

**UFRRJ**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**TESE**

**Avaliação das Atividades Antifúngicas de  
Substâncias Sintéticas Frente a Fungos  
Micotoxigênicos de Interesse Agropecuário**

**Rojane de Oliveira Paiva**

**2013**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS DE SUBSTÂNCIAS  
SINTÉTICAS FRENTE A FUNGOS MICOTOXIGÊNICOS DE  
INTERESSE AGROPECUÁRIO**

**ROJANE DE OLIVEIRA PAIVA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Aurea Echevarria Aznar Neves Lima**

*e Co-orientação das Professoras*  
**Liliana Inés Sabini de Rivarola e**

**Lucimar Ferreira Kneipp**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora** no  
Programa de Pós-Graduação em Ciência,  
Tecnologia e Inovação em Agropecuária,  
Àrea de Concentração em Patobiologia  
Animal

Seropédica, RJ  
Março, 2013

668.652

P149a

T

Paiva, Rojane de Oliveira, 1958-

Avaliação das atividades antifúngicas de substâncias sintéticas frente a fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário / Rojane de Oliveira Paiva – 2013.

90f. : il.

Orientador: Áurea Echevaria Aznar Neves Lima.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária.  
Bibliografia: f. 60-70.

1. Fungicidas – Teses. 2. Aspergillus – Teses. 3. Fusarium – Teses. 4. Penicillium – Teses. 5. Micotoxinas – Teses. I. Lima, Áurea Echevaria Aznar Neves, 1950-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
EM AGROPECUÁRIA**

**ROJANE DE OLIVEIRA PAIVA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós- Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM 21/03/2013

---

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima. Dra. USP  
(Orientadora)

---

Aurea Maria Lage de Moraes. Dra., Fiocruz

---

Daniela Sales Alviano. Dra., UFRJ

---

Carlos Wilson Gomes Lopes. Ph.D., MSU-EUA

---

Fabio Barbour Scott. Dr., UFRRJ

Ao meu filho Ronald Paiva  
com todo amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que é toda luz em minha vida, por essa vitória e por ter me dado a oportunidade de passar por essa experiência profissional.

Agradeço a todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e de modo especial:

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária.

À Dra. Lucia Helena dos Anjos, Coordenadora do Programa de Pós- Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária - PPGCTIA, pelo incentivo e atenção durante a realização deste curso.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Aurea Echevarria Aznar Neves Lima pela oportunidade, credibilidade, confiança e pela contribuição em meu crescimento profissional e pessoal.

Aos Professores e alunos da Pós-Graduação do DEQUIM, pelo apoio e amizade durante o curso.

À Prof<sup>a</sup> Lucimar Ferreira Kneipp pela orientação e contribuição no desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço aos servidores e alunos do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, pela convivência diária durante a realização dos experimentos.

À Dra. Gisela Lara da Costa do Instituto Oswaldo Cruz, sempre prestativa e atenciosa durante a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora da Argentina Prof<sup>a</sup> Liliana Sabini Inés de Rivarola pelo apoio e carinho dedicados durante a realização dos experimentos na Argentina.

Ao Prof Mário Gatti do Instituto Oswaldo Cruz por ceder as cepas fúngicas utilizadas neste trabalho.

À Dra. Laura Noelia Cariddi da Universidade Nacional de Rio Cuarto pela amizade e atenção durante a minha permanência na Argentina.

À secretária da Pós-graduação Renata, sempre prestativa e atenciosa, pelo pronto atendimento em todos os momentos.

A todos os meus mestres pelas orientações e esclarecimentos nos momentos mais difíceis durante a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho.

