



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**LIAT PÉROLA VENTURAS**

**PROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* A  
PARTIR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PROVENIENTES DE UMA  
ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA CAATINGA BRASILEIRA**

**CAMPINA GRANDE  
2024**

LIAT PÉROLA VENTURAS

**PROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* A  
PARTIR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PROVENIENTES DE UMA  
ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA CAATINGA BRASILEIRA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como um requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

**Área de concentração:** Farmácia

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

**CAMPINA GRANDE  
2024**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

V469p Venturas, Liat Perola.

Prospecção de antibióticos contra *Mycobacterium tuberculosis* a partir de metabólitos secundários provenientes de uma actinobactéria isolada da caatinga brasileira [manuscrito] / Liat Perola Venturas. - 2024.

49 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)  
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, Departamento de Farmácia - CCBS".

1. Compostos antimicobacterianos. 2. Tuberculose. 3. Actinobactéria. 4. Desenvolvimento de medicamentos. I. Título

21. ed. CDD 615.329

LIAT PÉROLA VENTURAS

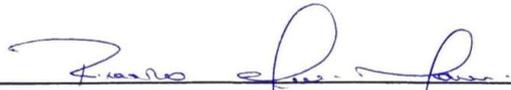
PROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis* A  
PARTIR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PROVENIENTES DE UMA  
ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA CAATINGA BRASILEIRA

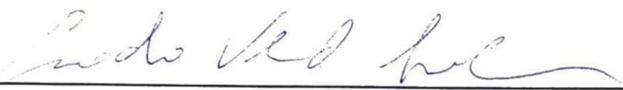
Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao Departamento do Curso de Farmácia da  
Universidade Estadual da Paraíba, como um  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

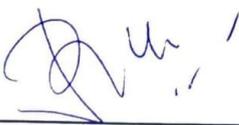
Área de concentração: Farmácia

Aprovada em: 19/11/2024

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. RICARDO OLÍMPO DE MOURA**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
ORIENTADOR

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. EMÍDIO VASCONCELOS LEITÃO DA CUNHA**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

  
\_\_\_\_\_  
**PROF. DR. VALNÊS DA SILVA RODRIGUES JUNIOR**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

*Àqueles que me ensinaram a acreditar no poder  
transformador do conhecimento.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Todo Poderoso, por me agradecer com uma vida tão cheia de bênçãos, desde as pequenas alegrias até as grandes conquistas. ימלך יהוה לעולם אלהיך ציון לדר ודר הללויה.

À minha família, por ter, desde tão cedo, me encorajado a exercer o meu potencial e ser sempre a minha melhor versão.

Ao meu amado noivo, Aldrey, pelo amor e apoio incondicional. Existir ao seu lado é uma bênção e um privilégio.

À Dona Giovana e toda a família Ribeiro, pelo acolhimento e carinho durante todos esses anos.

Às minhas amigas, Eduarda, Maria Lorena, Marcelly e Zainara, pela amizade e companheirismo que construímos ao longo desse processo. É raro de se encontrar um grupo tão unido, do começo ao fim, e para sempre vou guardar o apoio, as risadas e os momentos que vivemos juntas.

Ao professor Dr. Samuel Paulo Cibulski, por ter me apresentado esse campo de estudo tão vasto e maravilhoso, que são as actinobactérias. Seus ensinamentos, orientação, paciência e boa energia foram indispensáveis para a realização desse trabalho. Agradeço também aos professores Emídio V. L. da Cunha e Valnês da Silva Rodrigues Júnior por aceitarem compor a minha banca de defesa.

A todos os professores do departamento de Farmácia da UEPB, por cada aula, conversa e palavra de incentivo, que me inspiraram e fortaleceram ao longo desse percurso. Gostaria de agradecer em especial ao professor Dr. Thúlio Antunes de Arruda, por ter aberto as portas da pesquisa científica para mim, permitindo o florescimento de um estudo ímpar.

Aos integrantes do LAFIT, especialmente Genil, por toda as valiosíssimas contribuições. Agradeço também ao LABDEM da UEPB e ao LBCM/CBiotec e LMCA da UFPB. Sou grata pelas oportunidades e suporte técnico e científico que cada laboratório proporcionou ao longo desse processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

"Normalmente, não se reconhece que, para cada microrganismo prejudicial ou parasitário, existem dezenas de outros que são benéficos. Sem estes últimos, não haveria pão para comer nem vinho para beber, solos férteis ou água potável, roupas ou saneamento. É impossível imaginar qualquer forma de vida superior sem a existência dos micróbios."

Selman Abraham Waksman

## RESUMO

Microrganismos produtores de metabólitos secundários são fontes confiáveis e promissoras de moléculas bioativas, fornecendo uma perspectiva para a descoberta de inovadoras terapias contra a tuberculose. *Actinobacteria* se trata de um filo composto por uma variedade de bactérias Gram-positivas, notável devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários de grande atividade. Foi isolada uma cepa de actinobactéria denominada “UEPB11A”, do solo da Caatinga paraibana, com o objetivo de avaliar a atividade de metabólitos secundários que possam ser de interesse farmacológico no tratamento contra a tuberculose. Sua morfologia é característica, possuindo forma filamentosa e pseudo-hifas. Seus esporos possuem comprimento médio de 1,17  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,14 \mu\text{m}$ ), estando dispostos em cadeia, com morfologia reniforme e glabra. Seus esporos foram inoculados em meio mineral mínimo M9 e mantidos a 37°C sob constante agitação durante 14 dias. Posteriormente, a cultura foi filtrada e o meio livre de células foi particionado com butanol e diclorometano, sendo submetido à separação por cromatografia líquida em coluna. As frações obtidas foram concentradas por rotaevaporação e em seguida, analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo reunidas aquelas com o mesmo perfil. As 36 frações resultantes foram reconstituídas em dimetilsulfóxido e submetidas ao teste de viabilidade celular, estimando suas atividades microbicidas, utilizando resazurina como indicativo de atividade metabólica da linhagem H37Ra de *Mycobacterium tuberculosis*, diluídos a uma densidade óptica de 0,006 em Middlebrook 7H9. As 22 frações com atividade demonstrada no *screening* foram diluídas em série, em faixas de concentração de 100-0,8  $\mu\text{g/mL}$ , e testadas contra a micobactéria. Foram realizados controles positivos utilizando moxifloxacino e rifampicina. A fração 2-3 apresentou CIM de 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , e as frações 4 e fração DCM, de 3,125  $\mu\text{g/mL}$ . Foi realizada a elucidação estrutural da fração DCM através de espectros de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais. Os resultados alcançados indicam um potencial de aplicação das actinobactérias encontradas no semiárido paraibano em pesquisas de descoberta de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose, destacando a necessidade de estudos direcionados à avaliação do mecanismo de ação, perfil de segurança e toxicidade de tais metabólitos ativos. Essa pesquisa contribui para a expansão do conhecimento sobre os recursos

biotecnológicos do bioma da Caatinga e seu potencial impacto na produção de novos medicamentos.

**Palavras-chave:** compostos antimicobacterianos; tuberculose; actinobactéria; desenvolvimento de medicamentos.

## ABSTRACT

Secondary metabolite-producing microorganisms are reliable and promising sources of bioactive molecules, offering a perspective for the discovery of innovative therapies against tuberculosis. Actinobacteria is a phylum composed of a variety of Gram-positive bacteria, notable for its capacity to produce secondary metabolites with significant activity. A strain of actinobacteria named "UEPB11A" was isolated from the soil of Caatinga in Paraíba, aiming to evaluate the activity of secondary metabolites with potential pharmacological interest in tuberculosis treatment. It has characteristic morphology, with a filamentous form and pseudo-hyphae. Its spores measure an average length of 1.17  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0.14 \mu\text{m}$ ), are arranged in chains, and have a reniform and glabrous morphology. The spores were inoculated in M9 minimal mineral medium and maintained at 37°C under constant agitation for 14 days. Subsequently, the culture was filtered, and the cell-free medium was partitioned with butanol and dichloromethane, and then subjected to separation by column liquid chromatography. The obtained fractions were concentrated by rotary evaporation and subsequently analyzed by thin-layer chromatography (TLC), with fractions showing similar profiles grouped together. The 36 resulting fractions were reconstituted in DMSO and subjected to a cell viability test, estimating their microbicidal activities, using resazurin as an indicator of the metabolic activity of the *M. tuberculosis* H37Ra strain, diluted to an optical density of 0.006 in Middlebrook 7H9. The 22 fractions showing activity in the screening were serially diluted in concentration ranges of 100-0.8  $\mu\text{g/mL}$  and tested against the mycobacterium. Positive controls were performed using moxifloxacin and rifampicin. Fraction 2-3 presented an MIC of 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , while fractions 4 and DCM had an MIC of 3.125  $\mu\text{g/mL}$ . Structural elucidation of the DCM fraction was performed through one-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectra. The present results indicate the potential application of actinobacteria found in the Paraíba semi-arid region for research into the discovery of new drugs for tuberculosis treatment, highlighting the need for studies focused on evaluating the mechanism of action, safety profile, and toxicity of these active metabolites. This research contributes to expanding knowledge on the biotechnological resources of the Caatinga biome and its potential impact on the development of new medications.

**Keywords:** antimycobacterial compounds; tuberculosis; actinobacteria; drug development.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Delimitação do bioma Caatinga, localizado na região nordeste.....	17
Figura 2 - Representações estruturais de medicamentos derivados do metabolismo secundário de actinobactérias.....	19
Figura 3 - Fluxograma da metodologia de isolamento dos metabólitos secundários	27
Figura 4 - Micélio aéreo da actinobactéria UEPB11A em meios Ágar Müller-Hinton (a) e Ágar Solo (b) .....	31
Figura 5 - Registro fotográfico das estruturas micromorfológicas da <i>Streptomyces</i> UEPB11A. Lâmina corada com azul de metileno. Aumento de 1000X.....	32
Figura 6 - Imagens da morfologia da <i>Streptomyces</i> sp. UEPB11A , obtidas através de MEV. A – Esporos da <i>Streptomyces</i> sp. UEPB11A, sob magnificação de 13.000X. B- Esporos da <i>Streptomyces</i> sp. UEPB11A sob magnificação de 4.200X. C - Estrutura filamentosa da <i>Streptomyces</i> sp. UEPB11A, sob magnificação de 4000X. D - Estrutura filamentosa da <i>Streptomyces</i> sp. UEPB11A, sob magnificação de 1050X.....	34
Figura 7 - Estrutura química da molécula isolada da Fração DCM .....	37
Figura 8 - Estrutura química da molécula Dehidrorabelomicina .....	38
Figura 9 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM, proveniente da <i>Streptomyces</i> sp. UEPB11A .....	40
Figura 10 - Expansão do Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM.....	40
Figura 11 - Expansão do Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM.....	41
Figura 12 - Expansão do Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM.....	41
Figura 13 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da molécula isolada da Fração DCM.....	42
Figura 14 - Espectro de RMN – HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da molécula isolada da Fração DCM.....	42
Figura 15 - Espectro de RMN – HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da molécula isolada da Fração DCM.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frações ativas em ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima.....	35
Tabela 2 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz e 125 MHz) da molécula UEPB11A-DCM, comparados com dados da literatura $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz e 50 MHz) (Yamashita, <i>et. al</i> , 1997).....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BuOH	Butanol
C	Carbono
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDB	Convenção de Diversidade Biológica
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
H	Hidrogênio
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHz	Megahertz
MOXI	Moxifloxacina
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica
PPM	Partes Por Milhão
RIFA	Rifampicina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multirresistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Caatinga .....	16
2.2	Actinobactérias .....	17
2.3	Metabólitos Secundários .....	20
2.4	Tuberculose .....	21
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo geral .....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	METODOLOGIA .....	25
4.1	Microrganismo.....	25
4.2	Análise Morfológica da Actinobactéria <i>Streptomyces sp. UEPB11A</i> .....	25
4.2.1	<i>Avaliação do micélio aéreo e micromorfologia</i> .....	25
4.2.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	25
4.3	Condições de cultivo para a produção de metabólitos secundários .....	26
4.4	Isolamento dos metabólitos secundários .....	26
4.5	Atividade dos compostos contra <i>M. tuberculosis H37Ra</i> .....	27
4.5.1	<i>Screening de Atividade contra M. tuberculosis H37Ra</i> .....	27
4.5.2	<i>Ensaio de Concentração Inibitória Mínima contra M. tuberculosis H37Ra.</i> .....	28
4.6	Elucidação estrutural de compostos com atividade antimicobacteriana	28
4.6.1	<i>Análise por Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
5.1	Análise Morfológica da Actinobactéria <i>Streptomyces sp. UEPB11A</i> .....	30
5.1.1	<i>Avaliação do micélio aéreo e micromorfologia</i> .....	30
5.1.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	33
5.2	Atividade dos compostos contra <i>M. tuberculosis</i> .....	35
5.3	Elucidação estrutural do composto isolado da fração DCM com atividade antimicobacteriana.....	36
5.3.1	<i>Análise por Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	36
6	CONCLUSÃO .....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) se trata de uma doença causada pela *Mycobacterium tuberculosis*, sendo uma patologia facilmente evitável e geralmente curável. No entanto, em 2023, a TB foi a principal causa de morte no mundo devido a um único agente infeccioso, e anualmente, acomete mais de 10 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2024).

