacos de segunda escolha (Figura 5). No entanto, a utilização destes fármacos, de acordo com o quadro clínico do paciente, apresenta algumas desvantagens, como maiores efeitos colaterais, uma maior duração no tratamento (entre 18 e 24 meses) e um alto custo, especialmente em relação ao esquema rifampicina, isoniazida e pirazinamida, que varia entre US\$ 1500 e 3000.

Figura 5. Fármacos de segunda escolha no tratamento de TB.

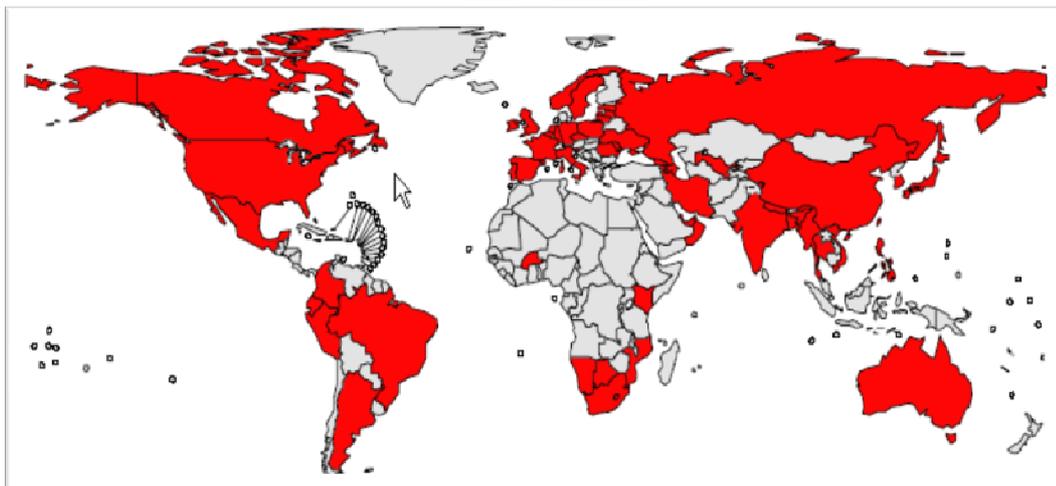
1.4 MDR e XDR: Os Novos Nomes da Tuberculose

A tuberculose voltou a ocupar papel de destaque entre as principais doenças infectocontagiosas devido ao surgimento de superbactérias resistentes a praticamente todos os fármacos utilizados. Atualmente, há uma grande preocupação quanto à disseminação da tuberculose altamente resistente no mundo, pois poucos medicamentos podem ser utilizados hoje no seu tratamento, o que torna essa doença altamente letal.

Muitos foram os fatores que contribuíram para o seu desenvolvimento, podendo-se destacar a desigualdade social, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o envelhecimento da população e o surgimento, na década de 80, da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ou “Acquired Immuno Deficiency Syndrome” (AIDS). (DE SOUZA, 2005).

Existem hoje dois níveis de resistência bacilar: MDR-TB (do inglês, multidrug-resistant tuberculosis ou tuberculose multirresistente) que ocorre quando a bactéria se torna resistente aos dois principais fármacos utilizados na terapia padrão (isoniazida e rifampicina), e XDR-TB (do inglês, extensively drug-resistant tuberculosis ou tuberculose altamente resistente), que ocorre quando a bactéria, além de ser resistente a esses dois fármacos, desenvolve ainda resistência a alguma fluorquinolona e a um dos três fármacos injetáveis de segunda escolha (capreomicina, canamicina ou ampicacina). É importante ressaltar que a XDR-TB foi identificada em 2006 e constitui, atualmente, alarmante problema de resistência bacteriana mundial (Figura 6).

Figura 6. Países com casos de TB altamente resistente



Áreas vermelhas: países que tiveram ao menos um caso de tuberculose altamente resistente até Setembro de 2009.

Fonte: OMS (b), 2009.

Devido à importância da tuberculose no cenário da saúde pública mundial, faz-se necessária à implementação de novas estratégias, terapias, diagnósticos, informações e políticas públicas de saúde no combate a uma das mais importantes doenças infecto-contagiosas de nosso século. Neste contexto, necessita-se com urgência de novos fármacos mais potentes, de baixo custo, com menores efeitos colaterais e com redução do tempo da terapia. Assim sendo, o objetivo desse trabalho é fazer um levantamento bibliográfico da possível utilização de novos metabólitos fúngicos na produção de novos medicamentos com ação contra o *Mycobacterium tuberculosis*, que possam inclusive atuar de forma eficaz contra cepas resistentes aos medicamentos atuais. Na seção seguinte será abordada uma breve descrição dos fungos, bem como suas características, aplicações e sua importância no desenvolvimento de novos fármacos.

2 FUNGOS

Os fungos, também conhecidos como bolores, mofos ou cogumelos, foram considerados durante muito tempo como vegetais devido a semelhanças na morfologia geral e no habitat em que se desenvolvem. Somente a partir de 1969 foram classificados em um reino à parte, o reino Fungi. Aproximadamente 70.000 espécies fúngicas já foram descritas, porém estima-se que exista mais de 1,5 milhão de espécies no mundo. (LOURENÇO, 2010).

Apresentando um conjunto de características próprias que os diferenciam das plantas, os fungos não sintetizam clorofila (são heterótrofos). Os fungos também, não possuem celulose na sua parede celular, com exceção de alguns fungos aquáticos, bem como não armazenam amido como substância reserva. Outra importante característica dos fungos é a sua semelhança às células animais como a capacidade de depositar glicogênio e a presença de substâncias contendo quitina (*N*-acetilglicosamina) na parede celular da maior parte das espécies, o que os torna incomum entre os outros eucariotas. Abundantes em todo o mundo, os fungos são seres vivos eucarióticos, que incluem microorganismos com um só núcleo, como as leveduras e multinucleados, como os fungos filamentosos ou bolores. Suas células possuem vida independente e não se reúnem para formar tecidos verdadeiros. Seu citoplasma contém mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Os componentes principais da parede celular são hexoses e hexoaminas, que formam mananas, ducanas e galactanas. Como dito anteriormente, os fungos possuem parede rica em quitina (*N*-acetil glicosamina), porém, alguns possuem complexos polissacarídios e proteínas, com predominância de cisteína. Podem também apresentar uma cápsula de natureza polissacarídica, que envolve a parede celular para os fungos do gênero *Cryptococcus*, como o *Cryptococcus neoformans*. (GOMIDE, 2009).

2.1 Classificação

O Reino Fungi é dividido em seis filos ou divisões dentre os quais quatro são de importância médica: *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota*.

2.2 Estrutura

Os fungos podem se desenvolver em meios de cultivo especiais formando colônias de dois tipos:

- **Leveduriformes:** Colônias pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas.

- **Filamentosas:** As colônias podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas; são constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo denominados hifas, que podem ser contínuas ou cenocíticas e tabicadas ou septadas.

Ao conjunto de hifas, dá-se o nome de micélio, que pode ser classificado como vegetativo quando se desenvolve no interior do substrato e aéreo quando se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo. (GOMIDE, 2009).

É possível dividir os fungos em dois grandes grupos:

- **Estruturas microscópicas (microfungos):**



Hifa de *Hyaloperonospora parasitica* (míldio penugento) crescendo no tecido foliar de *Arabidopsis thaliana*

Representados pelos bolores e leveduras (LOURENÇO, 2010) são reconhecidos como uma potencial fonte de metabólitos biologicamente ativos com diversas aplicações, tais como antibióticos, antiparasíticos e imunossuppressores. (SILVA, 2008).

- Estruturas macroscópicas (macrofungos):



Armillaria ostoyae

Os macrofungos são, geralmente, conhecidos como cogumelos, utilizados como alimento e na área da toxicologia (tóxicos e alucinógenos). Os micélios dos fungos podem tornar-se visíveis a olho nu, em várias superfícies e substratos como paredes úmidas e comida deteriorada. (LOURENÇO, 2010).

2.3 Metabolismo

Apesar de algumas leveduras fermentadoras se desenvolverem em ambientes com pouco oxigênio ou mesmo em sua ausência, esses microrganismos são considerados, em sua maioria, aeróbios obrigatórios. Além desse fato, muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos como fontes de nitrogênio. O desenvolvimento dos fungos está baseado também em diferentes substâncias e elementos químicos como D-glicose, sais minerais como sulfatos e fosfato e alguns elementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio. No entanto, alguns fungos requerem fatores de crescimento que não conseguem sintetizar, em especial vitaminas como tiamina, biotina, riboflavina, ácido pantotênico etc.