## RESUMO

PAIVA, Rojane de Oliveira. 2013. **Avaliação das atividades antifúngicas de substâncias sintéticas frente a fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário**. 90f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Fungos micotoxigênicos causam prejuízos econômicos no setor agropecuário. O objetivo do trabalho foi avaliar as atividades antifúngicas de substâncias sintéticas frente a fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário no Brasil e na Argentina. Foram determinadas a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias das classes semicarbazonas, tiosemicarbazonas monossubstituídas, tiosemicarbazonas dissubstituídas, bases de Schiff e compostos da classe mesoiônicos frente a fungos *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum*. Substâncias com atividade antifúngica foram selecionadas para estudo de possíveis vias de mecanismo de ação. Foram avaliadas as influências das substâncias no conteúdo do ergosterol, no desenvolvimento do sistema vegetativo fúngico, no efeito quelante do  $Fe^{2+}$  e citotoxicidade. O MIC e o MFC foram determinados para 9 semicarbazonas (**SM 1-9**), sendo que **SM-1** e **SM-4** tiveram efeito fungistático frente *A. flavus* e *F. verticillioides*. Foram avaliadas 8 tiosemicarbazonas monossubstituídas (**TS 1-8**), sendo que sete substâncias tiveram efeito fungistático, **TS-6** teve efeito fungistático frente a todas as espécies do gênero *Aspergillus* e efeito fungicida frente *F. verticillioides*. *A. parasiticus* foi mais sensível à ação dessas substâncias. Nessa classe, foram avaliadas 36 tiosemicarbazonas dissubstituídas, (**TS 1-36**) sendo que 13 substâncias tiveram atividade antifúngica frente *A. parasiticus* e ao fungo leveduriforme *Candida albicans*. Foram avaliadas as atividades antimicrobianas de 7 substâncias da classe bases de Schiff (**BS 1-7**), todas tiveram efeito fungistático e **BS-7** teve ação fungicida. As substâncias tiveram atividade antibacteriana. Avaliados 16 compostos mesoiônicos, (**MI 1-16**), destacamos que *F. verticillioides* foi mais sensível frente aos compostos com valores de MICs na faixa de 7,8 a 125  $\mu\text{g/mL}$ . A série de compostos mesoiônicos que tiveram maior efeito antifúngico foi a fenil-substituída com grupos doadores de elétrons (**MI-11** e **16**) seguida pela estiril-substituída com anel ligado diretamente ao carbono do anel heterocíclico (**MI-1-3** e **5**). Destacam-se os valores de MICs iguais a 7,8  $\mu\text{g/mL}$  e 15,6  $\mu\text{g/mL}$  para os derivados **MI-11** e **3**, respectivamente. As espécies *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* tiveram MICs = 250  $\mu\text{g/mL}$  para **MI-5** e MIC = 31,2  $\mu\text{g/mL}$  e MFC = 125  $\mu\text{g/mL}$  para *F. verticillioides*. As substâncias tiosemicarbazonas (**TS-3** e **TS-6**) e compostos mesoiônicos (**MI-2**, **MI-11** e **MI-16**) inibiram o conteúdo de ergosterol de *A. parasiticus* e *F. verticillioides*, avaliado através de cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC). As tiosemicarbazonas **TS-3** e **TS-6** alteraram o desenvolvimento do sistema vegetativo de *A. parasiticus*. O efeito quelante do  $Fe^{2+}$  por **TS-6** foi confirmado pela técnica de espectroscopia de UV-Visível. Finalmente, a avaliação da citotoxicidade da substância da classe tiosemicarbazona monossubstituída (**TS-6**) foi realizada empregando-se células Vero e a Máxima Concentração Não Citotóxica (MCNC) foi calculada (MCNC = 75  $\mu\text{g/ml}$ ). Além disso, a Concentração Citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) foi também determinada ( $CC_{50}$  = 136  $\mu\text{g/ml}$ ) por captação de vermelho neutro e ( $CC_{50}$  = 344  $\mu\text{g/ml}$ ) por redução metabólica de MTT. Os resultados sugerem atividades antifúngicas de substâncias de todas as classes estudadas frente a fungos micotoxigênicos contaminantes de alimentos.