O Brasil é um dos países com mais alta carga da doença no mundo, sendo que a distribuição da TB está diretamente associada às condições socioeconômicas dos municípios. É uma patologia que atinge as populações mais vulneráveis, estando associada aos aglomerados urbanos, à falta de serviços básicos de saúde, à má nutrição, à alimentação inadequada e ao abuso de álcool, tabaco e outras drogas (Moreira, Kritski, Carvalho, 2020).

O tratamento da TB, quando seguido à risca, possui alto índice de eficácia. Porém, as altas frequências de desistência reduzem o percentual de cura e facilitam o desenvolvimento de linhagens multirresistentes (De Souza *et al.*, 2020). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2022, 13,6% dos pacientes com TB sensível ao tratamento abandonaram o mesmo, sendo uma proporção de 2,72 vezes maior do que o percentual de 5% estabelecido pela Organização Mundial de Saúde como o limite máximo tolerável de abandono (Brasil, 2024).

Diante desse cenário, busca-se direcionar esforços urgentes para reverter esse padrão preocupante, ressaltando a necessidade de desenvolver novos fármacos e novas combinações com fármacos já conhecidos testados no tratamento da TB com objetivos de reduzir o tempo e aumentar a efetividade do tratamento de casos de TB (Rabahi, *et al.*, 2017).

Á vista disso, os produtos naturais são considerados as fontes mais confiáveis e promissoras de moléculas bioativas, fornecendo uma perspectiva para a descoberta de inovadoras terapias contra uma variabilidade de alvos, tendo os microrganismos como os principais produtores de metabólitos secundários (Kaari *et al.*, 2023).

As actinobactérias constituem um filo de bactérias que possuem uma alta capacidade biossintética, sendo capazes de produzir metabólitos secundários ativos com próspero potencial farmacêutico, tendo o gênero *Streptomyces* como os responsáveis por aproximadamente 80% dos antibióticos utilizados clinicamente. São

bactérias Gram-positivas que habitam os mais diversos ecossistemas terrestres e aquáticos, incluindo ambientes em condições extremas, como desertos, águas profundas e cavernas (Hui *et al.*, 2021).

O solo da caatinga, bioma semiárido estritamente brasileiro, com predomínio na região Nordeste do país, mostrou-se rico em actinobactérias (Silva *et al.*, 2019). Entretanto, mesmo sendo um solo atrativo para a bioprospecção de metabólitos de actinobactérias, poucos estudos foram realizados (Medeiros *et al.*, 2018).

Diante do exposto, visto a predominância de actinobactérias no solo do bioma caatinga e a escassez de estudos avaliando o potencial dessas bactérias produzirem novos metabólitos de interesse contra micobactérias, o isolamento e elucidação desses metabólitos ativos é de grande interesse, podendo inclusive gerar novos medicamentos para o tratamento da TB.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Caatinga

A Caatinga se trata de um bioma exclusivamente brasileiro, que ocupa uma área de cerca de 862.818 km<sup>2</sup>, equivalente a 10,1% do território nacional. É o principal bioma da região Nordeste, englobando os estados Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (IBGE, 2019).

Trata-se do bioma semiárido mais diverso do mundo, abrigando 4.963 espécies de plantas e 1.182 espécies de animais (Ministério do Meio Ambiente, 2022). A vegetação é composta de arbustos baixos com troncos tortuosos, que apresentam espinhos, gramíneas e árvores xerófilas, que perdem sua folhagem em tempo de seca. É caracterizado por solos rasos e pedregosos, altas temperaturas, luminosidade intensa e escassez de precipitação e de recursos hídricos (Silva, 2013; Ministério do Meio Ambiente, 2022).

De acordo com o IBGE (2019), aproximadamente 27 milhões de pessoas vivem na área da caatinga. Parte dessa população depende dos recursos da sua biodiversidade. Tais recursos, se conservados e explorados sustentavelmente, tem o potencial de estimular o desenvolvimento da região. A biodiversidade da caatinga favorece atividades econômicas com fins agrícolas e industriais, especialmente nos ramos farmacêutico, de cosméticos, químico e de alimentos (Ministério do Meio Ambiente, 2022).

Cerca de 80% dos ecossistemas originais da Caatinga já foram alterados, principalmente por meio de desmatamentos e queimadas. A conservação desse bioma é dependente do combate à desertificação, já que 62% das áreas brasileiras suscetíveis a esse fenômeno se encontram na Caatinga (Silva *et al.*, 2004; Ministério do Meio Ambiente, 2022). No contexto internacional, há três importantes convenções das Nações Unidas às quais a Caatinga está relacionada: a Convenção de Diversidade Biológica - CDB, a Convenção de Combate à Desertificação - CCD e a Convenção de Mudanças Climáticas (Ministério do Meio Ambiente, 2022).

Figura 1 - Delimitação do bioma Caatinga, localizado na região nordeste



Fonte: IBAMA ([https://siscom.ibama.gov.br/monitora\\_biomias/PMDBBS%20-%20CAATINGA.html](https://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomias/PMDBBS%20-%20CAATINGA.html))

## 2.2 Actinobactérias

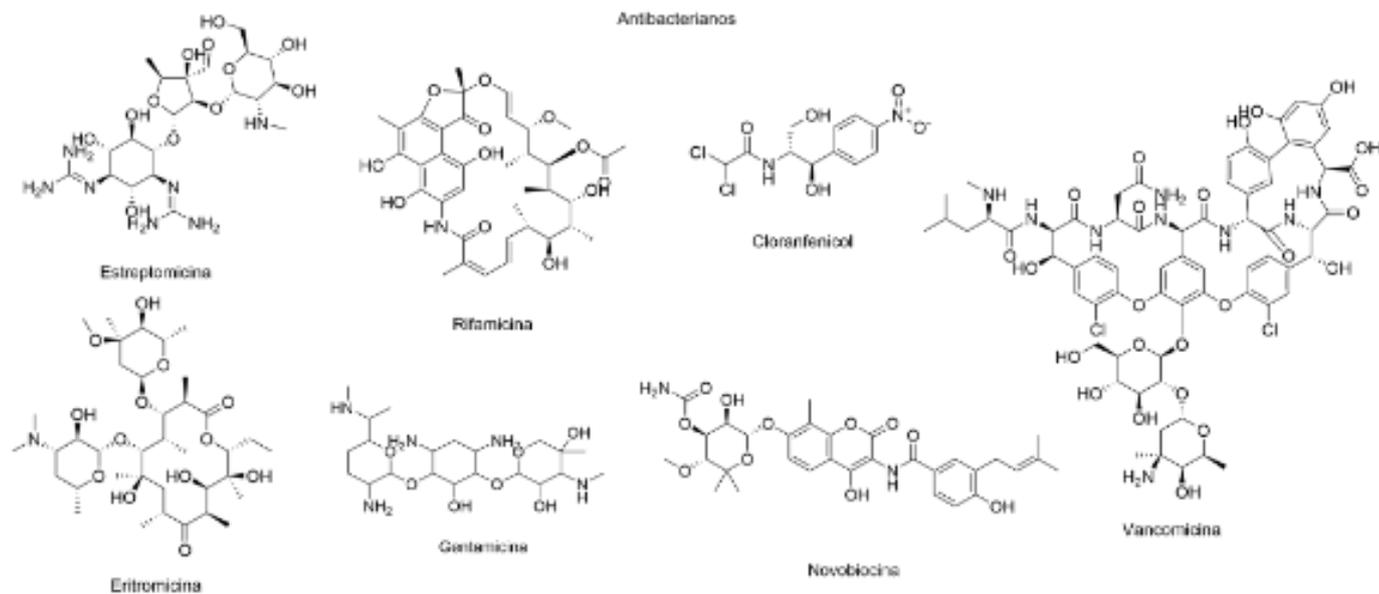
O termo *Actinobacteria* se trata de um filo composto por bactérias Gram-positivas com alto teor de guanina e citosina (G + C) em seu genoma. São encontradas na maioria dos ecossistemas terrestres e marinhos, incluindo ambientes extremos como regiões áridas e semiáridas, fontes termais, cavernas e sedimentos oceânicos. Possuem uma grande capacidade biossintética, sendo produtoras de metabólitos secundários ativos com potencial farmacêutico, agrícola, veterinário e industrial (Barka, 2015; Pimentel, 2016).

A morfologia das actinobactérias é diversa, incluindo cocóide, bastonete-cocóide, formas de hifas fragmentadas e formas com micélios ramificados permanentes e altamente diferenciados (Hui, 2021). São capazes de formar hifas, cujo objetivo é produzir esporos reprodutivos. Produzem micélio aéreo, que é utilizado para fixação e penetração em tecidos vegetais, além de liberarem enzimas que degradam compostos essenciais para sua nutrição (Medeiros, 2018; Silva, 2013). São aeróbicas, mas há exceções. Além disso, podem ser heterotróficas ou quimioautotróficas, sendo capazes de usar uma ampla variedade de fontes nutricionais, incluindo polissacarídeos complexos (Barka, 2015).

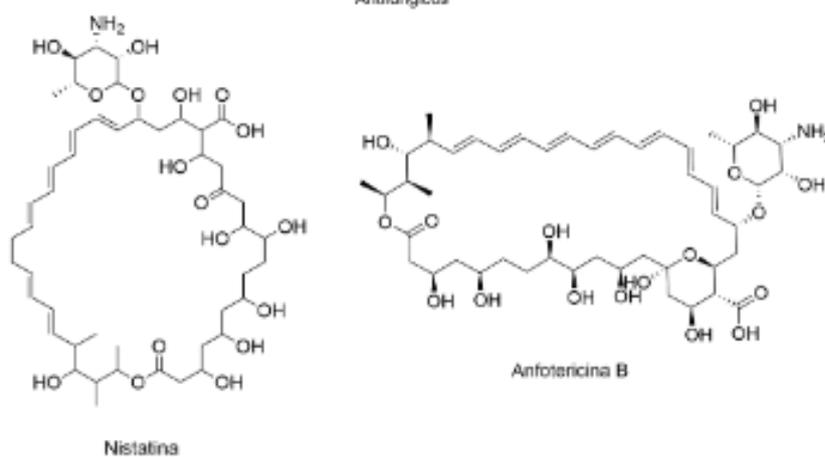
Os gêneros pertencentes a esse filo são divididos entre *Streptomyces* e não-*Streptomyces*. Entre os não-*Streptomyces*, estão os gêneros *Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Jishengella*, entre outros. O *Streptomyces* é o gênero mais conhecido entre as actinobactérias, abrigando mais de 500 espécies já identificadas (Hui, 2021). Seus filamentos possuem geralmente 0,5 – 1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, mais estreitas que as hifas de fungos, com comprimento indefinido e frequentemente sem septos. O crescimento ocorre nas extremidades das hifas, acompanhado de ramificações (Silva, 2013). Muitos dos antibióticos de uso clínico são derivados de metabólitos secundários de actinobactérias, sendo a maior parte desse quantitativo isolado do gênero *Streptomyces*. São também produtores de uma série de medicamentos antifúngicos, anti-helmínticos, antitumorais e imunossupressores, demonstrados na Figura 2 (Barka, *et al*, 2015; Jose, *et al.*, 2021).