Como todos os seres vivos, os fungos necessitam de água para o seu desenvolvimento sendo que alguns crescem em ambiente com elevada concentração de sal (halofílicos). Outro importante fator para o seu desenvolvimento é a temperatura, que abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas. Os

fungos de importância médica, geralmente são mesófilos, apresentando temperatura ideal entre 20 e 30°C.

Dependendo das variações de temperatura e condições nutricionais de seu desenvolvimento, os fungos podem apresentar morfologias diferentes. O fenômeno de variação morfológica mais importante em micologia médica é o dimorfismo, que se expressa por um crescimento micelial entre 22 e 28°C e leveduriforme entre 35 e 37°C. Em geral, essas formas são reversíveis. A fase micelial (M) ou saprofítica é a forma infectante e está presente no solo, nas plantas etc. A fase leveduriforme (L ou Y) ou parasitária é encontrada nos tecidos. Este fenômeno é conhecido como dimorfismo fúngico e se observa entre fungos de importância médica, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*. Na *Candida albicans* a forma saprofítica infectante é a leveduriforme e a forma parasitária, isolada dos tecidos, é a micelial. Em laboratório, é possível reproduzir o dimorfismo mediante variações de temperatura de incubação, de tensão de O₂ e de meios de cultura específicos. Desta forma foi possível classificar como dimórficos, fungos nos quais era conhecida apenas uma das formas, por exemplo, os agentes de cromoblastomicose. O pleomorfismo nos dermatófitos se expressa através da perda das estruturas de reprodução ou conídios, com variações morfológicas da colônia. Essas estruturas podem ser recuperadas nos retro cultivos, após a inoculação em animais de laboratório ou em meios enriquecidos com terra.

Além da temperatura, muitas espécies fúngicas exigem luz para seu desenvolvimento, no entanto outras são por ela inibidos ou mostram-se indiferentes a esse agente.

A maioria dos fungos tolera amplas variações de pH, ainda que o mais favorável ao seu desenvolvimento seja entre 5 e 7. Os fungos filamentosos podem crescer na faixa entre 1,5 e 11, no entanto as leveduras não toleram pH alcalino. Os meios com pH entre 5 e 6, com elevadas concentrações de açúcar, alta pressão osmótica, tais como geléias, favorecem o desenvolvimento dos fungos nas porções em contato com o ar.

Através de diferentes processos, os fungos podem elaborar vários metabólitos, como antibióticos, dos quais a penicilina é o mais conhecido e micotoxinas, como aflatoxinas, que lhes conferem vantagens seletivas. (GOMIDE, 2009).

2.4 Utilização

Os fungos podem ser encontrados no solo, na água, nos vegetais, em animais, no homem e em detritos, em geral, possuindo, atualmente, uma grande importância econômica. Por exemplo, é utilizado como aromatizantes, enzimas, na maturação de queijos, fabricação de bebidas e uso terapêutico (quadro 1). (PINTO, 2003).

Quadro1: Utilização de espécies fúngicas.

Espécie	Utilização
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ou levedura de padeiro	Produção de pão e outros produtos à base de trigo.
Espécies de leveduras do gênero <i>Saccharomyces</i>	Produção de <u>bebidas alcoólicas</u> por fermentação.
Bolor <i>shoyu koji</i> (<i>Aspergillus oryzae</i>)	Ingrediente essencial na preparação de <u>shoyu</u> (molho de soja), <u>saqué</u> , e <u>miso</u> .
Espécies de <i>Rhizopus</i>	Preparação de <u>tempeh</u> .

3 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS EM QUÍMICA MEDICINAL

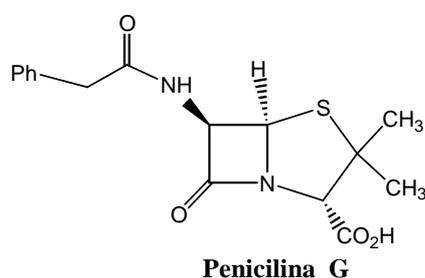
Os produtos naturais representam a principal fonte de agentes terapêuticos para doenças infecciosas e, por milhares de anos, a natureza tem sido fonte de agentes medicinais. O registro de rastreamento da descoberta de fármacos de produtos naturais, associado com a contínua ameaça a biodiversidade através da destruição dos ecossistemas terrestres e marinho e o atual baixo número de novas entidades químicas desenvolvidos nas indústrias farmacêuticas, proporcionam o argumento irrefutável em favor da maior colaboração multidisciplinar e internacional na exploração da natureza como fonte de novos indícios para o desenvolvimento de fármacos e outros valiosos agentes bioativos. (MOMESSO, 2008). A prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes apresenta uma vantagem significativa, pelo fato de que microrganismos podem ser cultivados em larga escala, em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais, assim como, problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais. (TAKAHASHI, 2008).

Neste contexto, os microorganismos representam uma rica fonte de metabólitos bioativos, porém, a história de compostos por eles produzidos é mais recente que a de produtos derivados de plantas. Houve uma revolução no tratamento das infecções bacterianas em 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, que levou a busca por produtos bioativos derivados de microorganismos, resultando na descoberta de novos produtos com uma variedade de indicações terapêuticas. (MOMESSO, 2008).

4 METABÓLITOS FÚNGICOS NA MEDICINA

O primeiro metabólito fúngico de notória eficácia no combate as infecções bacterianas foi a penicilina, produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (Figura 7). Esse metabólito foi descoberto acidentalmente por Fleming em 1928, sendo a primeira substância capaz de inibir o crescimento bacteriano (TAKAHASHI, 2008).

Figura 7: Estrutura química da penicilina

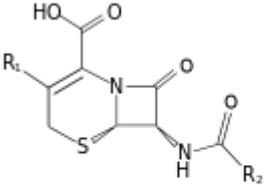
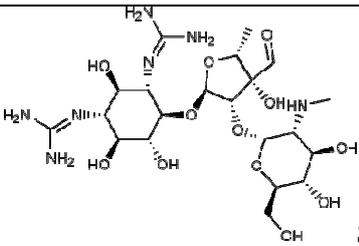
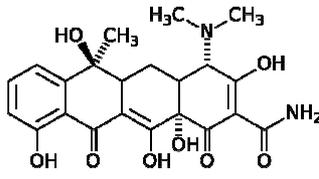
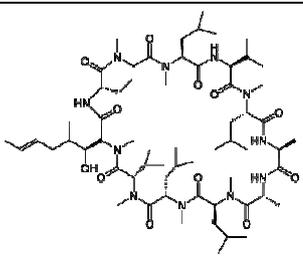


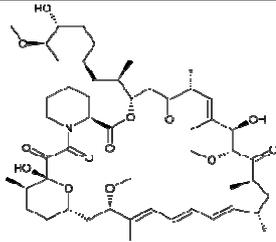
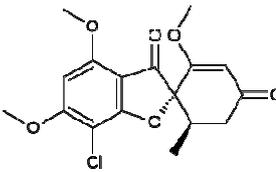
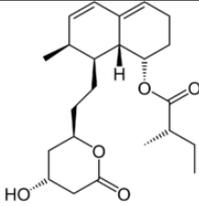
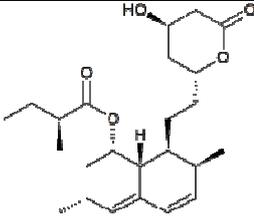
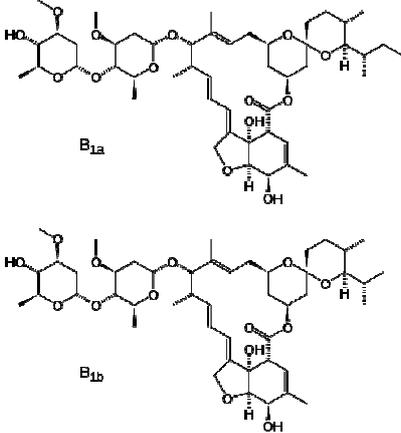
A descoberta da penicilina abriu o caminho a novos investimentos científicos no domínio da antibioterapia e conseqüentemente à descoberta de novos antibióticos; estimulou a investigação científica neste domínio; suscitou estudos clínicos sistemáticos; desencadeou novos investimentos técnicos e tecnológicos com vista à produção industrial de antibióticos; motivou estudos no domínio da tecnologia farmacêutica; esteve na base de novos desafios e investimentos econômicos a nível industrial; ampliou o mercado dos medicamentos nas farmácias; colocou novos desafios aos médicos; e acima de tudo, proporcionou a cura de patologias infecciosas para as quais não havia qualquer terapêutica medicamentosa eficaz. A descoberta da penicilina foi tão importante que, refletiu-se na estatística demográfica com a diminuição dos óbitos em todos os níveis etários. (PEREIRA, 2005).