**Palavras chave:** Antifúngicos, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, Micotoxicologia

## ABSTRACT

PAIVA, Rojane de Oliveira. 2013. **Evaluation of antifungal activities of synthetic substances against mycotoxigenic fungi of agricultural interest**. 90p. Thesis (Doctor em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Fungi mycotoxigenic cause economic losses in the agricultural sector. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of synthetic substances against fungi mycotoxigenic of agricultural interest in Brazil and Argentina. They were measured the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of the classes of substances semicarbazones, monosubstituted thiosemicarbazones, disubstituted thiosemicarbazones, Schiff bases and the class mesoionic compounds against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides* and *Penicillium citrinum*. Substances with antifungal activity were selected to study the possible routes of action mechanism. The influence of the substances on the ergosterol content, in the fungal development of the vegetative system, and chelating effect of  $\text{Fe}^{2+}$  and cytotoxicity were evaluated. The MIC and MFC were determined for 9 semicarbazones (**SM 1-9**), and **SM-1** and **SM-4** had fungistatic effect against *A. flavus* and *F. verticillioides*. The 8 monosubstituted thiosemicarbazones (**TS 1-8**) were evaluated, and 7 substances have fungistatic effect, **TS-6** had fungistatic effect against all species of the genus *Aspergillus* and fungicidal showed effect against *F. verticillioides*. *A. parasiticus* was more sensitive to the action of these substances. In this class, 36 disubstituted thiosemicarbazones were evaluated, (**TS 1-36**) whence 13 substances have antimicrobial activity against *A. parasiticus* and *Candida albicans* yeast. Sevemn substances from Schiff base class derived from aldehydes and aminopyridine were evaluated, all of which had fungistatic effect, but (**BS-7**) presented fungicidal action. The substances showed antibacterial activity. Antifungal activities of 16 mesoionic compounds (**MI 1-16**) were investigated. Most of mesoionic compounds showed antifungal activity against all fungi evaluated. *F. verticillioides* had higher sensitivity with MIC values varied from 7.8 to 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Phenyl-substituted with groups of electron donors (**MI-11** and **16**) was the series of mesoionic compounds with the highest antifungal effect; followed by esteryl-substituted with ring directly linked to the heterocyclic ring-carbon (**MI-1-3** and **5**). **MI-11** and **3** derivatives have the most prominent MIC values of 7.8 and 15.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. *A. flavus*, *A. nomius* and *A. parasiticus* had MICs = 250  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for **MI-5** and MIC = 31.2  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and MFC = 125  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for *F. verticillioides*. The substances thiosemicarbazones (**TS-3** and **TS-6**) and mesoionic compounds (**MI-2**, **MI-11** e **MI-16**) decreased ergosterol content, evaluated by high performance thin layer chromatography (HPTLC) in *A. parasiticus* and *F. verticillioides*. The thiosemicarbazones **TS-3** and **TS-6** altered the development of the vegetative system of *A. parasiticus*. The quelant effect determined by UV-Visible spectroscopy for **TS-6** against  $\text{Fe}^{2+}$  ions was confirmed. Finally, the cytotoxicity evaluation of substance from the monosubstituted thiosemicarbazone classes (**TS-6**) was performed with Vero cells and maximum non-cytotoxic concentration (MNCC) was calculated (MNCC = 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). In addition, 50% cytotoxic concentration ( $\text{CC}_{50}$ ) was also determined ( $\text{CC}_{50}$  = 136  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) by neutral-red uptake and ( $\text{CC}_{50}$  = 344  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) by MTT metabolic reduction. Results suggest antifungal activities against mycotoxigenic fungi of the substances from all the researched classes.

**Key words:** Antifungal, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, Mycotoxicology.



## RESUMEN AMPLIADO

PAIVA, Rojane de Oliveira. 2013. **Evaluación de la atividade antifúngica de las sustancias sintéticas contra hongos micotoxigénicos de interés agrícola**. 90p. Tesis (Doctorado en Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

### 1. Introducción

Los hongos micotoxigénicos causan pérdidas económicas en la agricultura brasileña y argentina. La proyección del Ministerio de Agricultura es que en 2030, un tercio de los productos que se comercializan sean de Brasil, debido a la creciente demanda de los países asiáticos. Brasil es el tercer mayor productor de maíz, por un total de 53,2 millones de toneladas en 2009/2010. La primera idea es el cultivo de grano para satisfacer el consumo en la mesa de los brasileños, pero esto es una parte menor de la producción. El principal destino de la cosecha son las industrias de alimentos para animales. En 2019/2020, la producción se espera que sea 70,12 millones de toneladas y el consumo en 56,20 millones de toneladas. Estos resultados indican que Brasil debe hacer ajustes para asegurar el abastecimiento del mercado interno y obtener excedentes para la exportación, estimada en 12,6 millones de toneladas en 2019/2020. Ese número podría alcanzar los 19,2 millones de toneladas. El Brasil está entre los países que tendrán un aumento significativo de las exportaciones de maíz, junto a Argentina (MAPA, 2003).