Figura 2 - Representações estruturais de medicamentos derivados do metabolismo secundário de actinobactérias

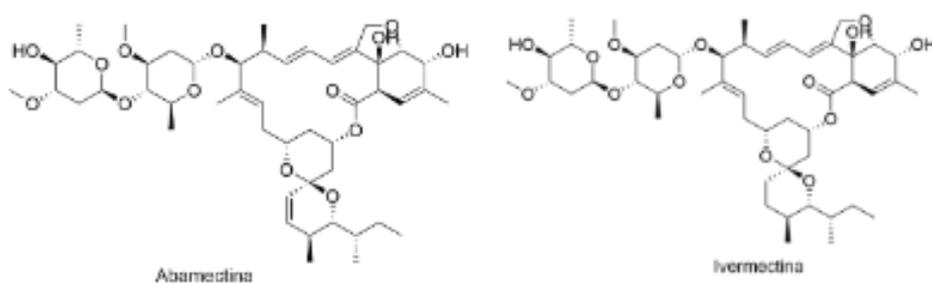
### Antibacterianos



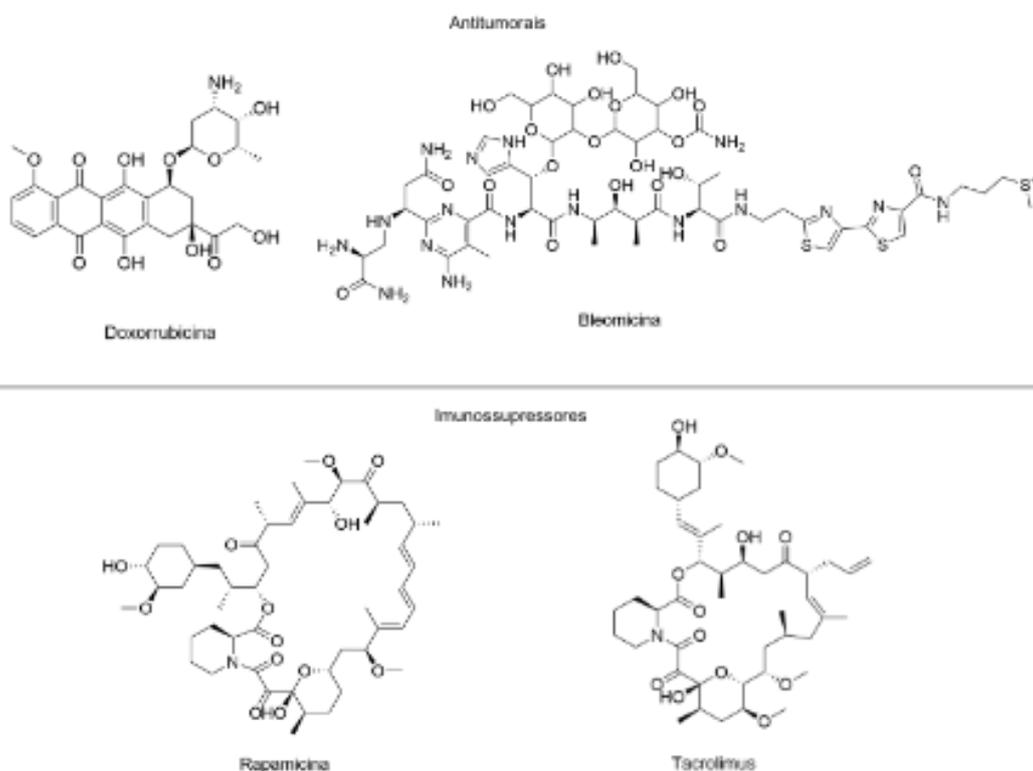
### Antifúngicos



### Anti-helmínticos



Continuação da Figura 2 - Representações estruturais de medicamentos derivados do metabolismo secundário de actinobactérias



Fonte: Adaptado de PubChem (2024)

### 2.3 Metabólitos Secundários

Metabólitos secundários são produtos sintetizados a partir de metabólitos primários e seus intermediários, através de vias metabólicas especializadas. São moléculas não essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução celular, mas que possuem um importante papel na evolução e na interação com outros seres vivos e meio ambiente (Borges e Amorim, 2020, Shah *et al.*, 2023). Ao longo dos últimos dois séculos, diferentes áreas da Bioquímica e Química de Produtos Naturais têm buscado compreender a função específica desses metabólitos tanto nos organismos de origem, como também para uso e bem-estar da humanidade (Pilon, et al., 2020).

Produtos secundários do metabolismo possuem papel contra ataques de patógenos e competição entre organismos, além de favorecerem a atração de organismos benéficos e simbiotes. Também possuem atividade protetora em relação

a estresses abióticos, como aqueles associados à temperatura, umidade, luminosidade, exposição à radiação UV, e deficiência de nutrientes (Peres, 2004).

Além da variedade de compostos secundários produtos do metabolismo de vegetais, há aproximadamente 23.000 metabólitos microbianos conhecidos, dos quais 42% são produzidos por fungos, 32% por actinobactérias e o restante por outros grupos bacterianos (Lazzarini *et al.*, 2000). Os metabólitos secundários também são utilizados como modelo para síntese e semi-síntese de moléculas bioativas de amplo espectro e baixa toxicidade (Costa Rosa, 2023).

Metabólitos secundários produzidos por actinobactérias são uma vasta fonte de substâncias biologicamente ativas (Silva, 2015). Atualmente, mais de 500 antibióticos conhecidos são produzidos por actinobactérias, sendo que, destes, mais de 60 tem aplicação prática na indústria, agricultura, medicina e veterinária. O gênero *Streptomyces* é responsável pela produção da maioria dos antibióticos comerciais, entre eles, a estreptomicina, rifamicina, cloranfenicol, eritromicina, vancomicina e novobiocina, além de antifúngicos como nistatina e anfotericina B (Figura 2) (Silva, 2013; Tortora, 2011). Ainda assim, apesar do grande potencial das actinobactérias na descoberta de novos medicamentos, apenas uma pequena fração desses micróbios foi cultivada e analisada (Hussain, *et al.*, 2020)

## 2.4 Tuberculose

A tuberculose (TB) se trata de uma doença causada pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, sendo a principal causa de morte no mundo devido a um único agente infeccioso (WHO, 2024). É uma patologia que atinge as populações mais vulneráveis, estando associada aos aglomerados urbanos, à falta de serviços básicos de saúde, à má nutrição, à alimentação inadequada e ao abuso de álcool, tabaco e outras drogas (Moreira, Kritski, Carvalho, 2020). A TB pode ser facilmente prevenida e curada, mas ainda prevalece em condições de pobreza e contribui para perpetuação da desigualdade social (Brasil, 2010).

Além de se tratar de uma emergência de saúde pública, a TB possui também graves consequências econômicas e sociais, afetando a força de trabalho, os orçamentos de saúde governamentais e as economias familiares e locais (Silva, 2021). Cerca de 75% da população afetada está no grupo economicamente ativo, de 15 a 54 anos de idade, dificultando o desenvolvimento socioeconômico (Borges e

Teixeira, 2020). Além disso, em 2018, as 1,4 milhões de mortes devido a todas as formas de tuberculose em 120 países resultaram em US\$ 580,1 bilhões em perdas de renda integral, uma média de US\$ 407.821 por morte por tuberculose (Silva, 2021). Nos Estados Unidos, estima-se que o custo de tratamento da tuberculose suscetível a medicamentos seja em média US\$ 23.000,00 por paciente (Winston, et. al, 2023).

A identificação de *M. tuberculosis* ocorreu em 1882 por Robert Koch. Pertence ao filo *Actinobacteriae*, se tratando de um bacilo ácido-alcool resistente (BAAR), com parede celular rica em lipídios (ácidos micólicos e arabinogalactano), o que lhe confere baixa permeabilidade, reduz a efetividade da maioria dos antibióticos e facilita sua sobrevivência no interior de macrófagos (Ministério Da Saúde, 2019). São bactérias aeróbias não-esporuladas, que possuem crescimento relativamente lento, com tempo de geração de 18-24 horas (Talbot, Raffa, 2015).

A sua transmissão ocorre quando um paciente com TB pulmonar expõe núcleos de gotículas no ar (geralmente por tosse), que são então inalados por uma pessoa suscetível (Talbot, Raffa, 2015). A doença pode atingir qualquer órgão ou tecido do organismo, mas a forma clínica mais frequente é a forma pulmonar. Embora o risco de adoecimento pela TB seja maior durante os dois primeiros anos após a infecção, pode persistir por toda a vida, na forma de infecção latente (Ministério da Saúde, 2015).

O tratamento preconizado pelas autoridades mundiais para TB é dividido em duas fases, consistindo na associação de medicamentos. Na primeira fase, denominada fase intensiva, utiliza-se rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol por um período de dois meses. Já na segunda fase, a fase de manutenção, utiliza-se rifampicina e isoniazida por um período de quatro meses (Rabahi *et al.*, 2017). Quando seguido à risca, o tratamento da TB possui alto índice de eficácia. Porém, as frequências de desistência do tratamento são altas, o que reduz significativamente o percentual de cura e facilita o desenvolvimento de linhagens multirresistentes. O manejo e administração inadequados dos fármacos utilizados no tratamento são fatores externos que também contribuem para o desenvolvimento da resistência de *M. tuberculosis*. (De Souza *et al.*, 2020).

*M. tuberculosis* apresenta também resistência intrínseca a diversos antimicrobianos devido à sua impermeabilidade celular e a presença de bombas de efluxo em sua parede celular. O bacilo também é produtor de enzimas hidrolíticas, como aminoglicosídeo acetil transferases e  $\beta$ -lactamases (Halicki, 2016). Tais

mecanismos atuam sinergicamente, permitindo o surgimento de cepas resistentes, responsáveis pela tuberculose multirresistente (TB-MDR) e extensivamente resistente (TB-XDR). A TB-MDR ocorre quando há resistência à rifampicina e à isoniazida, enquanto a TB-XDR há resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (Arbex, 2015).

O tratamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde para a TB resistente a medicamentos inclui medicamentos de segunda linha, como bedaquilina e fluoroquinolonas. Tais tratamentos são mais caros (em média US\$ 500 por paciente), em comparação aos tratamentos de primeira linha para TB suscetível a medicamentos (em média US\$ 50 por paciente), além de serem também mais prolongados e causarem mais efeitos adversos (WHO, 2024).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Identificar compostos antimicrobianos contra *Mycobacterium tuberculosis* derivados de uma actinobactéria isolada da Caatinga

#### 3.2 Objetivos específicos

- Cultivar e isolar metabólitos secundários provenientes da actinobactéria *Streptomyces sp.* UEPB11A.
- Verificar a ação antimicobacteriana *in vitro* dos metabólitos secundários contra *Mycobacterium tuberculosis*.
- Caracterizar a estrutura dos compostos bioativos contra *Mycobacterium tuberculosis*

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismo

O microrganismo selecionado para investigação é uma actinobactéria pertencente ao gênero *Streptomyces sp.*, denominada como *Streptomyces sp.* UEPB11A, isolada do solo semiárido brasileiro, oriunda da região de São João do Cariri, Paraíba. Estudos preliminares indicaram que os metabólitos secundários produzidos por esta cepa de *Streptomyces* demonstraram forte atividade contra *M. tuberculosis*, incluindo ação eficaz contra cepas resistentes, (manuscrito em fase de preparação).

### 4.2 Análise Morfológica da Actinobactéria *Streptomyces sp.* UEPB11A

#### 4.2.1 Avaliação do micélio aéreo e micromorfologia

Para realizar a sua caracterização macromorfológica, a *Streptomyces sp.* UEPB11A foi inoculada através da técnica de esgotamento em placa contendo o meio ágar solo (extrato de solo contendo 1,5% de ágar bacteriológico), e incubada em 28 °C ± 2 por 10 dias. Após o período de crescimento, foi realizado o registro fotográfico das colônias, para a descrição do micélio aéreo e da presença de seus esporos.

Para a avaliação da micromorfologia, foram selecionadas colônias características e adicionadas a uma lâmina previamente esterilizada. Foi realizada a coloração em lâmina com azul de metileno, e posteriormente, foi posicionada uma lamínula no topo. Suas bordas foram vedadas com esmalte incolor. A visualização da formação e ramificação do seu micélio foi feita através de microscopia ótica (aumento de 1000X).

#### 4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A actinobactéria *Streptomyces sp.* UEPB11A foi submetida à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterizar sua morfologia filamentosa e a presença de esporos em sua superfície. A bactéria foi inicialmente semeada em Plate Count Agar (digerido enzimático de caseína 5%, extrato de levedura, 2,5%, e glicose, 1%), incubada a 37°C durante 15 dias. Posteriormente, foi mantida em dessecador até desidratação total do meio de cultura e formação de um filme. Uma porção contendo colônias foi então recortada e posicionada sobre um *stub* para a técnica de MEV. A visualização foi feita no microscópio eletrônico de varredura Phenom Particle X AM (Thermo Fischer Scientific). As análises foram realizadas no Laboratório

Multiusuário de Caracterização e Análises – LMCA da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O comprimento dos esporos apresentados nas imagens capturadas foi determinado através do programa *ImageJ* (Schneider, *et. al*, 2012). O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do programa Microsoft Excel® (2024).