Após a sua produção industrial, nos anos 40, a penicilina transformou-se em um fármaco imprescindível no arsenal terapêutico, salvando milhões de vidas. (PEREIRA, 2005). Para se demonstrar a vital importância dos fungos na obtenção de novos fármacos, no quadro 2 encontram-se exemplificados importantes fármacos obtidos a

partir de fungos, que são amplamente utilizados em todo o mundo para diversos tipos de doenças acometidas tanto em homem como em animais.

Quadro 2: exemplos de fármacos obtidos a partir de fungos:

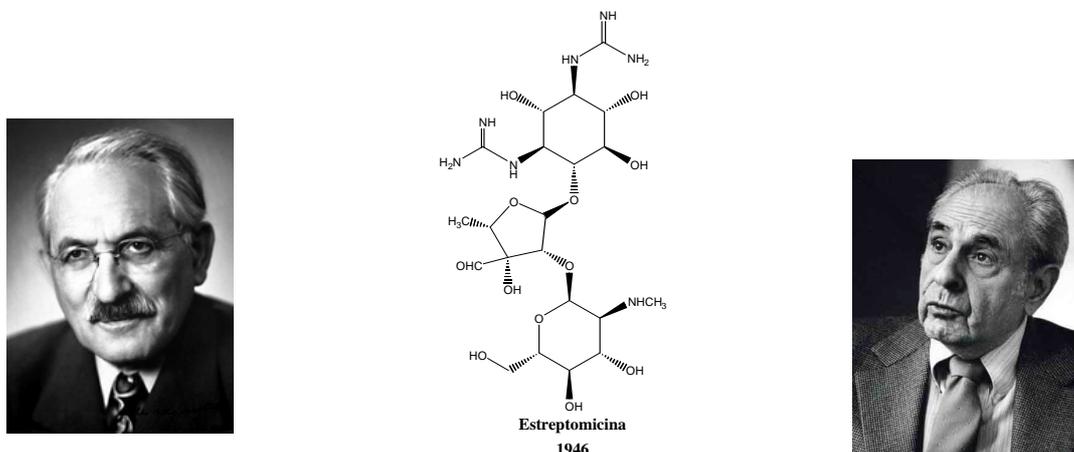
Fungos	Fármacos	Fórmulas estruturais
Agentes antibacterianos		
<i>Cephalosporium</i> <i>Cryptosporium</i>	Cefalosporinas	 <p style="text-align: center;">R₁ — — R₂</p>
<i>Actinomycetales</i>	Aminoglicosídeos	 <p style="text-align: right;">Streptomicina</p>
	Tetraciclinas	
Agentes imunossupressores		
<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ciclosporina	

<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Rapamicina	
Agentes antifúngicos		
<i>Penicillium griseofulvin</i>	Griseofulvina	
Agentes redutores do colesterol sanguíneo		
<i>Aspergillus terreus</i>	Mevastatina	
	Lovastatina	
Agentes antiparasitários		
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Ivermectina	

5 A DESCOBERTA DA ESTREPTOMICINA: A SUBSTÂNCIA QUE REVOLUCIONOU O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.

A vital importância dos fungos no combate às infecções bacterianas pode ser exemplificada também pela descoberta e cura da tuberculose. Apesar do grande desenvolvimento científico e tecnológico do século XIX e começo do século XX, e das descobertas da penicilina e do prontosil, a tuberculose ainda continuava sem tratamento, sendo uma das mais preocupantes doenças infecciosas da época. Por exemplo, entre os séculos XVIII e XIX, a tuberculose foi responsável pela morte de aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o mundo. A situação era tão aterradora que muitos pesquisadores previam o fim da civilização européia até o final do século XIX. No entanto, na década de 1940 surgiu uma descoberta que iria revolucionar o tratamento da tuberculose, a descoberta da estreptomicina (Figura 8).

Figura 8. Estrutura química da Estreptomicina isolada do fungo *Streptomyces griseus* e seus co-descobridores Selman Waksman e Albert Schatz.



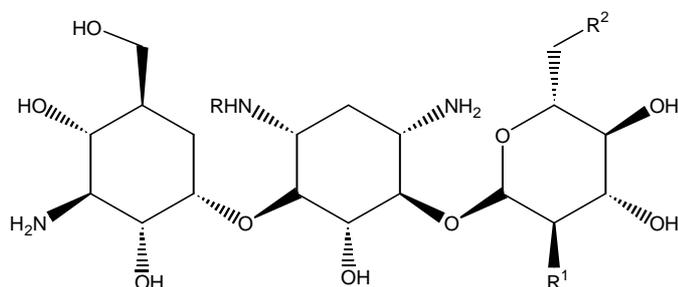
A história desse produto natural teve início com o pesquisador Selman Abrahan Waksman (1888-1973), nascido na cidade de Priluka, Ucrânia em 22 de julho de 1888, que imigrou ainda jovem para os Estados Unidos. Waksman se tornou cidadão americano em 1915, trocando seu primeiro nome Zolman por Selman. Após concluir o

seu doutorado na Universidade da Califórnia, em 1918, foi convidado a continuar seus estudos sobre a microflora do solo no Departamento de Bacteriologia da Universidade de Rutgers, Nova Jérsei, USA. Em 1939, Waksman, que contava com cerca de 50 estudantes, iniciou um programa para analisar diferentes espécies de microorganismos com o intuito de serem utilizados no combate à tuberculose. Esse projeto foi financiado pela Universidade de Rutgers, governo americano e companhia Merck, sendo analisadas milhares de culturas. Em 1943, Albert Schatz, um novo aluno de doutorado de Waksman, inicia seus trabalhos no laboratório, a fim de investigar a presença de possíveis antibióticos, e trabalhando intensamente, em apenas três meses, Schatz alcançou o objetivo que há anos era buscado por Waksman e seus colaboradores, a descoberta de um antibiótico seguro e eficaz contra tuberculose. Esta substância foi denominada estreptomicina, que precisou de apenas mais dois anos para ser aprovada em testes clínicos contra o bacilo da tuberculose.

Por ser reconhecido, como o primeiro fármaco eficaz para o tratamento da tuberculose, sua demanda no mercado internacional cresceu imensamente. Para atender tal demanda a companhia farmacêutica americana Merck, com a qual Waksman já possuía um acordo financeiro desde 1940, passou a produzir industrialmente a substância. Ainda em 1945, a empresa investiu 3,5 milhões de dólares em uma nova planta de produção em Virginia e, em meados de 1946, a produção americana de estreptomicina obteve rápido crescimento sendo esse fármaco o grande responsável pelo início do controle da epidemia em meados do século XX.

Após a descoberta da estreptomicina, entre as décadas de 1950 a 1970, foram descobertos os diversos fármacos utilizados até os dias de hoje no tratamento e controle da tuberculose dentre eles diversas substâncias isoladas de fungos tais como canamicina, amicacina, tuberactinomicina, capreomicina e D-cicloserina (Figura 9). (DE SOUZA, 2008).

Figura 9: Estrutura de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose isolados a partir de fungos.