En los climas tropicales y subtropicales, como el Brasil, el crecimiento de hongos se ve favorecida por factores como la humedad y la temperatura. Los hongos crecen y proliferan bien en cereales, especialmente en maíz, maní, trigo, cebada, sorgo y arroz, donde generalmente encuentran un sustrato muy nutritivo para su desarrollo. El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en los cereales puede producirse en diversas etapas de desarrollo, maduración, la recolección, el transporte, el procesamiento o el almacenamiento de granos (DILKIN, 2002; GALVANO et al., 2005; AMARAL et al., 2006).

Hongos micotoxigénicos se conocen desde los tiempos bíblicos, y luego, los brotes de micotoxicosis ocurrido periódicamente en ciertas regiones. Sin embargo, en la década de 1950, las enfermedades como aleucia tóxica alimentaria (ATA), en Ucrania y los brotes de eczema facial en ovejas, se describe en Nueva Zelanda, enfermedades se asociaron con la presencia de hongos en los alimentos consumidos. El estudio de las micotoxinas tuvo sus inicios en la década de 1960, cuando dominaron la Guerra Fría, cuando se produjo un evento en Inglaterra, que despertó gran interés internacional y la movilización de varios investigadores. En el episodio, se produjo la muerte de miles de aves de corral que se llama "enfermedad X de los pavos" por tener causa desconocida. Después de realizar análisis microbiológicos y químicos, se verificó la presencia de *Aspergillus flavus* en los cacahuetes importados de Brasil utilizados en la alimentación de aves de corral. Entonces fue posible demostrar que el hongo era responsable de producir una micotoxina llamada aflatoxina responsable de la alta mortalidad de las aves. A partir de este episodio, otras especies de hongos y sus micotoxinas se han describe y en la década de 1980, se han producido grandes avances en la investigación científica en la identificación de estos agentes tóxicos (BENNETT; KLICH, 2003; SPINOSA et al., 2008). Así se produjo el descubrimiento de las aflatoxinas y un nuevo campo de la investigación científica: el Micotoxicología.

La Toxicología, es definida por la Organización Mundial de la Salud como la "*disciplina que estudia los efectos nocivos de los agentes químicos y de los agentes físicos*

(agentes tóxicos) en los sistemas biológicos y que establece además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a dichos agentes. Se ocupa de la naturaleza y de los mecanismos de las lesiones y de la evaluación de los diversos cambios biológicos producidos por los agentes nocivos" (COREY, 1988).

Los cultivos de tejidos y células pueden ser altamente sensibles a las sustancias químicas y permiten a los investigadores abordar múltiples líneas de ensayo. Los cultivos de células han sido utilizados en la investigación sobre el cáncer, Parkinson, en el desarrollo de drogas anti-VIH, toxicidad general y Alzheimer. Es por estas razones que el empleo de sistemas celulares en monocapas es una herramienta utilísima para evaluar el potencial daño tóxico ejercido por diferentes sustancias.

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* necesarios para el registro de una sustancia, se encuentran los llamados "ensayos de citotoxicidad". Mediante estos ensayos es posible detectar los efectos adversos y/o de interferencia de una sustancia con diferentes estructuras y/o mecanismos celulares tales como: la integridad de la membrana, el citoesqueleto, el metabolismo, la síntesis y/o degradación, la liberación de constituyentes celulares o productos, la regulación iónica o la división celular (REPETTO, 2002).

En la actualidad la evaluación de sustancias con capacidad antifúngica frente a hongos micotoxigénicos representa un área de gran interés. Aunque la posibilidad de encontrar sustancias obtenidas por síntesis química, que ejerzan un control sobre hongos micotoxigénicos, con impacto negativo en la producción agropecuaria y en la salud humana y animal, exige ampliar el espectro de las investigaciones con este tipo de moléculas.