#### **4.3 Condições de cultivo para a produção de metabólitos secundários**

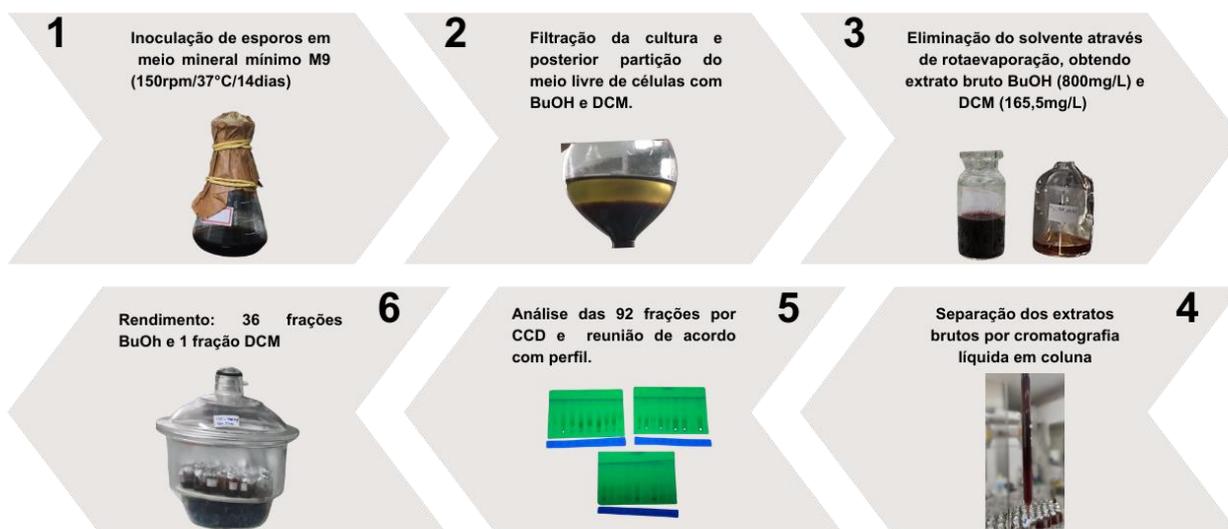
Para a produção de metabólitos secundários, a bactéria *Streptomyces sp* UEPB11A foi cultivada em 20 erlenmeyers de 250 mL (totalizando 2 litros de cultura) contendo 100 mL do meio líquido M9 (93,0 mM de sódio (Na<sup>+</sup>), 1 mM de potássio (K<sup>+</sup>), 18,7 mM de amônio (NH<sub>4</sub>), 1,0 mM de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), 0,1 mM de magnésio (Mg<sup>2+</sup>), 29,2 mM de cloro (Cl), 0,1 mM de sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), 42,2 mM de fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)) contendo 10% de glicose e mantidas em incubadora rotativa sob agitação de 150 rotações por minuto (rpm) e temperatura de 37 °C durante 14 dias. Em seguida, os cultivos foram filtrados, a fim de separar a biomassa do sobrenadante, que foi utilizado para a extração dos metabólitos secundários.

#### **4.4 Isolamento dos metabólitos secundários**

O sobrenadante obtido da filtração foi submetido a um processo de extração líquido-líquido utilizando diclorometano (DCM) e butanol (BuOH), na proporção de uma parte de sobrenadante do cultivo e uma parte de solvente orgânico, em um funil de separação. A fase orgânica foi separada e o solvente eliminado através de um processo de evaporação a baixa pressão. Ao final do processo, foram obtidos os extratos orgânicos brutos (DCM e BuOH) contendo os metabólitos secundários da *Streptomyces sp*. UEPB11A solúveis nesses solventes.

A separação dos compostos do extrato orgânico bruto BuOH ocorreu através de cromatografia líquida em coluna de sílica 60 (0,04-0,063 mm; Merck). A fase móvel utilizada foi composta por solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, butanol e metanol, em fluxo de aproximadamente 0,5 mL por minuto. As frações foram coletadas em intervalos de 10 minutos e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD). Após a CCD, as frações foram analisadas e reunidas, se compatíveis (mesmo composto/perfil na fração).

Figura 3 - Fluxograma da metodologia de isolamento dos metabólitos secundários



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

## 4.5 Atividade dos compostos contra *M. tuberculosis* H37Ra

### 4.5.1 Screening de Atividade contra *M. tuberculosis* H37Ra

As 36 frações isoladas a partir do extrato orgânico bruto BuOH e a fração DCM de *Streptomyces* sp. UEPB11A foram reconstituídos em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração de 4 mg/mL. Em seguida, foram diluídas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco) para atingir uma concentração de 100 µg/mL. A linhagem H37Ra de *M. tuberculosis* (linhagem avirulenta) foi cultivada em meio Middlebrook 7H9 líquido durante 15 dias. Para os ensaios, a micobactéria foi diluída a uma densidade óptica (OD<sub>600</sub> nm) de 0,006 em Middlebrook 7H9 e 100 µL foram adicionados a cada poço das placas de 96 poços de poliestireno com fundo em U.

Após incubação a 37 °C por 7 dias, 30 µL de uma solução de resazurina estéril (0,02%) foi adicionada às placas e os resultados avaliados após 48 horas de incubação (Sidrônio, *et al.*, 2021). Foi avaliada a capacidade de cada fração de impedir o metabolismo do microrganismo. Um metabolismo funcional é indicado através da conversão de resazurina (cor azul) a resorufina (cor rosa). Dessa maneira, na ausência da conversão, conclui-se que a fração testada foi eficaz em inibir o metabolismo micobacteriano.

#### **4.5.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima contra *M. tuberculosis* H37Ra**

O ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado de acordo com Sidrônio, *et al.* (2021). As 22 frações com atividade demonstrada no *screening* foram reconstituídos em DMSO, na concentração de 4 mg/mL. Em seguida, foram diluídas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco) para atingir uma concentração de 100 µg/mL. Foi realizada a diluição seriada em faixas de concentração de 100-0,8 µg/mL, em placas de 96 poços de poliestireno com fundo em U. A linhagem H37Ra de *M. tuberculosis* (linhagem avirulenta) foi cultivada em meio Middlebrook 7H9 líquido durante 15 dias. Para os ensaios, a micobactéria foi diluída a uma densidade óptica (OD<sub>600</sub> nm) de 0,006 em Middlebrook 7H9 e 100 µL foram adicionados a cada poço da placa.

Após incubação a 37 °C por 7 dias, 30 µL de uma solução de resazurina estéril (0,02%) foi adicionada às placas e os resultados avaliados após 48 horas de incubação. Foi avaliada a capacidade de cada fração de inibir o metabolismo micobacteriano através da avaliação da conversão de resazurina a resorufina.

Para o ensaio, foram realizados controles positivos utilizando os antibióticos moxifloxacino (MOXI) e rifampicina (RIFA). Para o MOXI, preparou-se uma solução estoque de 60 µM em DMSO, da qual foram retirados 50 µL, diluídos em 950 µL de meio, resultando em uma solução de 3 µM. Após diluição com a micobactéria, a concentração final no poço mais concentrado foi de 1,5 µM. Para a RIFA, foi preparada uma solução estoque de 10 µM em DMSO, utilizando 50 µL dessa solução diluídos em 950 µL de meio, para obtenção de uma solução final de 0,5 µM. Com a diluição com a micobactéria, a concentração final no poço mais concentrado foi de 0,25 µM. Foi também realizado o controle negativo do ensaio.

### **4.6 Elucidação estrutural de compostos com atividade antimicobacteriana**

#### **4.6.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear**

Para auxiliar na identificação química dos compostos ativos, foram obtidos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A fração DCM, com maior atividade antimicobacteriana (contra MTB H37Ra), foi submetida a um campo magnético externo, que fez com que os núcleos que possuem um momento magnético nuclear (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) entrassem em ressonância com a radiofrequência aplicada, e absorvessem energia eletromagnética em frequências singulares de cada núcleo.

A amostra foi enviada para o Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises – LMCA/UFPB. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500MHz e 125MHz) foram obtidos pelos aparelhos Bruker Avance Neo 500 MHz. A amostra foi colocada em tubo de 5mm e foi utilizado  $\text{CDCl}_3$  como solvente. Foram utilizadas as técnicas APT, HSQC e HMBC.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise Morfológica da Actinobactéria *Streptomyces sp.* UEPB11A

#### 5.1.1 Avaliação do micélio aéreo e micromorfologia

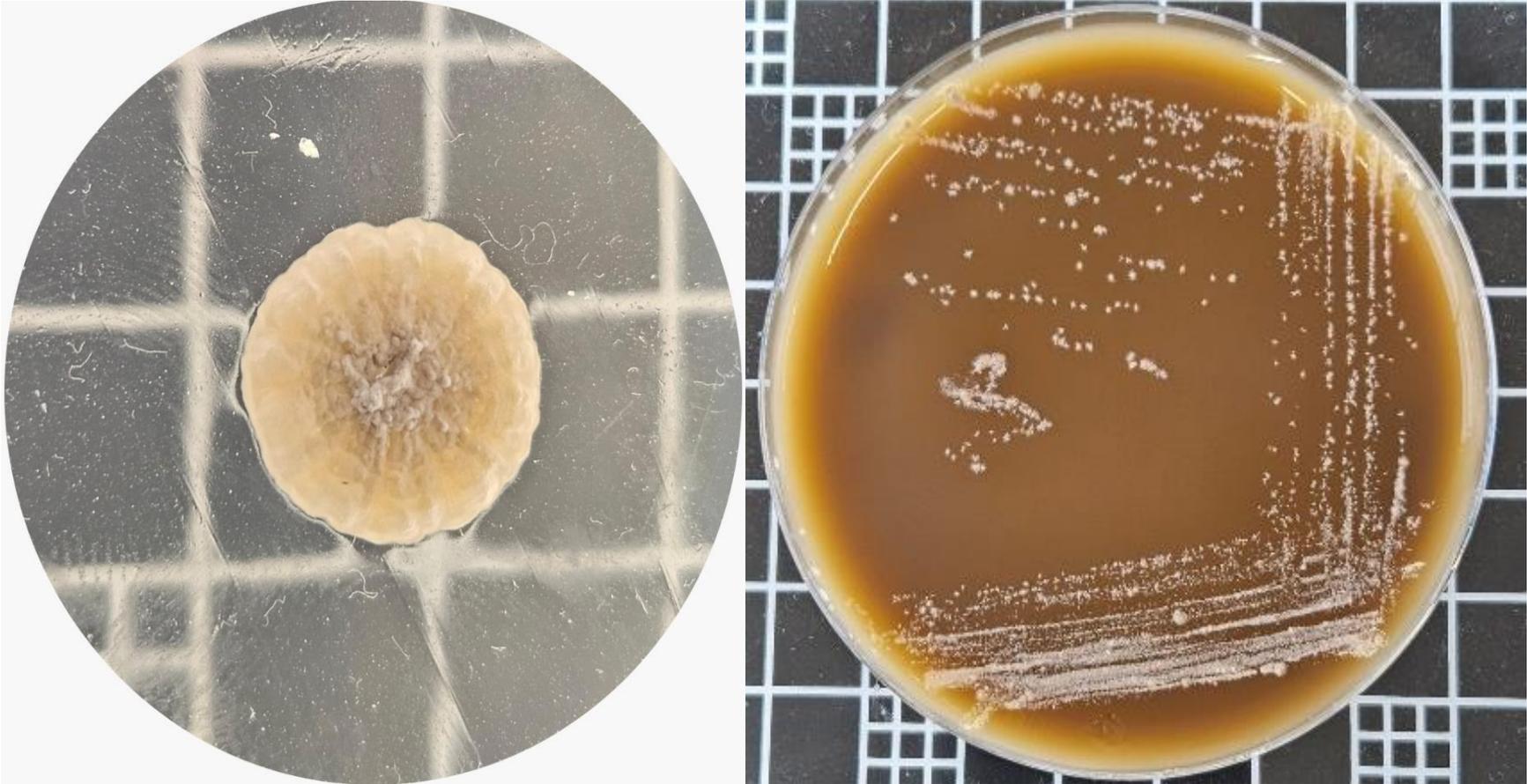
A identificação de actinobactérias através da sua morfologia é um processo legítimo, sendo importante a caracterização de aspectos como a ramificação do micélio sobre o meio, formação e fragmentação do micélio aéreo, sua coloração e produção de esporos (Lechevalier, 1967; Silva, 2019).

Constatou-se que a *Streptomyces sp.* UEPB11A apresenta morfologia macroscópica distinta quando inoculada em diferentes meios. Em ágar Müller-Hinton (Figura 4A), a cepa inoculada apresentou colônias de coloração creme, com aspecto convexo, textura liqueniforme, além de formação de esporos de coloração branca. Já em ágar solo (figura 4B), houve a formação de colônias puntiformes, aveludadas, com coloração branca e grande quantidade de esporos. Tal distinção pode ser explicada pelo fato de actinobactérias apresentarem características culturais discrepantes de acordo com a superfície de ágar em que são inoculadas (Shouche e Bhati, 2019).

De acordo com Shouche e Bhati (2019), o micélio aéreo de actinobactérias possui coloração variada, incluindo branco, creme, calcário, marrom, cinza a rosado e violeta. Pesquisas de caracterização fenotípica de cepas de actinobactérias do semiárido brasileiro evidenciam a diversidade cromogênica e textural desse filo. Ramos et al. (2015) e Silva et al. (2015), observaram a predominância das cores cinza, creme e branca. Já Silva (2019), e Oliveira (2020) encontraram predominância de aspectos aveludado e radial com sulcos em actinobactérias pertencentes ao semiárido brasileiro.