Canamicina

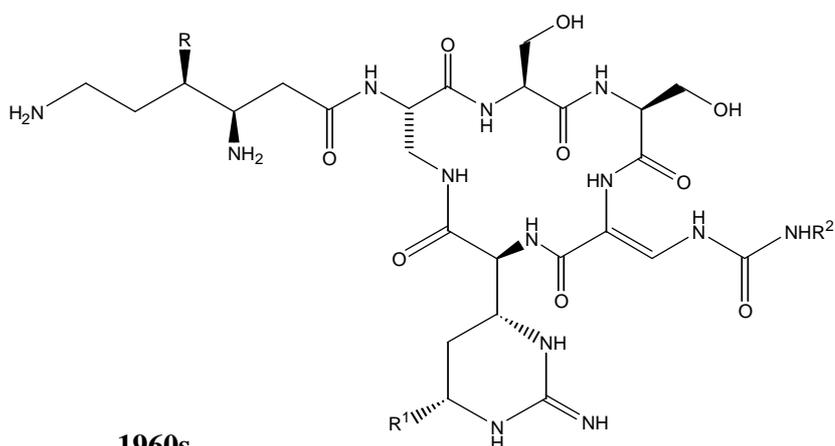
A R = H; R₁ = OH; R₂ = NH₂

B R = H; R₁ = R₂ = NH₂

C R = H; R₁ = NH₂; R₂ = OH

Amicacina

R = COCH(OH)CH₂NH₂; R₁ = OH; R₂ = NH₂



1960s

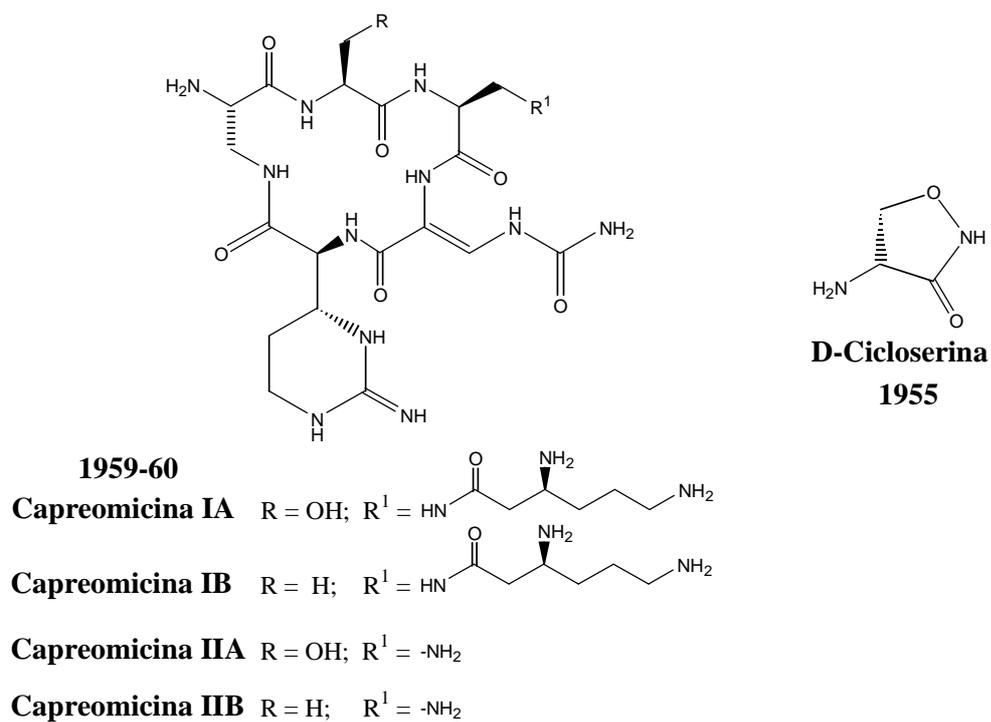
Tuberactinomicina A

R = OH; R¹ = OH; R² = CONH₂

Tuberactinomicina B (Viomicina) R = H; R¹ = OH; R² = CONH₂

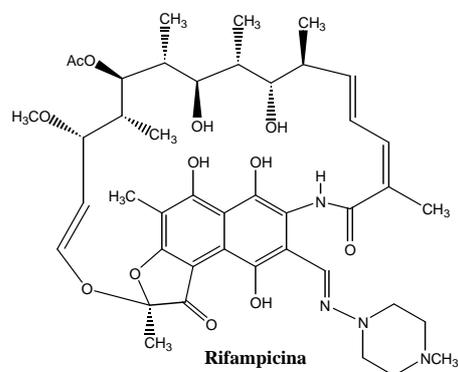
Tuberactinomicina N R = OH; R¹ = H; R² = CONH₂

Tuberactinomicina O R = H; R¹ = H; R² = CONH₂



Além dos fármacos anteriormente mencionados, a rifampicina é também um fármaco semisintético obtido comercialmente pela fermentação a partir do *Streptomyces mediterranei* (ATCC 13685), sendo um fármaco essencial no tratamento da tuberculose.

Figura 10: Estrutura da rifampicina.



Desde sua utilização em 1966, a rifampicina vem sendo um fármaco essencial no tratamento da tuberculose, apresentando um sucesso terapêutico da ordem de 95%. O impacto e a eficácia desse fármaco no combate à tuberculose pode ser observado pela redução do tratamento de doze para seis meses, quando combinada com a isoniazida e pirazinamida. No caso de infecções latentes, o tratamento é reduzido de nove para dois ou três meses. A rifampicina é também utilizada no combate à hanseníase, doença infecto contagiosa causada pela bactéria (*Micobacterium Leprae*) que ataca principalmente a pele e os nervos.

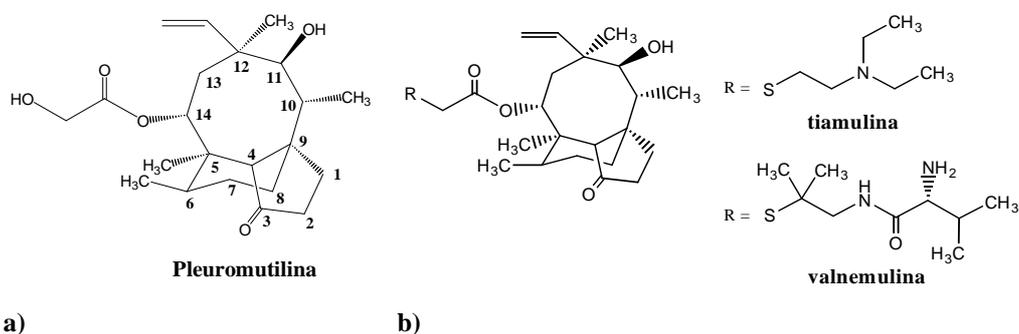
6 PROMISSORES PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE FUNGOS.

Conforme demonstrada nas seções anteriores, devido à extrema importância dos fungos no tratamento da tuberculose e de outras infecções bacterianas, foi feita uma pesquisa bibliográfica nos últimos onze anos com o objetivo de se encontrar produtos naturais isolados de fungos com promissoras atividades contra tuberculose. Esses produtos naturais serviriam de base para avaliarmos a viabilidade da preparação em laboratório de outras substâncias mais potentes, com melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, menores efeitos colaterais, menor complexidade estrutural e custo reduzido. A partir da pesquisa, dois produtos naturais foram selecionados, a pleuromutilina e a capuramicina, que serão abordados a seguir.

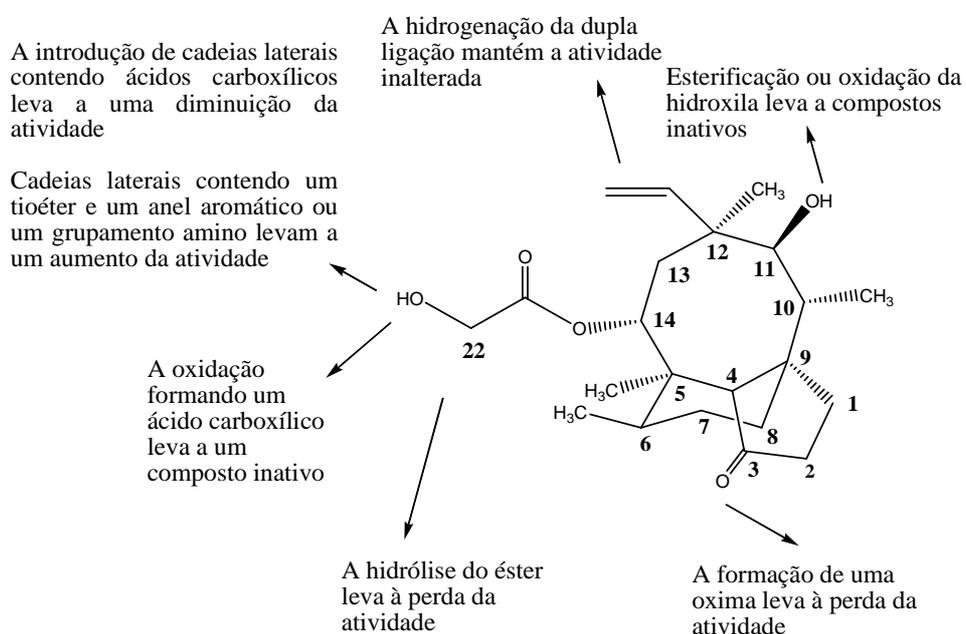
6.1 Pleuromutilina

A pleuromutilina é um diterpeno, obtido a partir de duas espécies de basidiomycetes, o *Pleurotus mutilus* e o *P. passeckerianus*, isolada pela primeira vez no ano de 1951 por Kavanagh e colaboradores. (KAVANAGH, 1951). Nesse trabalho, a pleuromutilina teve sua atividade biológica testada frente a inúmeros microorganismos e células cancerígenas, demonstrando uma significativa atividade *in vitro* contra bactérias Gram-positivas e uma baixa toxicidade em animais.