En Brasil, niveles de micotoxinas fueron regulados recientemente por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, ANVISA través de la Resolución - RDC n° 7, 18 de febrero de 2011, que establece los límites máximos para las aflatoxinas (B1 + B2 + G1 + G2 y M1), la ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), las fumonisinas (FB1), la patulina (PAT) y zearalenona (ZON) en alimentos preparados para ofrecer a los consumidores y las materias primas (ANVISA, 2011). El reglamento entró en vigor y los plazos para que los productores adapten concluyeran en enero de 2016. La normativa de la ANVISA indican los límites de las micotoxinas en 14 categorías de alimentos, como la leche y los productos lácteos, jugos de manzana y uva, café tostado (molido o en grano) y soluble, entre otros términos y de acuerdo a los riesgos sanitarios implicados para cada una de las micotoxinas y alimentos para los consumidores infantiles, que representan el mayor riesgo (ANVISA, 2011).

La Contaminación de los alimentos por micotoxinas es un tema complejo, aumentando las innovaciones tecnológicas y las medidas profilácticas para el crecimiento de hongos en los alimentos. De acuerdo a lo indicado precedentemente, existe la necesidad de resolver el problema mediante programas de control profiláctico, para disminuir las pérdidas económicas en Brasil y Argentina. Los alimentos deben cumplir con condiciones y exigencias para la calidad y seguridad alimentaria y requieren adopción de medidas profilácticas para controlar hongos contaminantes que repercuten directamente en la salud y producción animal.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la actividad antifúngica de sustancias sintéticas contra hongos micotoxigénicos de interés agrícolas en Brasil y Argentina. Las metas específicas son para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (MFC); evaluar la influencia de sustancias sintéticas en el contenido de ergosterol, probar la acción de sustancias sintéticas en el desarrollo del sistema vegetativo fúngica; evaluar el efecto quelante y evaluar *in vitro* la citotoxicidad de sustancias sintéticas.

## **2. Material y Métodos**

Se evaluó las actividades antifúngicas de las clases de sustancias sintéticas semicarbazonas (SM), tiosemicarbazonas monosustituidos, tiosemicarbazonas disustituidos

(**TS**), bases de Schiff (**BS**) y de los compuestos mesoiónicos (**MI**). Estos compuestos fueron sintetizados y caracterizados por técnicas espectroscópicas de infrarrojos, y masas de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN en el Departamento de Química - Instituto de Ciencias Exactas de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro. Campus Seropédica. RJ. Las sustancias sintéticas se solubilizaron en DMSO (Merck): Tween® 20 (Merck): RPMI 1640 (Sigma) y se diluyeron en la proporción de 1:1:8. Para evaluar la actividad antifúngica de sustancias sintéticas, cepas de hongos micotoxigénicos *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum* se obtuvieron de la Colección Micológica *Trichocomaceae* del Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro.

Los inóculos fúngicos se hidrataron y reactivada en medio de cultivo Sabouraud dextrosa agar (SDA), se incubaron en incubadora bacteriológica durante 7 días a 25 °C. La obtención de conidios fue en medio de cultivo patata dextrosa agar (PDA). Los cultivos del género *Aspergillus* se incubaron durante 7 días a 35 °C, con la excepción de *A. ochraceus*, se incubó durante 7 días a 25 °C. La especie *F. verticillioides* se incubó en bacteriológica incubadora durante 48 horas a 35 °C hasta el día séptimo, a 25 °C. La cultura del género *P. citrinum* se cultivó en medio Czapek-Dox agar, pH 5,5 a 25 °C durante 7 días.

La concentración inhibitoria mínima (MIC), se evaluaron segundo (NCCLS, 2002a), la concentración fungicida mínima (MFC) se determinaron segundo o protocolo descrito por Espinel-Ingroff (2001), con modificaciones.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las sustancias de la clase bases de Schiff con bacterias Gram-positivas y Gram-negativas obtenidas del Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud - INCQS / Fiocruz / RJ. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó de acuerdo con el documento M7-A6 CLSI (NCCLS, 2003).