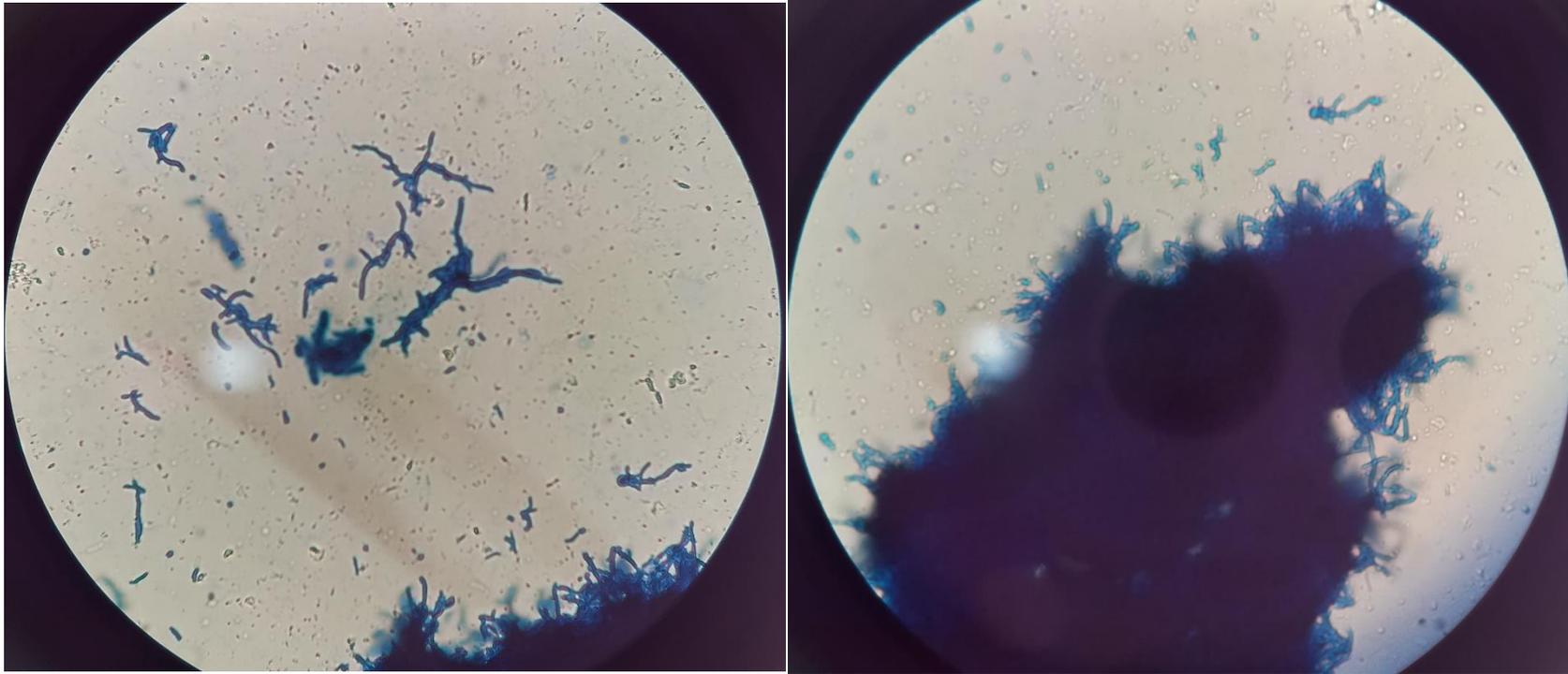
Através da análise micromorfológica, foi possível identificar sua forma filamentosa. Seus filamentos estão representados na figura 5A, apresentando-se como um emaranhado de hifas, como pode ser visualizado na figura 5B. De acordo com Santos, *et. al* (2019), Actinobactérias apresentam uma abundante variedade morfológica, podendo ser cocóides como *Micrococcus*, cocobacilo como *Arthrobacter*, filamentos fragmentados como *Nocardia*, sendo que o gênero *Streptomyces*, como demonstrado na cepa UEPB11A, se apresenta como hifas filamentosas.

Figura 4 - Micélio aéreo da actinobactéria UEPB11A em meios Ágar Müller-Hinton (a) e Ágar Solo (b)



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Figura 5 - Registro fotográfico das estruturas micromorfológicas da *Streptomyces* UEPB11A. Lâmina corada com azul de metileno. Aumento de 1000X.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

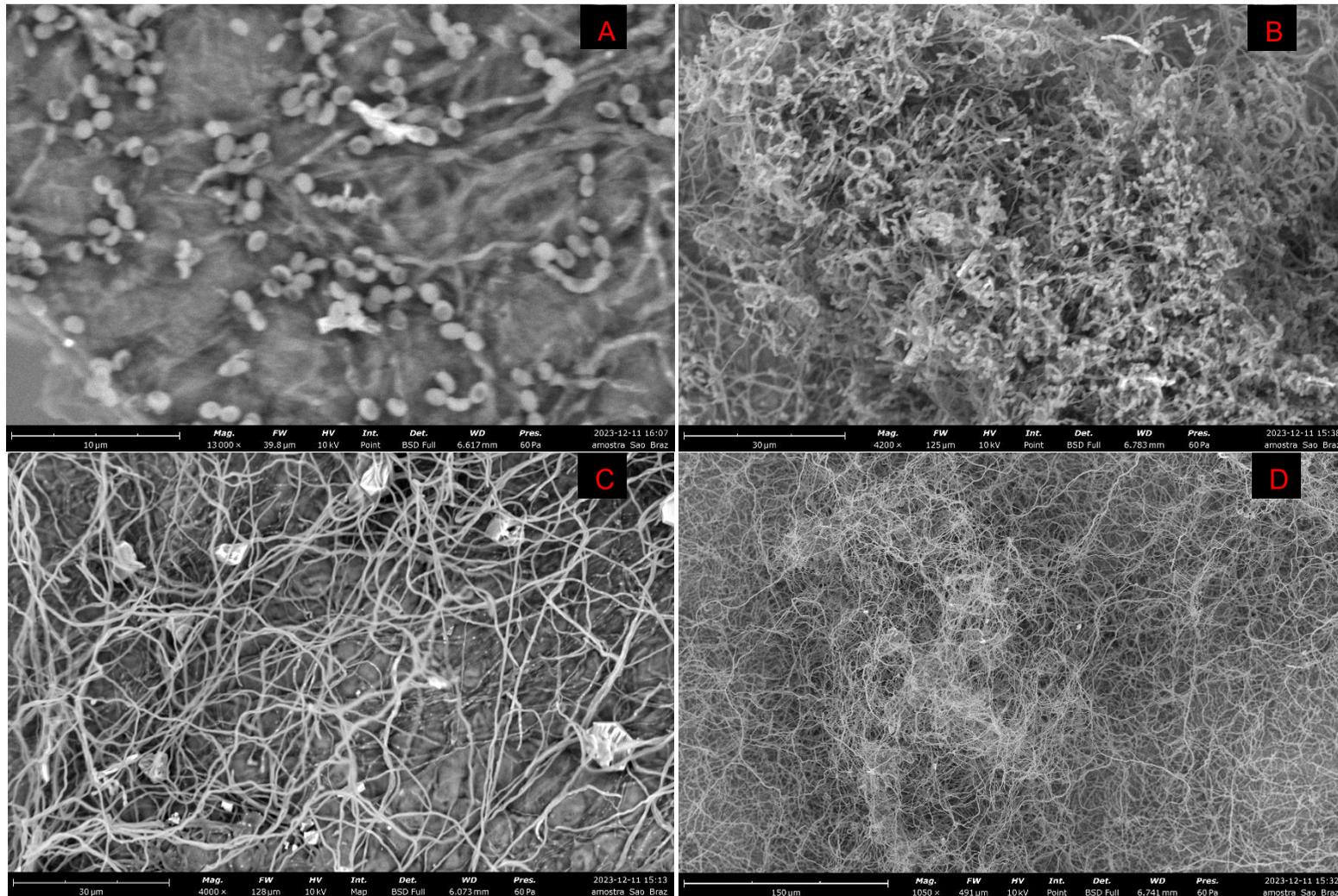
### 5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Imagens obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura demonstraram a morfologia do micélio e esporos da *Streptomyces sp.* UEPB11A. O micélio apresentou-se como um emaranhado de longas hifas filamentosas (figuras 6C e 6D). A estrutura de uma célula de hifa corresponde à organização bacteriana: o citoplasma contém regiões de DNA genômico, ribossomos e várias inclusões contendo substâncias de reserva, como polifosfatos, lipídios ou polissacarídeo (Li, *et. al*, 2016)

Os esporos observados através de MEV possuem comprimento médio de 1,17  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,14 \mu\text{m}$ ), estando dispostos em cadeia (Figura 6B), com morfologia reniforme e glabra (Figura 6A). De acordo com Li, *et al* (2016), o gênero *Streptomyces* classicamente apresenta o padrão de formação de múltiplos esporos com formato esférico a oval, com comprimento variando entre 0,7 e 1,5  $\mu\text{m}$ , sendo geralmente transportados em aglomerados ramificados em hifas do micélio do substrato.

O crescimento do micélio e a formação de esporos são os critérios morfológicos mais importantes para o reconhecimento de uma actinobactéria (Li, *et al*, 2016). O processo de esporulação é influenciado por uma série de sinalizações genéticas, além das condições de cultivo (Chater e Chandra, 2006). O gênero *Streptomyces* possui características que se assemelham a fungos filamentosos, como as hifas ramificadas que formam micélio vegetativo e os esporos reprodutivos. Tais semelhanças ocorrem devido a adaptações a pressões ecológicas similares, apesar de diferentes mecanismos de origem (Canova, 2009).

Figura 6 - Imagens da morfologia da *Streptomyces sp.* UEPB11A, obtidas através de MEV. A – Esporos da *Streptomyces sp.* UEPB11A, sob magnificação de 13.000X. B- Esporos da *Streptomyces sp.* UEPB11A sob magnificação de 4.200X. C - Estrutura filamentosa da *Streptomyces sp.* UEPB11A, sob magnificação de 4000X. D - Estrutura filamentosa da *Streptomyces sp.* UEPB11A, sob magnificação de 1050X.



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

## 5.2 Atividade dos compostos contra *M. tuberculosis*

Através da triagem de atividade antimicobacteriana, foi demonstrado que 21 frações possuem a capacidade de inibir o crescimento de *M. tuberculosis H37Ra*. Tais frações foram submetidas ao ensaio de microdiluição para a determinação da CIM, no qual foi constatado que 7 frações inibiram o crescimento da *M. tuberculosis H37Ra* em diluições iguais ou inferiores a 50 µg/mL. A fração 2-3 apresentou CIM de 6,25 µg/mL, e a fração 4, de 3,125 µg/mL, como explanado na Tabela 1. A fração DCM também apresentou CIM de 3,125 µg/mL.

Para tal ensaio, foi realizado o controle positivo com as drogas rifampicina e moxifloxacino, que inibiram o crescimento de *M. tuberculosis H37Ra* com o valor aproximado de CIM de 0,02 e 0,1 µg/mL, respectivamente. O solvente DMSO (2,5%) não apresentou atividade inibitória significativa contra a micobactéria.

Tabela 1 - Frações ativas em ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima.

	Frações Ativas	CIM (µg/mL)
Frações BuOH provenientes da <i>Streptomyces sp. UEPB11A</i>	F2-3	6,25
	F4	3,125
	F4-7	12,5
	F8-11	25
	F12-14	50
	F15-16	50
	F41	25
	Fração DCM	3,125
Controle	Rifampicina	0,02
	Moxifloxacino	0,1

Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

A descoberta de potenciais novos antimicobacterianos, embora possa implicar em compostos com atividade branda em relação aos medicamentos tradicionais, deve ser valorizada, dada a dificuldade de se encontrar novas drogas que possam entrar

no estágio clínico (Rakhmawatie, et. al, 2021). Tais metabólitos se tornam ainda mais relevantes por serem derivados de uma *Streptomyces*, gênero que já demonstrou capacidade de geração de antimicobacterianos eficazes na prática clínica (Guimarães, et. al, 2010).

Rakhmawatie *et. al* (2021) realizaram o isolamento de dois compostos com atividade antimicobacteriana de uma *Streptomyces parvulus*, na Indonésia: Composto 1, semelhante à dimetenamida, com valor de CIM de 100 µg/ml, e o Composto 2, a actinomicina D, com valor de CIM de 0,78 µg/ml.

Produtos de metabolismo secundário de bactérias são cruciais para o descobrimento de novas drogas, devido a geração de novos *scaffolds* químicos estruturalmente diversos, que podem servir de modelo para semi-síntese ou derivatização, assim como inspiração para novos fármacos sintéticos (Rakhmawatie, *et al.* 2021).

### **5.3 Elucidação estrutural do composto isolado da fração DCM com atividade antimicobacteriana**

#### **5.3.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) apresentou sinais na região entre 0,8 e 12,66 ppm (Figuras 9, 10 e 11 e 12), sendo observados singletos em  $\delta_{\text{H}}$  11,46 (s, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  12,66 (s, 1H), sugestivos de hidrogênios de hidroxilas ligadas a carbonos pertencentes à cadeia cíclica.

Observou-se a presença de dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,30 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,68 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), e um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,73 (t,  $J = 7,75$  Hz, 1H), característicos de hidrogênios diretamente ligados aos carbonos aromáticos C11, C9 e C10, respectivamente.