Devido aos promissores resultados apresentados pela pleuromutilina, nas décadas seguintes, uma série de derivados foram sintetizados (RIEDL; EGGER, 1976), o que permitiu a determinação de sua relação estrutura-atividade (**Figura 12**) e o desenvolvimento dos compostos tiamulina e valnemulina (**Figura 11b**), que posteriormente auxiliaram no descobrimento do mecanismo de ação dessa classe de antibióticos e atualmente são prescritos na medicina veterinária. (HANNAN, 1997).

Figura 11. Pleuromutilina e seus derivados.

a) Estrutura da pleuromutilina; b) Derivados da pleuromutilina

Figura 12. Relação estrutura atividade da pleuromutilina.

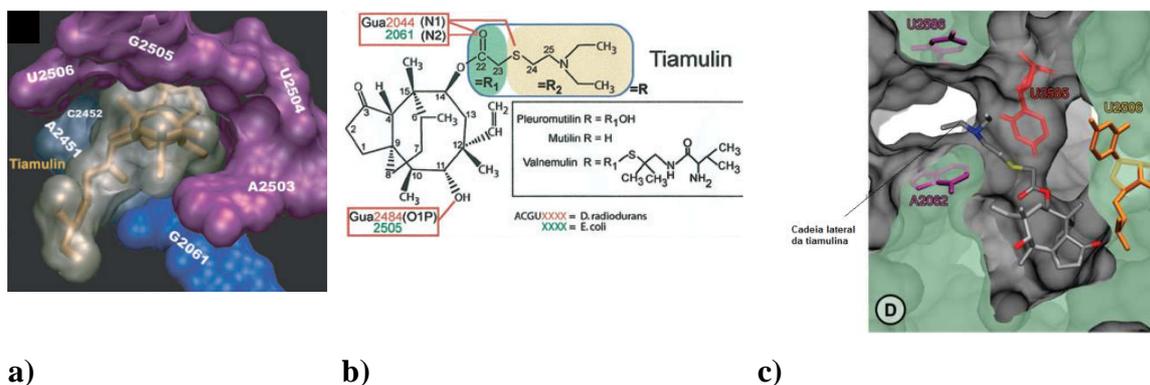
6.1.1 Mecanismo de ação dos derivados pleuromutilínicos

Estudos utilizando a tiamulina, a valnemulina e outros derivados com estruturas similares (HODGIN, 1974; HÖGENAUER, 1981) demonstraram que as pleuromutilinas atuam como inibidores da biossíntese de proteínas durante o metabolismo bacteriano. Essas substâncias se ligam ao ribossomo 70S, o qual é composto por duas subunidades, uma pequena, chamada de 30S e uma maior, conhecida como subunidade 50S. (SCHUWIRTH, 2005; SELMER, 2006). O alvo específico no ribossomo é o domínio 23S rRNA, na subunidade 50S. Essa ligação impede o posicionamento correto das moléculas de tRNA, necessário para que ocorra a reação de peptidil transferase. (POULSEN, 2001).

Estudos de cristalografia utilizando a estrutura da subunidade 50S do ribossomo da bactéria *Deinococcus radiodurans* em complexo com a tiamulina (SCHLÜNZEN, 2004) demonstraram que essa substância se liga ao rRNA 23S através de uma rede extensiva de interações hidrofóbicas envolvendo exclusivamente nucleotídeos do domínio V e através de ligações de hidrogênio com os resíduos G2061 e U2585. O núcleo tricíclico da tiamulina é localizado em uma cavidade confinada pelos resíduos G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505 e U2506 (Figura 13a), ocupando o sitio A do ribossomo que é o local onde normalmente o tRNA carregado com um resíduo de aminoácido se posiciona, para dar início ao alongamento da proteína. O grupo hidroxila ligado ao carbono 11 da tiamulina realiza uma ligação de hidrogênio com o fosfato do resíduo G2505, estabilizando o posicionamento do núcleo tricíclico no interior da cavidade. O resíduo G2061 apresenta uma contribuição crucial para a ligação da tiamulina. Este promove o contato hidrofóbico com inúmeros grupos do anel ciclo-octano, característico dessa classe de compostos, e realiza três ligações de hidrogênio, sendo essas, a ligações ente os hidrogênios do nitrogênio na posição 1 ou do nitrogênio ligado ao carbono 2 de seu anel purina com o oxigênio da carbonila no carbono 22 da tiamulina e entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio 1 do anel purina e o enxofre ligado ao carbono 23 da tiamulina (Figura 13b). Além disso, verificou-se que os resíduos que interagem com a cadeia lateral ligada ao carbono 22 da tiamulina podem mover-se acomodando diferentes tamanhos e grupos funcionais. Essa cadeia lateral se sobrepõe

ao sítio P do ribossomo, onde se posiciona a molécula de tRNA ligada à extremidade crescente da cadeia polipeptídica (Figura 13c). (LOLK, 2008).

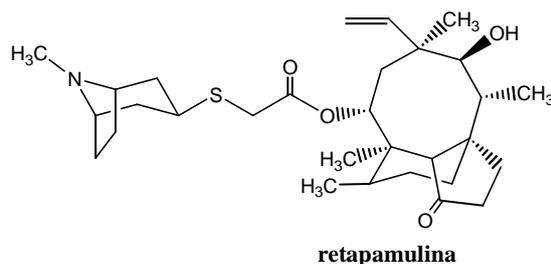
Figura 13. Mecanismo de ação dos derivados pleuromutilínicos



a) Interações hidrofóbicas da tiamulina com seu receptor b) Ligações de hidrogênio tiamulina com seu receptor c) Espaço para cadeias laterais. (Figuras 12a e 12b: adaptadas de SCHLÜNZEN, 2004. Figura 12c: adaptada de LOLK, 2008)

As informações sobre o mecanismo de ação das pleuromutilinas, e o conhecimento das interações dessas substâncias no sítio de ligação compõem um conjunto importante para o desenho racional de novos derivados pleuromutilínicos. Associados com os estudos de SAR, essas ferramentas tem permitido o desenvolvimento de novas substâncias. Nesse contexto, um importante exemplo é a retapamulina (Figura 14), o primeiro derivado pleuromutilínico aprovado para o uso em humanos, lançado no mercado em 2007 pela GlaxoSmithKline. (YANG, 2008).

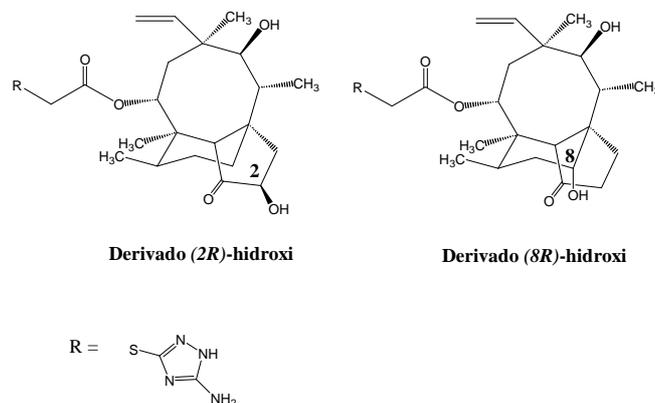
Figura 14. Estrutura da retapamulina.



Essa substância é bastante ativa contra várias bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, muitos deles resistentes a diferentes antibióticos comerciais (LOLK, 2008). Nos Estados Unidos, a retapamulina é utilizada no tratamento do impetigo, uma infecção de pele contagiosa causada pelo *Staphylococcus aureus* ou pelo *Streptococcus pyogenes*. Já na Europa, essa substância é utilizada no tratamento de abrasões ou ferimentos sem abscesso. (EMA, 2010).

A aprovação da retapamulina para uso em humanos demonstra claramente o potencial das pleuromutilinas como ponto de partida na descoberta de novos antibióticos. No entanto, a alta lipofilicidade desses derivados é uma importante barreira para o desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via oral, já que essas substâncias apresentam baixa biodisponibilidade após a administração por essa via e são rapidamente oxidadas pelo citocromo P450 durante a primeira fase do metabolismo, produzindo, por exemplo, derivados 2-(2*R*)- e (8*R*)-hidroxilados, como verificado em um estudo utilizando a azamulina (Figura 15). (HUNT, 2000).