La acción de tiosemicarbazonas y compuestos mesoiónicos en la disminución del contenido en ergosterol se evaluó por HPTLC en el extracto lipídico de *A. parasiticus* (sustancia **TS-3**: 125 e 250 µg/mL y **TS-6**: 31,2 e 62,5 µg/mL) y *F. verticillioides* compuestos mesoiónicos **MI-16** (3,9 e 7,8 µg/mL), **MI-2** (7,8 e 15,6 µg/mL) e **MI-11** (3,9 e 7,8 µg/mL). Se evaluó si **TS-6** tiene actividad quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  por la técnica de espectroscopia UV-visible y también se ha evaluado la acción **TS-3** e **TS-6** sobre el desarrollo del sistema vegetativo de *A. parasiticus*.

Los ensayos relacionados a la evaluación de citotoxicidad de la tiosemicarbazona **TS-6** fueron realizados en el Área Virología, del Departamento de Microbiología e Inmunología perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. En el desarrollo de las experiencias se empleó la línea celular Vero, clon 76 (línea continua de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) adquirido en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC) de la ciudad de Pergamino, provincia de Buenos Aires. La determinación de la MCNC o Máxima Concentración No Citotóxica, fue basada en la observación al microscopio óptico de efecto citopático. Para este estudio fueron incubados, diferentes concentraciones de la sustancia **TS-6**: (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300 µg/mL), empleando 4 pocillos para cada concentración. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>), la viabilidad celular fue monitoreada usando el test de captación del Rojo Neutro (RN). Las células Vero fueron sembradas a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pozo en MC, se incubaron a 37 °C durante 24 h. En la evaluación usando el test de MTT, las células Vero fueron sembradas en policubetas a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pozo en MC, se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las soluciones fueron removidas y las células fueron lavadas con 200 µl de PBS/pozo. Luego se agregaron 100 µl de MM sin suero y 25 µl de la solución MTT (1mg/ml de MTT en PBS 0,01 M pH 7,2) a cada pocillo. La placa fue incubada a 37 °C durante 4 h. Al cabo de ese tiempo, las monocapas se lavaron con 200 µl de PBS por pocillo y descartado éste se agregaron 100 µl de DMSO por pocillo, para disolver los cristales de formazán que

resultaron de la conversión del MTT. Se interpretó el resultado por lectura a 560 nm en un lector de microplacas.

### 3. Resultados y Discusión

Se evaluaron nueve sustancias de la clase semicarbazonas (**SM1-9**), donde **SM-1**, **SM-4** presentaron CMI = 500 µg/mL para *A. flavus* y *F. verticillioides* y ocho de la clase tiosemicarbazonas monosustituídas (**TS1-8**), destacándose **TS-1**, **TS-2**, **TS-3**, **TS-4** y **TS-8** frente *A. parasiticus* con inhibición del crecimiento (MIC = 500 µg/mL) y **TS-3** y **TS-8** con inhibición del crecimiento (MIC = 500 µg/mL) frente *A. flavus*. La tiosemicarbazona **TS-3** inhibió el crecimiento de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *F. verticillioides* con MIC = 500 µg/mL. Todas las muestras presentaron efecto fungistático (MFC > 500 µg/mL). La tiosemicarbazona **TS-6** inhibió el crecimiento (MIC = 125 µg/mL) de *A. nomius*, *A. parasiticus* y *A. ochraceus*, y con MIC = 250 µg/mL para *A. flavus* y MIC = 500 µg/mL para *F. verticillioides*. En la prueba de MFC, la sustancia **TS-6** presentó efecto fungicida contra *F. verticillioides* (MFC = 500 µg/mL). Se evaluaron 36 sustancias de la clase de tiosemicarbazonas disustituídas (**TS 1-36**), y 13 sustancias mostraron actividad antimicrobiana contra *A. parasiticus* (CMT-00 334) (CIM = 500 µg/mL), y la levadura *Candida albicans* (ATCC-24433) (MIC = 250 µg/mL). Para los experimentos con *C. albicans*, la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue realizado de acuerdo a la metodología descrita para los hongos levaduriformes, de conformidad con la norma M27-A2 CLSI (NCCLS, 2002b). Estos resultados fueron publicados en el artículo “Microwave-Assisted Synthesis of New N1, N4-Substituted Thiosemicarbazones” *Molecules* 2011, 16, 10668–10684; doi:10.3390/molecules161210668.