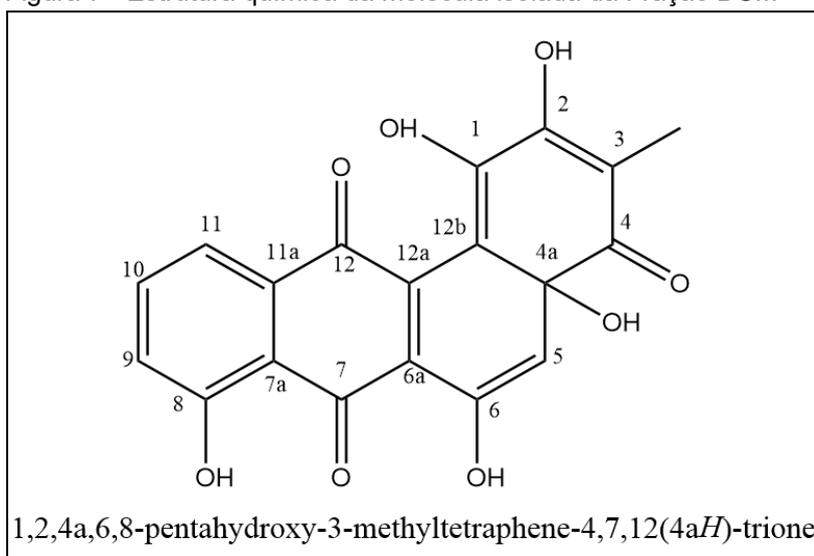
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , obtido através da técnica APT ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz), apresentou sinais entre 8,73 e 192,18 ppm (Figura 13). Foram observados sinais em  $\delta_{\text{C}}$  182,3 e  $\delta_{\text{H}}$  192,2, sugestivos de carbonilas presentes nos carbonos C12, C4 e C7. A presença dos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  162,3,  $\delta_{\text{C}}$  124,2,  $\delta_{\text{C}}$  138,4 e  $\delta_{\text{C}}$  120,1 são característicos dos carbonos aromáticos C8, C9, C10 e C11, respectivamente. Os carbonos hidroxilados C1, C2, C4A, C6 e C8 foram localizados nos sinais  $\delta_{\text{C}}$  177,9,  $\delta_{\text{C}}$  155,2,  $\delta_{\text{C}}$  79,1,  $\delta_{\text{C}}$  166,0 e  $\delta_{\text{C}}$  162,3.

De acordo com os dados espectros unidimensionais de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (figuras 9 e 13 respectivamente), e através das interpretações dos espectros de correlação HSQC e HMBC (figuras 14 e 15, respectivamente), foi possível deduzir que a estrutura em questão se trata de um policetídeo aromático policíclico com esqueleto tetracíclico angular de benzantraceno, característico de anguciclinas.

A molécula encontrada no presente estudo (1,2,4a,6,8-pentahydroxy-3-methyltetraphene-4,7,12(4aH)-trione) revela uma estrutura tetracíclica angular e padrões de substituição semelhantes à anguciclina dehidrorabelomicina (Tabela 2). Yamashita *et. al* (1997) realizaram o isolamento e determinação estrutural dessa molécula (figura 8), também conhecida como dehidrorabelomicina, a partir do extrato EtOAc contendo os metabólitos secundários de *Streptomyces sp.* NA30664. Tal molécula, derivada da rabelomicina, apresenta atividade antitumoral, antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória (De Koning, *et. al*, 2020).

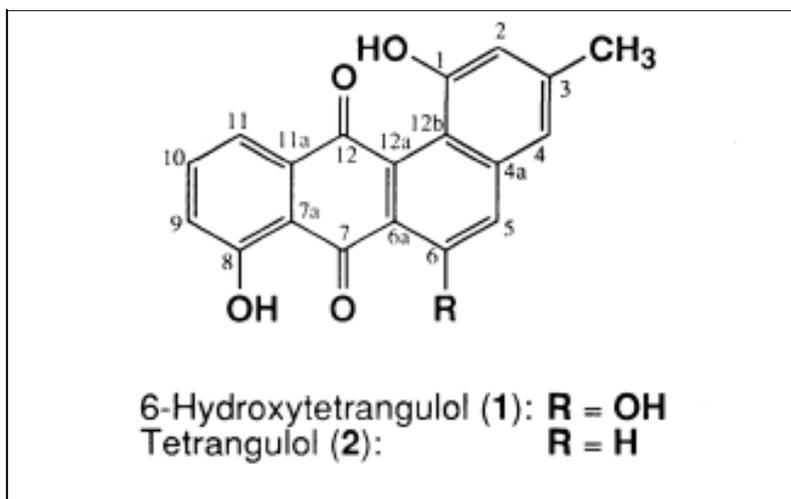
Essa classe de produtos naturais aromáticos possui uma ampla gama de propriedades biológicas, como antimicrobiana, antifúngica e antitumoral, sendo predominantemente isolada de actinobactérias como *Streptomyces*. O interesse em anguciclinas vem aumentando continuamente devido às suas características estruturais inéditas, propriedades biomédicas e caminhos biossintéticos bem compreendidos (Vysloužilová, Kováč, 2024).

Figura 7 - Estrutura química da molécula isolada da Fração DCM



Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Figura 8 - Estrutura química da molécula Dehidrorabelomicina



Fonte: Yamashita, *et al.*, 1997.

Tabela 2 - Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz e 125 MHz) da molécula UEPB11A-DCM, comparados com dados da literatura <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz e 125 MHz) (Yamashita, *et. al*, 1997)

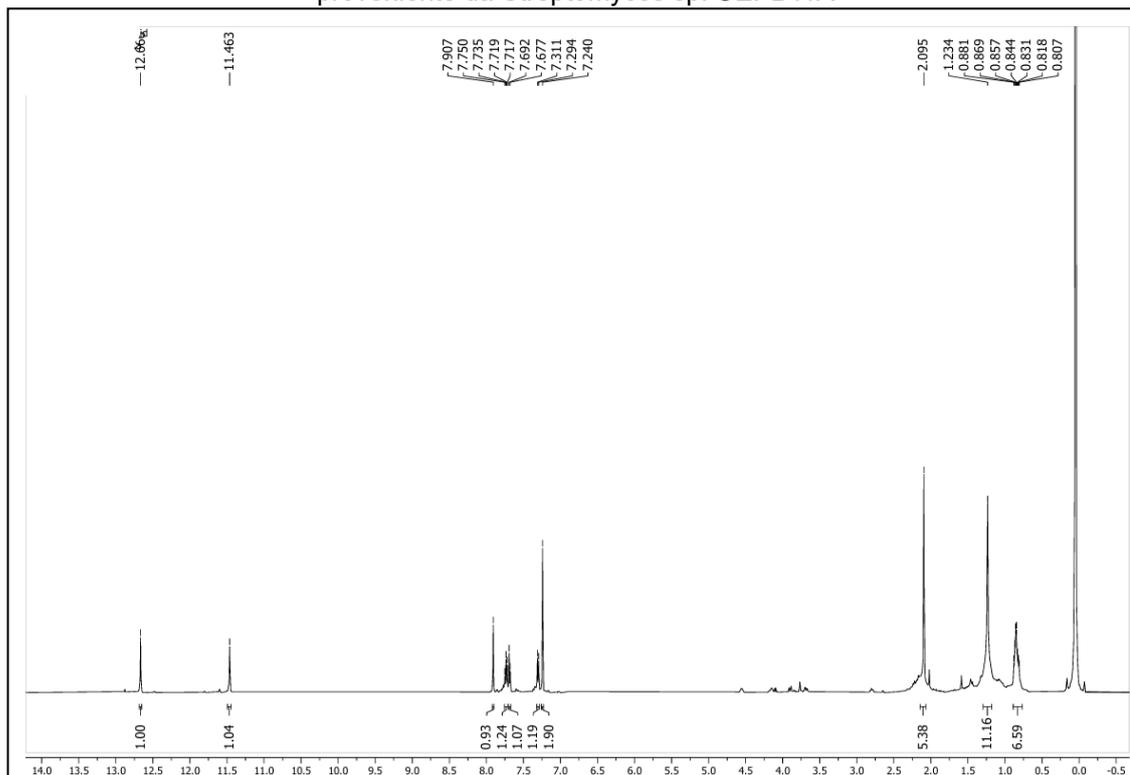
Molécula UEPB11A-DCM			Literatura
C	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>c</sub>
1	177,9	-	154,3
2	155,2	-	118,4
3	119,6	-	118,2
4A	79,1	-	142,8
4	182,3	-	119,7
6	166,0	-	156,5
6A	139,7	-	119,6
7	192,2	-	193,1
7A	114,9	-	114,7
8	162,3	-	161,9
11A	135,8	-	134,9
12	182,3	-	189,1
12A	122,4	-	132,7

Continuação da Tabela 3 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz e 125 MHz) da molécula UEPB11A-DCM, comparados com dados da literatura  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz e 125 MHz) (Yamashita, *et. al*, 1997)

<b>12B</b>	141,0	-	141,5
<b>CH</b>			
<b>5</b>	120,5	7,90 (s)	124,0
<b>9</b>	124,2	7,68 (d, $J = 7,5$ Hz)	125,1
<b>10</b>	138,4	7,73 (t, $J = 7,75$ Hz)	137,7
<b>11</b>	120,1	7,30 (d, $J = 8,5$ Hz)	121,5
<b>CH3</b>			
<b>3-Me</b>	8,7	2,09 (s)	21,4
<b>OH</b>			
<b>C1-OH</b>	-	-	
<b>C2-OH</b>	-	-	
<b>C4A-OH</b>	-	-	
<b>C6-OH</b>	-	12,66 (s)	
<b>C8-OH</b>	-	11,46 (s)	

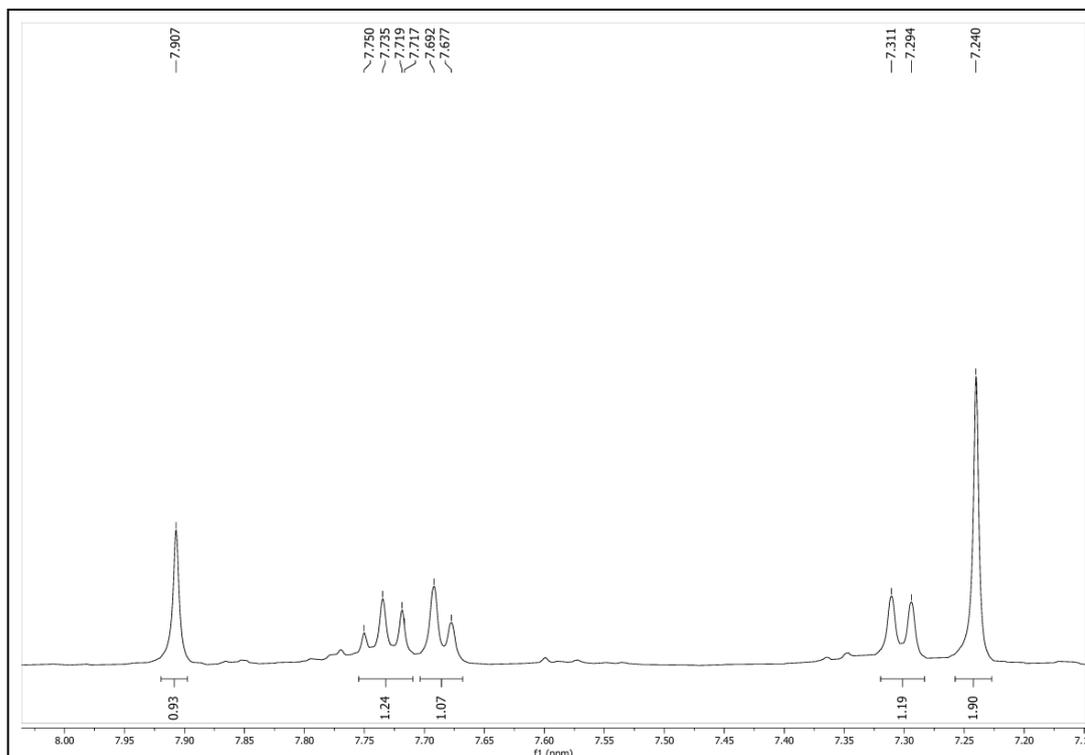
Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Figura 9 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM, proveniente da *Streptomyces* sp. UEPB11A