Figura 15. Metabólitos inativos da azamulina.



Com o intuito de desenvolver novas substâncias com melhor biodisponibilidade após a ingestão por via oral, recentemente, diferentes grupos têm reportado a síntese de derivados pleuromutilínicos que apresentam maior solubilidade em água (LOLK, 2008; HIROKAWA, 2008; GONÇALVES, 2010). Inúmeras substâncias apresentaram

resultados promissores em testes *in vitro* e *in vivo* contra um amplo espectro de bactérias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas. No entanto, grande parte dessas não demonstrou maior afinidade com o alvo terapêutico quando comparada a derivados como a tiamulina e a valnemulina e muitas vezes sua rota sintética é complexa, dependendo um grande número de etapas, o que poderia inviabilizar a produção industrial.

Nesse contexto, uma interessante alternativa para a síntese de novos derivados com maior solubilidade em água, através de uma rota simples e utilizando matérias primas de baixo custo, seria a introdução de carboidratos na cadeia lateral da pleuromutilina. A glicosilação é um processo amplamente difundido na natureza, onde metabólitos secundários dos mais diversos organismos como plantas, bactérias e fungos são glicosilados através de processos enzimáticos, facilitando o transporte e o armazenamento dessas substâncias. Além disso, essa estratégia já foi empregada com sucesso na modulação das propriedades farmacológicas de inúmeras substâncias bioativas. (THORSO, 2001).

6.2 Capuramicina

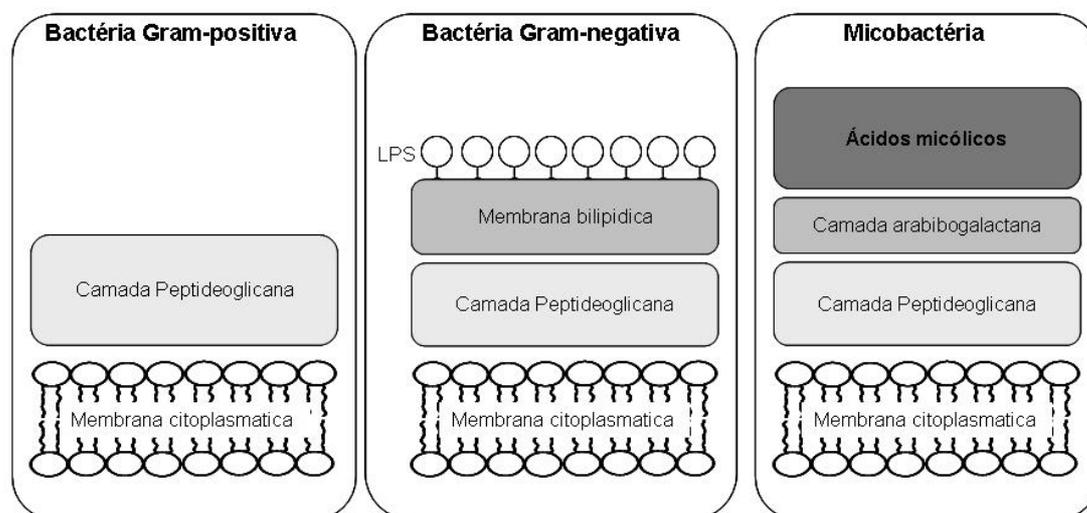
6.2.1 *Mycobacterium sp.* e Translocase I

Em geral, o citoplasma bacteriano é separado do meio extracelular por uma membrana citoplasmática formada por uma bicamada lipídica com boa fluidez, que age como uma barreira seletivamente permeável, e por uma parede celular constituída por peptidoglicanas que confere a resistência necessária para suportar a alta pressão osmótica interna (NIKAIDO, 1994). A biossíntese da parede celular vem sendo explorada como alvo farmacológico para a pesquisa de novos antibióticos desde a descoberta da penicilina por Fleming em 1929.

Bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus* possuem parede celular formada por uma espessa camada de peptidoglicanas que confere pouca resistência à difusão de pequenas moléculas. Já as bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli*, contêm em sua parede celular, além da camada de peptidoglicanas, uma outra

membrana bilipídica externa. A superfície externa dessa membrana é recoberta por um lipídeo não usual, o lipopolissacarídeo (LPS) que possui estrutura de pouca fluidez. Foi demonstrado que até mesmo moléculas lipofílicas apresentam dificuldades para atravessar a parte hidrofóbica desse lipídeo, o qual se torna uma barreira eficiente contra a rápida difusão de antibióticos lipofílicos. Em contraste, a parede celular das micobactérias é constituída por três subestruturas covalentemente interligadas: as peptideoglicanas, arabinogalactanas e os ácidos micólicos, sendo os últimos formados por longas cadeias de ácidos graxos contendo diferentes grupos funcionais, como ligações duplas, cetona, éster, epóxido, metóxi e ciclopropano. Esses compostos são de extrema importância para a sobrevivência das micobactérias, pois dificultam a penetração de drogas hidrofóbicas, evitam a desidratação e permitem que a bactéria se desenvolva no sistema imune do hospedeiro (Figura 16). (BUGG, 1992; HEIJENOOR, 2001; KIMURA, 2003).

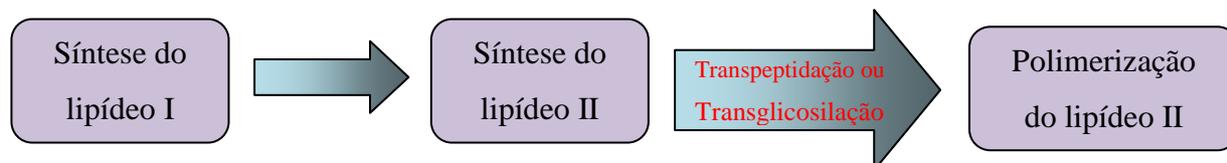
Figura 16. Representação da parede celular de bactérias.



A biossíntese de peptideoglicanas é essencial para a sobrevivência da bactéria e se torna um alvo interessante no desenvolvimento de antibióticos, já que não existe correspondência em células eucarióticas. A biossíntese do peptideoglicano consiste em três estágios (Figura 17): síntese do lipídeo I e do lipídeo II, seguido da polimerização do lipídeo II por transpeptidação e transglicosilação. Como exemplo de fármacos em uso clínico que inibem a polimerização do lipídeo II na superfície da bactéria, pode-se

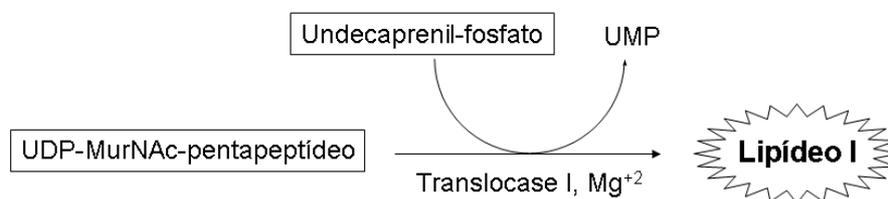
mencionar as β -lactamas e as vancomicinas. Estes fármacos possuem um mecanismo de ação diferente dos existentes, tornando-se possível combater as infecções causadas por micobactérias multirresistentes. (BOYLE, 1998).

Figura 17: Biossíntese do peptidoglicano.



Estudos têm sido realizados visando à descoberta de substâncias capazes de inibir a síntese do lipídeo I. Nesta etapa, a enzima fosfo-MurNac-pentapeptideo translocase, também chamada de translocase I (MraY), catalisa a reação entre o UDP-MurNac-pentapeptideo e o undecaprenil-fosfato formando UMP e o Lipídeo I, que é o primeiro intermediário da síntese de peptidoglicanas. Esta catálise requer a presença de Mg^{+2} como cofator para a ativação da enzima (Figura 18). (STRUVE, 1966;HEYDANEK, 1969).

Figura 18: Biossíntese do Lipídeo I

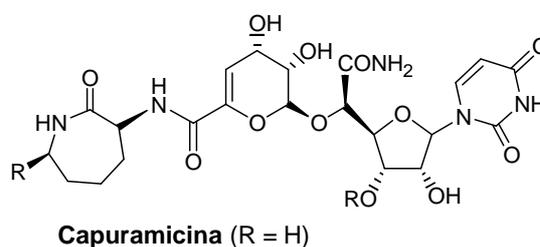


Várias substâncias têm sido relatadas como inibidoras da enzima translocase I, dentre elas as liposidomicinas, as caprazamicinas, as capuramicinas e as pacidamicinas, sendo a mais promissora a classe das capuramicinas que serão abordadas a seguir.