La evaluación de las sustancias de la clase bases de Schiff, indicó la sustancia **BS-7** con efecto inhibitorio para *F. verticillioides* (MIC = 125 µg/mL) y para todas las especies de *Aspergillus* spp., excepto *A. nomius* (MIC = 250 µg/mL). La especie *A. parasiticus* tubo su crecimiento inhibido por **BS-1**, **BS-2** (MIC = 500 µg/mL). En la determinación de la concentración fungicida mínima, la sustancia **BS-7** mostró efecto fungicida frente al hongo *F. verticillioides* (MFC = 500 µg/mL). Las sustancias también mostraron una actividad antimicrobiana.

También se evaluaron los compuestos mesoiónicos, (**MI 1-16**) y *F. verticillioides* fue más sensible con valores de CIM que oscilan desde 7,8 hasta 62,5 mg / mL. La serie de compuestos mesoiónicos con mayor efecto antifúngico fue la fenil-sustituída con grupos donadores de electrones (**MI-11** e **16**) seguida por la estirilo sustituido con anillo unido directamente al átomo de carbono del anillo heterocíclico (**MI-1-3** e **5**). Entre el género *Aspergillus*, las especies *A. flavus*, *A. nomius* y *A. parasiticus* también fueron sensibles a los compuestos mesoiónicos con CIMs = 250 mg / mL para **MI-5**, **13** y **14**. Cabe destacar los valores MFC= 62,5 µg / mL frente *F. verticillioides* para los compuestos **MI-1** y **11**. *P. citrinum* tenía una menor sensibilidad a los compuestos mesoiónicos.

Fue evaluada la influencia de sustancias sintéticas con actividad antifúngica en el contenido de ergosterol por HPTLC en el extracto lipídico de *A. parasiticus* y *F. verticillioides*. La concentración de 250 µg/mL de **TS-3** disminuyó en aproximadamente 33% de contenido del esteroide de *A. parasiticus*, mientras que **TS-6** redució en un 28 y 71% a las concentraciones de 62,5 y 31,2 µg/mL, respectivamente. Las sustancias sintéticas **TS-3** y **TS-6** también causaron interferencia en el desenvolvimiento vegetativo de los hongos con la pérdida de las hifas. La evaluación de la actividad quelante reveló que la sustancia **TS-6** efecto de 63,5% frente al Fe<sup>2+</sup>.

Además, en la evaluación de la citotoxicidad de las clases tiosemicarbazonas se fijó en 75 µg/mL el valor de MCNC para **TS-6** en células Vero a concentraciones de 10-300 µg/mL. Es frecuente encontrar cambios morfológicos no mortales los cuales se consideran lesiones reversibles sugiriendo que deben hacerse otros estudios de ausencia de alteraciones fisiológico-funcionales de las células tratadas con sustancias sintéticas. Por esta razón es que para dilucidar si las alteraciones morfológicas celulares visibles al microscopio óptico se condecían con alteraciones fisiológicas es que se evaluó la citotoxicidad mediante otros métodos. El valor de toxicidad determinado en función del daño morfológico visible al microscopio óptico (MCNC) es importante, pero incompleto. Por tal motivo se continuó con los estudios de citotoxicidad definiendo ahora valores al 50%. Como se indicó en el capítulo métodos, se seleccionó la técnica de captación del RN y la técnica de reducción de MTT.