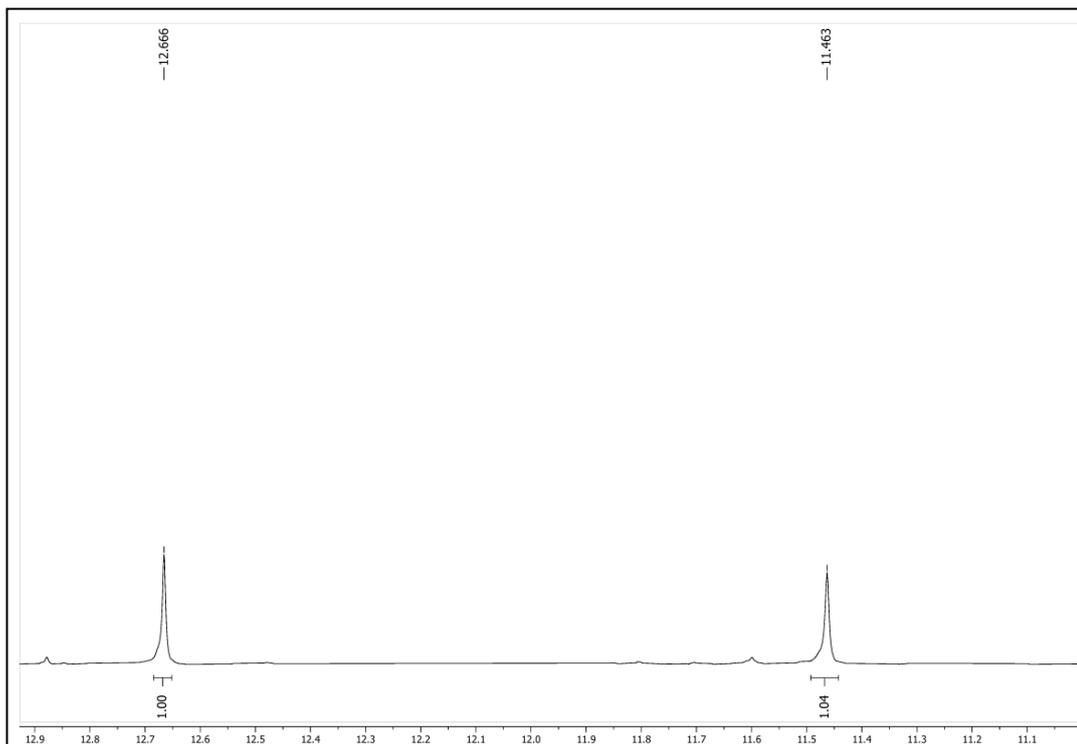
Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Figura 10 - Expansão do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM



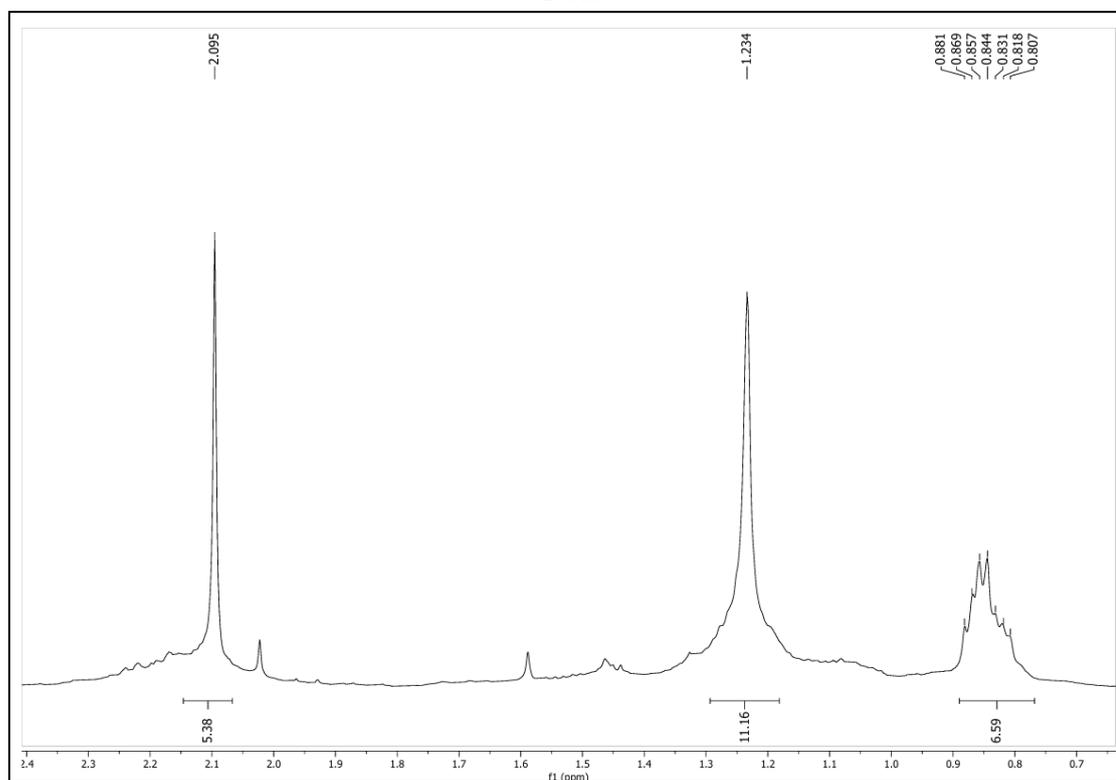
Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Figura 11 - Expansão do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM

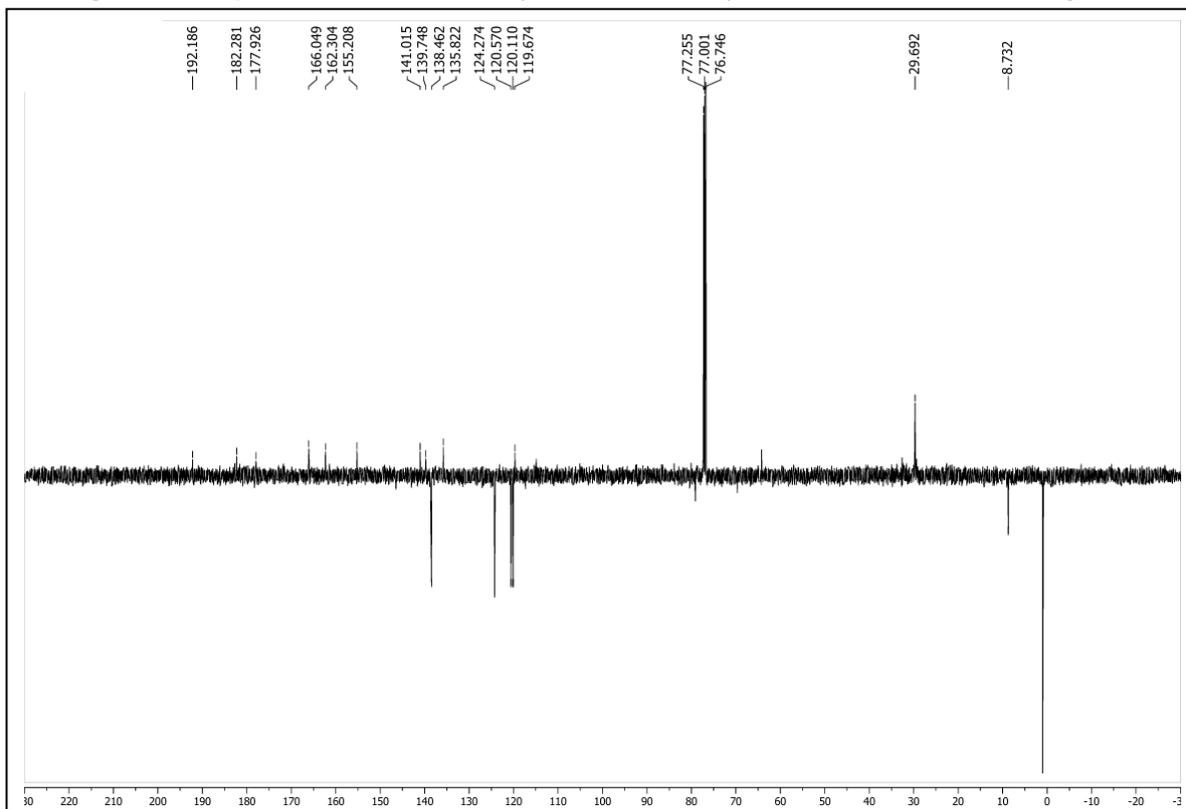


Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

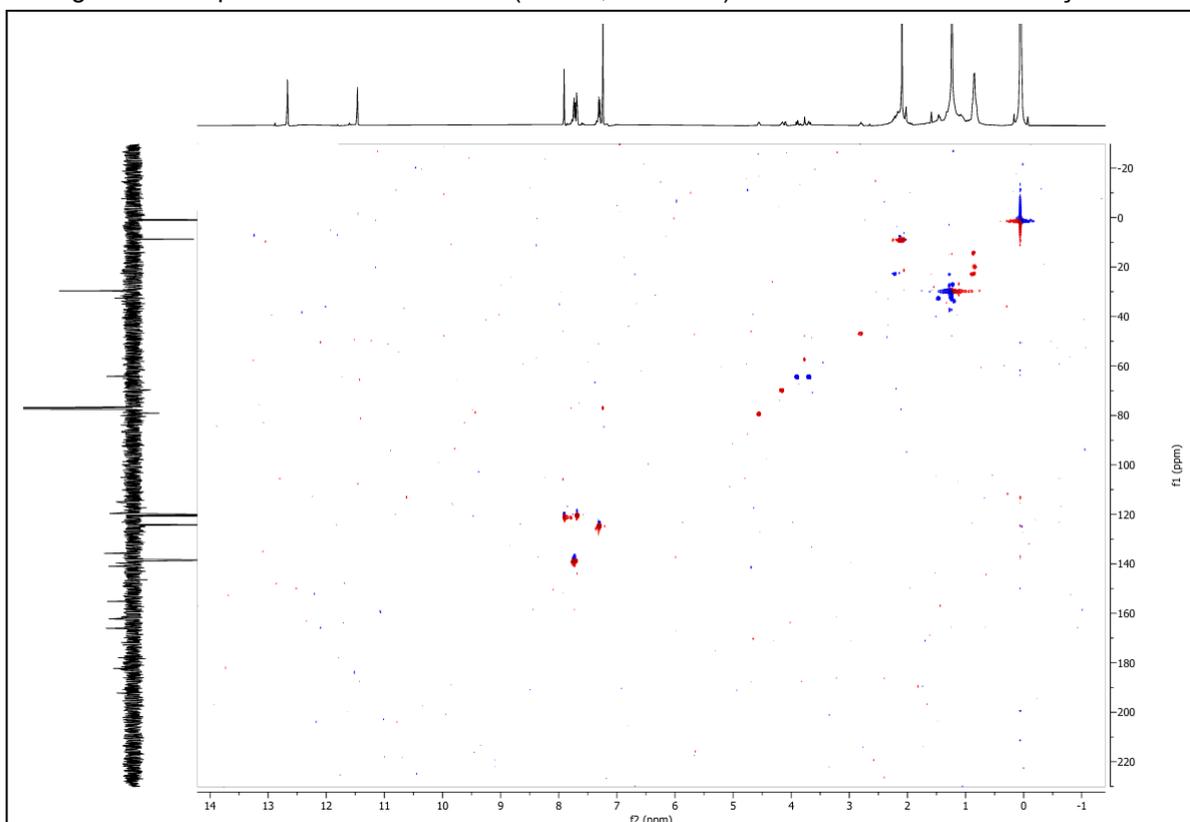
Figura 12 - Expansão do Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da molécula isolada da Fração DCM



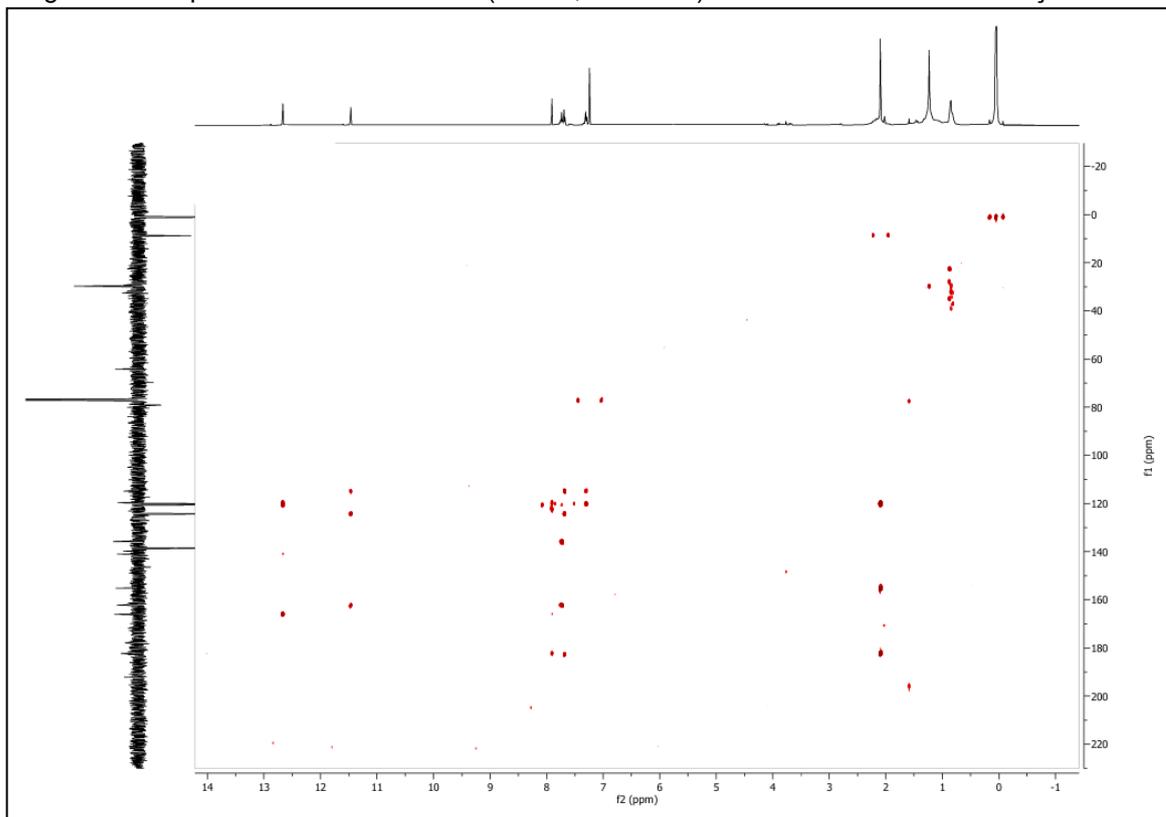
Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Figura 13 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da molécula isolada da Fração DCM

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Figura 14 - Espectro de RMN – HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da molécula isolada da Fração DCM

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

Figura 15 - Espectro de RMN – HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da molécula isolada da Fração DCM

Fonte: Dados da pesquisa, 2024.