6.2.2 Classe das Capuramicinas

A capuramicina (Figura 19) foi originalmente isolada a partir de culturas de *Streptomyces griseous* 466-S3 e possui a capacidade de inibir a enzima translocase I, no entanto seu espectro de ação é baixo.

Figura 19. Estrutura da Capuramicina.

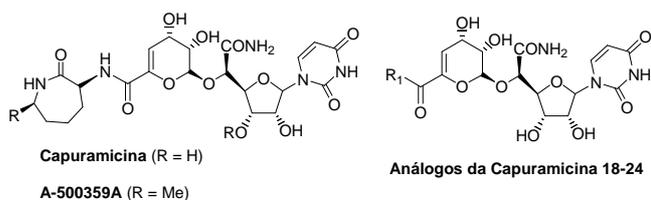


Em geral, a capuramicina apresenta maior atividade frente à micobactérias e pouca atividade frente a bactérias Gram-positivas. É interessante notar que as micobactérias apresentam resistência contra muitos derivados β -lactâmicos, medicamentos que pertencem à mesma classe das capuramicinas, devido à presença da enzima β -lactamase. A atividade dessas substâncias poderia ser então explicada pela estabilidade do seu anel β -lactâmico frente a essas enzimas. O mecanismo de permeabilidade das capuramicinas através da membrana das micobactérias ainda não está completamente elucidado. Atualmente, muitos análogos de capuramicinas vêm sendo isolados, sintetizados e testados como inibidores da enzima translocase I. Como exemplo, pode-se citar análogos da capuramicina que não contém a porção azepan-2-ona (quadro 3) obtidos por Hotoda e Colaboradores, a partir da reação entre diversas aminas e o produto natural A500359E, também isolado de cepas *S. griseous*.

As substâncias obtidas foram testadas frente ao *M. smegmatis* e a enzima Translocase I, ficando evidente a importância do grupamento NH da amida para a atividade dessas substâncias. Os melhores resultados foram observados com os compostos 1-7 que foram, então, testados frente às micobactérias de maior relevância clínica: *Mycobacterium avium* NIHJ1605, *Mycobacterium intracellulare* ATCC1954 E-3 e

Mycobacterium kansasii ATCC12478. Suas atividades foram comparadas com a da rifampicina e isoniazida sendo que o análogo 1 apresentou MIC semelhante ao da capuramicina, variando entre 4 e 16 µg/mL. (Hotoda et al, 2003a)

Quadro 3: Análogos da Capuramicina e sua atividade antimicrobiana



Compostos	R ¹	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e
Capuramicina	-	10	12,5	8	8	8
A-500359A	-	10	6,25	8	4	16
A-500359E	MeO-	27	>100	-	-	-
1	PhNH-	6,5	6,25	16	4	8
2	3-Me-PhNH-	7,6	12,5	4	1	8
3	3-F-PhNH-	10	6,25	2	2	8
4	4-F-PhNH-	37	6,25	4	2	2
5	3,4-di-F-PhNH-	9	6,25	2	0,5	1
6	4-Cl-PhNH-	18	6,25	4	2	16
7	4-Br-PhNH-	20	6,25	8	0,5	8
Rifampicina	-	-	-	0,125	0,125	0,125
Isoniazida	-	-	-	-	-	-

^a Translocase I, IC₅₀ (ng/mL)

^b *M. smegmatis* SANK75075, MIC (µg/mL)

^c *M. avium* NIHJ1605, MIC (µg/mL)

^d *M. intracellulare* ATCC1954 E-3, MIC (µg/mL)

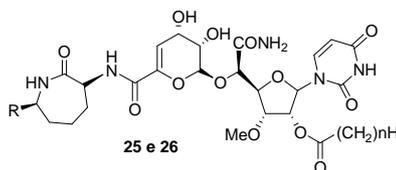
^e *M. kansasii* ATCC12478, MIC (µg/mL)

Fonte: (HOTODA, 2003a).

Hotoda e Colaboradores também obtiveram derivados acilados a partir das moléculas de capuramicina e de seu derivado metilado A500359A (Quadro 4). Observou-se que o aumento no tamanho da cadeia lateral provoca diminuição na atividade das moléculas

frente à enzima Translocase I, porém, cadeias de tamanho ideal como a duodecanoíla e a decanoíla presentes, respectivamente, nos derivados da capuramicina (**25**, MIC variando entre 0,063 e 3,13 µg/mL) e do A-500359A (**26**, MIC variando entre 0,063 e 6,25 µg/mL), apresentaram excelente atividade frente às micobactérias, provavelmente devido à lipofilicidade conferida a esses compostos que permite uma melhor penetração através da membrana celular desses microorganismos. Os valores de MIC observados para estes compostos foram iguais ou melhores do que os observados para a isoniazida (MIC entre 0,125 e 0,25 µg/mL) e a rifampicina (MIC entre 1 e 2 µg/mL). (HOTODA, 2003b).

Quadro 4. Análogos acilados da Capuramicina e sua atividade antimicrobiana



Compostos	R	N	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e
Capuramicina	H	-	10	12,5	8	8	8
A-500359A	Me	-	10	6,25	8	4	16
1	H	11	n.d.	3,13	<0,063	0,125	0,125
2	Me	9	50	6,25	<0,063	<0,063	<0,063
Rifampicina	-	-	n.d	0,125	0,125	0,125	0,25
Isoniazida	-	-	n.d	-	1	8	2

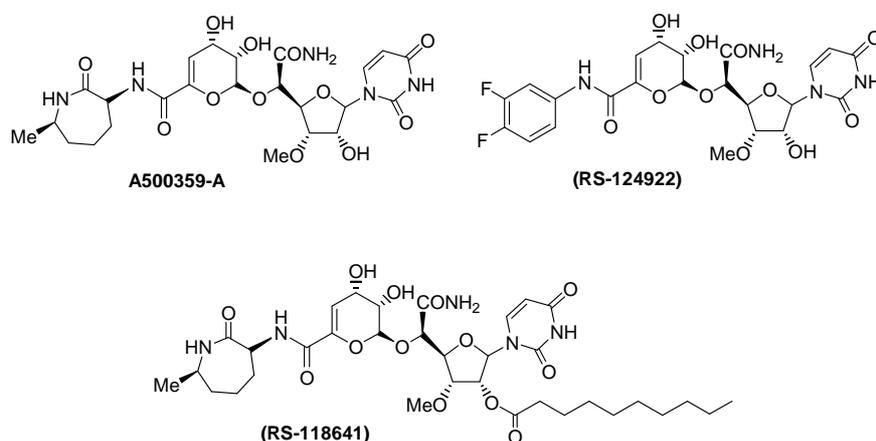
^aTranslocase I, IC₅₀ (ng/mL); ^b*M. smegmatis* SANK75075, MIC (µg/mL); ^c*M. Avium* NIHJ1605, MIC (µg/mL); ^d*M. intracellulare* ATCC1954 E-3, MIC (µg/mL); ^e*M. Kansaii* ATCC12478, MIC (µg/mL)

Fonte: (HOTODA, 2003b)

Os compostos RS-124922 e RS-118641 (quadro 5), sintetizados pela empresa japonesa Sankyo, foram avaliados frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, apresentando melhor atividade contra *M. tuberculosis* (Cepa H37Rv) (MIC = 8 µg/mL e MIC = 1 µg/mL, respectivamente), do que o composto A500359A (MIC = 16 µg/mL). A atividade dessas substâncias frente à cepas MDR-TB não sofreu variações

estatisticamente significativas, quando comparadas às observadas nas cepas H37Rv. Não foram realizados testes *in vivo* para o composto 5 devido a sua baixa solubilidade no modelo de tratamento utilizado. Na avaliação *in vivo* dos outros, observou-se uma considerável redução no número de organismos viáveis nos pulmões em comparação com o grupo de controle. Os estudos desenvolvidos mostram que os análogos de capuramicinas possuem grande potencial antimicrobiano e são bons candidatos a posterior avaliação no tratamento de infecções causadas por *M. tuberculosis*. (KOGA, 2004)

Quadro 5. Análogos da capuramicina sintetizados pela empresa japonesa Sankyo e sua atividade antimicrobiana.



Substâncias	Cepa H37Rv MIC (µg/mL)	Cepa MDR-TB MIC (µg/mL)
A500359-A	16	16
(RS-124922)	8	4
(RS-118641)	1	0,5
Rifampicina	≤ 0,03	> 32
Isoniazida	0,06	4

Fonte: (KOGA, 2004)

7. CONCLUSÃO

Devido à importância da tuberculose no cenário da saúde pública mundial, faz-se necessária a implementação de novas estratégias, terapias, diagnósticos, informações e políticas públicas de saúde no combate a uma das mais importantes doenças infecto-contagiosas de nosso século. Neste contexto, necessita-se com urgência de novos fármacos mais potentes, de baixo custo, com menores efeitos colaterais e com redução do tempo da terapia. Considerando essa problemática, devemos ressaltar a importância da pesquisa de produtos naturais para produção de novos agentes farmacológicos com ação contra o *Mycobacterium tuberculosis*, já que a natureza nos fornece uma poderosa fonte de novas substâncias. Isso pode ser exemplificado pela importância dos fungos no desenvolvimento de novos fármacos, já que a prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes apresenta uma vantagem significativa, pelo fato de que microrganismos podem ser cultivados em larga escala, em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais, assim como, problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais. Neste contexto, conclui-se que os produtos naturais, pleuromutilina e capuramicina, isolados de fungos, servem de base para a preparação de outras substâncias com ação contra o *Mycobacterium tuberculosis* que podem vir a ser mais potentes, com melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, menores efeitos colaterais, menor complexidade estrutural e custo reduzido em relação aos fármacos atualmente empregados.

8 REFERÊNCIAS

- BOYLE, D. S.; DONACHIE, W. D. MraY is an essential gene for cell growth in *Echeriachia Coli*. **J. Bacterio**, 1998,. 80(23) 6429-6432,.
- BUGG, T. D. H.; WALSH, C. T. Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: Enzymology, antibiotics and antibiotic resistance. **Nat. Prod. Rep.**, 1992, 9: 199- 215.
- DE SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Revista Química Nova**, 2005, 28(4): 678-682.
- DE SOUZA, M. V. N.; FERREIRA, M. L. Estreptomicina, um fármaco que mudou a história da humanidade, salvando-a da Tuberculose. **Ciência Hoje**, 2008, v. 42, p. 36-41.
- EGGER, H.; REINSHAGEN, H. J **Antibiotics** 1976; 29: 923–27.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Summary of product characteristics: product information**, 2010. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu>.> Acessado em: 20 de novembro de 2010.
- GOMIDE, P. H. O.; DOS SANTOS, J.G.D.; et al. Diversidade e função de fungos micorrízicos arbusculares em sucessão de espécies hospedeiras. **Pesq. agropec. bras.** 2009, Brasília, 44(11) 1483-1490.
- GONÇALVES, R. S. B.; DE SOUZA, M. V. N. **Curr Resp Med Ver**, 2010; 6(2): 91-101.
- HANNAN, P. C. T.; WINDSOR, H. M.; RIPLEY, P.8 H. **Res Vet Sci**, 1997; 63: 157–160.
- HEIJENOORT, J. V. Recent advances in the formation of bacterial peptidoglycan monomer unit. **Nat. Prod. Rep.**, 2001, 18:503-519.
- HEYDANEK, M. G.; STRUVE, W. G.; NEUHAUS, F. C. Initial state in peptidoglycan synthesis. III. Kinetics and uncoupling of phospho-N-acetylmuramylpentapeptide translocase (uridine 5'-phosphate). **Biochem**, 1969, 63(8): 1214-1221.

HIROKAWA, Y. ; KINOSHITA, H.; TANAKA, T. ; *et al.* **J Med Chem**, 2008; 51: 1991–4.

HODGIN, L. A.; HÖGENAUER, G. **Eur J Biochem**, 1974; 47: 527–33.

HÖGENAUER, G.; EGGER, H. **Ruf C. Biochemistry** 1981; 20: 546–52.

HOTODA, H.; FURUKAWA, M.; DAIGO, M.; *et al.* Synthesis and antimycobacterial activity of capuramycin analogues. Part 1: substitutions of the azepan-2-one moiety of capuramycin. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2003a, 13: 2829-2832.

HOTODA, H.; FURUKAWA, M.; DAIGO, M.; *et al.* Synthesis and antimycobacterial activity of capuramycin analogues. Part 2: acylated derivatives of capuramycin-related compounds. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2003b, 13: 2833-2836.

HUNT, E. Pleuromutilin antibiotics. **Drugs Fut**, 2000; 25: 1163–8.

KAUFMANN, S.H.E. “A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it”. **Tuberculosis**, 2003, 83, 86-90, 2003.

KAVANAGH, F.; HERVEY, A.; ROBBINS, W. J. **Proc Natl Acad Sci**, 195, 37: 570-4.

KIMURA, K.; BUGG, T. D. H. Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis. **Nat. Prod. Rep**, 2003, 20: 252-273.

KOGA, T.; FUKUOKA, T.; DOI, N.; HARASAKI, T.; *et al.* Activity of capuramycin analogues against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in vitro and in vivo. **J. Antimicrob. Chemother**, 2004, 54: 755-760.

LOLK, L.; POHLSGAARD, J.; JEPSEN, A. S.; *et al.* **J Med Chem**, 2008; 51: 4957–67.

LOURENÇO, A. Microbiologia, 2004. **Fungos**. Disponível em: <<http://www.microbiologia.vet.br/fungos.htm>>. Acesso em: 28 out. 2010.

MINISTERIO DA SAÚDE (a),
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_novos_tuberculose_1990_2007.pdf>. Acesso em: setembro de 2009.

MINISTERIO DA SAÚDE (b),
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31115>
Acesso em setembro de 2009.

MOMESSO, Luciano da Silva. **Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini*, *Chaetomium globosum***. 2008. 24f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2008.

MUNCH, R. “Robert Koch” **Microbes and Infection**, 2003, 5(1), 69-74

NIKAIDO, H.; SAIER, Jr. M. H. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. **Science**, 1994, 258(5084): 936-942.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (a), Global Tuberculosis Control – epidemiology, strategy, financing: Who Report 2009,
<http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf>, acessada em setembro de 2009.

Organização Mundial da Saúde (b),
<http://www.who.int/tb/challenges/xdr/xdr_map_sep09.pdf>, acessada em setembro de 2009.>

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de letras HISTORIA**, 2005, III (6): 129-151.

PINTO, P. Técnicas Laboratoriais de Biologia: Ação dos decompositores do solo. **Escola Secundária do Padre António Martins Oliveira de Lagoa**, 2003, ano 11, n. 14.

POULSEN, S. M.; KARLSSON, M.; JOHANSSON, L. B.; VESTER, B. **Mol Microbiol**, 2001; 41: 1091–99.

RIEDL, K. J. **Antibiotics**, 1976; 29: 132–9.

SCHLÜNZEN, F., PYETAN, E.; FUCINI, P.; YONATH, A.; HARMS, J. M. **Mol Microbio**, 2004; 54: 1287–94.

SCHUWIRTH, B. S.; BOROVINSKAYA, M. A.; HAU, C. W.; *et al.* **Science**, 2005; 310: 827–34.

SELMER, M. ; DUNHAM, C. M, MURPHY, F. V. ; *et al.* **Science**, 2006; 313: 1935–42.

SILVA, C. A.; RODRIGUES, L.M. *et al.* Bioprospecção de microfungos marinhos com potencial antibacteriano. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2008.

SMITH, C.V.; SHARMA, V.; SACCHETTINI, J.C. “TB drug discovery: addressing issues of persistence and resistance” **Tuberculosis**, 2004, 84, 45-55.

STRUVE, W. G.; SINHA, R. K.; NEUHAUS, F. C. On the initial stage in peptidoglycan synthesis. Phospho-N-acetylmuramylpentapeptide tranlocase (uridine monophosphate). **Biochem**, 1966, 5(1): 82-93.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Revista Química Nova**, 2008, 31(7): 1807-1813.

TBALLIANCE, “Global Alliance for Tuberculosis Drug Development: Scientific blueprint for TB drug development” <<http://www.tballiance.org>>, acesso em setembro de 2009.

THORSO, J. S.; HOSTED, Jr. T. J.; JIANG, J.; BGGINS, J. B.; AHLERT, J. **Curr Org Chem**, 2001; 5: 139-167.

YANG, L. P. H.; KEAM, S. J. **Drugs**, 2008, 68: 855–73.