## 6 CONCLUSÃO

A actinobactéria *Streptomyces sp.* UEPB11A, isolada do solo do semiárido brasileiro, produziu metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* H37Ra. O fracionamento e purificação dos extratos brutos butanólico e diclorometano, contendo os metabólitos secundários, e os subsequentes testes de atividade, revelaram 8 frações com atividade antimicobacteriana. A fração F4-BUT e a Fração DCM apresentaram valores de CIM de 3,125 µg/mL.

A análise da fração DCM, através de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , resultou na elucidação estrutural de uma molécula pertencente ao grupo químico das anguciclinas. Foi também realizada a identificação e caracterização macro e microscópica da *Streptomyces sp.* UEPB11A.

É de grande relevância a realização, em subsequentes estudos, de testes contra a cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, além da elucidação estrutural de outros compostos com boa atividade antimicobacteriana, avaliação do mecanismo de ação e perfil de segurança e toxicidade dos compostos isolados.

Essa pesquisa contribuiu para a expansão do conhecimento sobre os recursos biotecnológicos da região do Cariri e seu potencial impacto na produção de novos medicamentos.

## REFERÊNCIAS

- ANBALMANI, S.; MURTHY, S.; SAHU, A. K.; DISSE, M.; DASTAGER, S. G.; RAMASAMY, B. A Novel Finding: 2, 4-Di-tert-butylphenol from *Streptomyces bacillaris* ANS2 Effective Against *Mycobacterium tuberculosis* and Cancer Cell Lines. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-14, 2023. DOI: [10.1007/s12010-023-04403-2](https://doi.org/10.1007/s12010-023-04403-2)
- ARBEX, M. A. et al. The challenge of managing extensively drug-resistant tuberculosis at a referral hospital in the state of São Paulo, Brazil: a report of three cases. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 41, n. 6, p. 554–559, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562015000000299>
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–43, 25 nov. 2015. DOI: [10.1128/MMBR.00019-15](https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15)
- BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos Secundários de Plantas. **Revista Agrotecnologia - Agrotec**, v. 11, n. 1, p. 54–67, 2020. Disponível em: <https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/9705#:~:text=Resumo,e%20aditivos%20arom%C3%A1ticos%20e%20corantes>. Acesso em: 11/09/2024.
- BORGES, V. F.; TEIXEIRA, E. C. Efeito da tuberculose sobre os rendimentos do trabalho no Brasil. **RDE - Revista de Desenvolvimento Econômico**, v. 2, n. 46, 2020. <http://dx.doi.org/10.36810/rde.v2i46.6451>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Tuberculose, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/aidsp/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2024/boletim-epidemiologico-tuberculose-2024/view> Acesso em: 13 set. 2024.
- CANOVA, S. P. Diversidade e Bioprospeção de Actinobactérias Isoladas de Manguezais. 66 f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. <https://doi.org/10.11606/D.87.2009.tde-08052009-092624>
- CHATER KF, CHANDRA G. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. **FEMS Microbiol Rev** 2006;30:651-72. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00033.x
- COSTA ROSA, Fernanda; GONÇALVES MOTA, Alexya; LIMA DE ALMEIDA, Barbara; DOS SANTOS DE SOUZA, Gessiane; CARVALHO ARAÚJO, Maria; FRANZOI MELO, Maycon Henrique; SILVA DOS SANTOS ALIANÇA, Amanda; MIRANDA DE MENDONÇA, Rita de Cássia. Importância dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias. **Revista Ciências da Saúde Ceuma**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 72–87, 2023. DOI: 10.61695/rcs.v1i1.6
- DE KONING, C. B.; NGWIRA, K. J.; ROUSSEAU, A. L. Biosynthesis, synthetic studies, and biological activities of the jadomycin alkaloids and related analogues.

Em: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 125–199.  
<https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2020.02.001>

DE SOUZA, C. O.; PEREIRA, F. A.; SOUSA, M. I. M. O.; LACERDA, R. L. Aspectos que influenciam o abandono do tratamento farmacológico da tuberculose: revisão de literatura. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 14, n. 19, 2020. Disponível em: <https://www.revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/articloe/view/1103> Acesso em: 13 set. 2024.

FERNANDES, D, *et al.* Conheça e Conserve a Caatinga – A Floresta que é a Cara do Brasil. Projeto No Clima da Caatinga. ISBN nº 978-65-995589-1-7. s.d. Disponível em: <https://www.noclimadacaatinga.org.br/wp-content/uploads/livro-conheca-e-conserve-a-caatinga-no-clima-da-caatinga-primeiras.pdf> Acesso em: 08/09/2024

HUI, M. L. Y.; TAN, L. T. H.; LETCHUMANAN, V.; HE, Y. W.; FANG, C. M.; CHAN, K. G.; LAW, J. W. F.; LEE, L. H. H. The extremophilic actinobacteria: From microbes to medicine. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, 2021.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>

HUSSAIN, A.; HASSAN, Q. P.; SHOUCHE, Y. S. New approaches for antituberculosis leads from Actinobacteria. **Drug discovery today**, v. 25, n. 12, p. 2335–2342, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.005>

IBGE. **Biomass e Sistema Costeiro-Marinho do Brasil**. Série Relatórios Metodológicos. Vol 45. 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101676.pdf> Acesso: 08/09/2024

JOSE, P. A.; MAHARSHI, A.; JHA, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological research**, v. 246, n. 126708, p. 126708, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708>

KAARI, M.; JOSEPH, J.; MANIKKAM, R.; KALYANASUNDARAM, R.; SHIVARAJ, A.; LAZZARINI A *et al.* **Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000;78:399-405.  
<https://doi.org/10.1023/A:1010287600557>.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, n. 21, p. 71-100, 1967.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.21.100167.000443>

LI, Q. *et al.* Morphological identification of Actinobacteria. Em: DHANASEKARAN, D.; JIANG, Y. (Eds.). **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**. Londres, England: InTech, 2016. DOI:[10.5772/61461](https://doi.org/10.5772/61461)

MEDEIROS, E. *et al.* DIVERSIDADE CULTURAL DE CEPAS DE ACTINOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 27, p. 205–218, 20 jun. 2018. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2018a/biol/diversidade.pdf> . Acesso: 09/09/2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2ª ed., 2019. Disponível em: [https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/manual\\_recomendacoes\\_tb\\_2ed\\_atualizada\\_8maio19.pdf](https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/manual_recomendacoes_tb_2ed_atualizada_8maio19.pdf). Acesso em: 12/09/2024.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Caatinga. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-biomas/biomas-e-ecossistemas/biomas/caatinga> . Acesso em 10/09/2024.

MOREIRA, A. DA S. R.; KRITSKI, A. L.; CARVALHO, A. C. C. Determinantes sociais da saúde e custos catastróficos associados ao diagnóstico e tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, p. e20200015, 18 nov. 2020. <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20200015>

PERES, L. E.P. Metabolismo Secundário. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004. Disponível em: <https://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762>. Acesso em 12/09/2024.

PILON, A. et al. Metabolômica De Plantas: Métodos E Desafios. **Química nova**, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>. Acesso em 13/10/2024

PIMENTEL, I. C. Actinobactérias. In: NÉRI, Á. (Ed.). **Guia Prático de Biologia do Solo**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016. p. 43–48. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142758/1/Diana-5.pdf>  
Acesso em: 13 set. 2024

RABAHI, M. F. *et al.* Tuberculosis treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 6, p. 472–486, dez. 2017. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000388>

RAKHMAWATIE, M. D. et al. Potential secondary metabolite from Indonesian Actinobacteria (InaCC A758) against Mycobacterium tuberculosis. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 24, n. 8, p. 1058–1068, 2021.  
DOI: [10.22038/ijbms.2021.56468.12601](https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.56468.12601)

RAMOS K.A., BRITO F.A.E., NUNES K.J.F., MARTINS C.M., MARTINS S.C.S. Characterization and crhomogenic diversity of actinobacteria from undisturbed microbial niche in the caatinga biome. **Encicl. Biosf.** 11:2115-2125. DOI: 10.5897/AJB2016.15724

SANTOS, F. et al. MORFOLOGIA DE CEPAS DE ACTINOBACTÉRIAS EM ÁREAS SUSCETÍVEIS À DESERTIFICAÇÃO. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 1911–1924, 2019. DOI: [10.18677/EnciBio\\_2019A148](https://doi.org/10.18677/EnciBio_2019A148)

SHAH, A. A. *et al.* Secondary metabolites of lichens and their application. Em: **Fungal Secondary Metabolites**. [s.l.] Elsevier, 2024. p. 91–115. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95241-5.00013-7>

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SIDRÔNIO, M. G. S. *et al.* Effects of tafenoquine against active, dormant and resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 128, n. 102089, p. 102089, 2021. DOI: [10.1016/j.tube.2021.102089](https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102089)

SILVA, J.M.C., TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Secretaria de Biodiversidade e Florestas**, Ministério do Meio Ambiente, Brasília-DF. Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SILVA, L. H. F. Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Ciências (Química) pela Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <[https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-14122015-145453/publico/Tese\\_SILVA\\_LHF\\_corrigena.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-14122015-145453/publico/Tese_SILVA_LHF_corrigena.pdf)>. Acesso em: 13 set. 2024.

SILVA, M. J. S.; DE SOUSA, J. B.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Diversidade de cepas de actinobactérias da RPPN “Fazenda Não me Deixes” - Quixadá (CE). **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, 2019. DOI:[10.18677/ENCIBIO\\_2019A143](https://doi.org/10.18677/ENCIBIO_2019A143)

SILVA, G. R. D. Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga. 2013 Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/13351>>. Acesso em 08/09/2024.

SILVA, S. *et al.* Economic impact of tuberculosis mortality in 120 countries and the cost of not achieving the Sustainable Development Goals tuberculosis targets: a full-income analysis. **The Lancet. Global health**, v. 9, n. 10, p. e1372–e1379, 2021. DOI: [10.1016/S2214-109X\(21\)00299-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00299-0)

SILVA, V.M.A., LIMA, J.V.L., GONDIM, P.M., MARTINS, C.M., MARTINS, S.C.S. Effect of irrigation and type of cultivation on richness and diversity of chromogenic actinobacteria of soil from ceará semiarid region. **Encicl. Biosf.** 2015. 11:2965-2979. DOI:[10.18677/Enciclopedia\\_Biosfe](https://doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfe)

TALBOT, E. A.; RAFFA, B. J. *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Medical Microbiology**, v. 3, 2ª ed., p. 1637–1653, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00092-5>

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; Microbiologia. 10ª ed., Editora Artmed, 2011. 894 p.

VYSLOUŽILOVÁ, D.; KOVÁČ, O. The chemistry of angucyclines. **ChemPlusChem**, 2024. <https://doi.org/10.1002/cplu.202400307>

WHO. Global Tuberculosis Report 2024. Disponível em:  
[https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/379339/9789240101531-  
eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/379339/9789240101531-eng.pdf?sequence=1) Acesso em 30 out. 2024.

WINSTON, CA, MARKS SM, CARR W. Estimated Costs of 4-Month Pulmonary Tuberculosis Treatment Regimen, United States. ***Emerg Infect Dis.*** 2023;29(10):2102-2104. doi:10.3201/eid2910.230314 doi: [10.3201/eid2910.230314](https://doi.org/10.3201/eid2910.230314)

YAMASHITA, N. et al. 6-HydroxytetraanguloL a new CPP32 protease inducer produced by streptomyca sp. ***The Journal of antibiotics***, v. 51, n. 1, p. 79–81, 1998. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.51.79>