En la determinación de la concentración citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>), **TS-6** ejerció una inhibición del 50% en la viabilidad celular medida por interpolación dentro de la curva de dosis-respuesta, alcanzando valores de 136 µg/mL. Para la reducción metabólica del MTT, se obtuvo CC<sub>50</sub> = 344 µg/mL. Teniendo en cuenta que las técnicas desarrolladas son catalogadas ensayos *in vitro*, y que para todas se emplearon las células Vero como soporte celular, parece apropiado realizar un análisis comparativo entre los datos logrados con ellas. Sin embargo, también debe decirse que por un método se revelan valores extremos de toxicidad (MCNC) mientras que por los otros se expresan valores tóxicos medios, lo que haría difícil su comparación. Se asume que la CC<sub>50</sub>, valorada por cualquier de los dos métodos seleccionados, representa un valor de toxicidad donde el 50% de células están vivas, mientras que la MCNC indicaría un valor de concentración de la sustancia **TS-6** en la que el 100% de las células permanecen viables y tendrían un comportamiento similar al sistema control. Los resultados sugieren actividad antifúngica de las sustancias estudiadas contra hongos contaminantes micotoxigénicos que crecen y comprometen la calidad de las materias primas almacenados.

#### **4. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en este estudio ayudarán a expandir la información sobre las actividades biológicas de sustancias orgánicas de las clases tiosemicarbazonas, semicarbazonas, bases de Schiff y compuestos mesoionicos. Todas las moléculas evaluadas ejercieron acción antifúngica efectiva frente a hongos productores de micotoxinas de importancia a nivel agroalimentario. Las sustancias presentaron una acción antifúngica aceptable inhibiendo el desarrollo de hongos productores de toxinas que influyen negativamente en la calidad de granos de cereales almacenados, ya que comprometen seriamente la productividad agropecuaria de un país con serias implicancias a nivel sanitario, en particular, si se asume que las micotoxinas, a partir de los granos contaminados, pueden ingresar en la cadena alimentaria de hombres y animales.

**Palabras-clave:** Antifúngicos, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, Micotoxicología.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ABS	Absorbncia
ABAC	Associao Banco Argentino de Células
Afs	Aflatoxinas
AFL	Aflatoxicol
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AMB	Anfotericina
ANVISA	Agncia Nacional de Vigilncia a Saúde
ATCC®	“American Type Culture Collection”
BS	Bases de Schiff
CLSI	Instituto de Padronizao Clínica e Laboratorial
DEQUIM	Departamento de Química
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ptica
DON	Desoxinivalenol
DT	DMSO-Tween 20
EDTA	cido etilenodiaminotetraacético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
EPS	Edema pulmonar em suínos
ERG	Ergosterol
FB1	Fumonisinias
FIOCRUZ	Fundao Oswaldo Cruz
G3PDH	Enzima gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
HPTLC	Cromatografia em camada fina de alta eficiência
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITC	Itraconazol
IUPAC	“International Union of Pure and Applied Chemistry”
LAN	Lanosterol
LDH	Lactatodesidrogenase
LEME	Leucoencefalomalcia em equinos
MCNC	Máxima concentrao não citotóxica
MI	Mesoinicos
2-ME	2-mercaptoetanol
MIC	Concentrao inibitória mínima
MFC	Concentrao fungicida mínima
MM	Meio de Manuteno
MEM	Meio Essencial Mínimo de Eagle
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NRRL	“Agricultural Research Service Culture Collection”
OTA	Ocratoxina
PAT	Patulina
PBS	Soro Fetal Bovino
p-INT	p-iodotetrazolium violeta

RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RPMI	“Roswall Park Memorial Institute”
SDS	Dodecilsulfato sódico
SM	Semicarbazonas
TS	Tiosemicarbazonas
UV	Ultravioleta
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VN	Vermelho Neutro
ZON	Zearalenona

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estruturas químicas das aflatoxinas.....	8
<b>Figura 2</b>	Estrutura geral das tiossemicarbazonas.....	14
<b>Figura 3</b>	Reação geral de obtenção de tiossemicarbazonas com catálise ácida.....	15
<b>Figura 4</b>	Síntese de tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído e dos cinamaldeídos, devidamente substituídos e de aldeídos heterocíclicos.....	15
<b>Figura 5</b>	Estruturas moleculares das semicarbazonas <b>SM1-9</b> avaliadas frente a fungos micotoxigênicos.....	32
<b>Figura 6</b>	Estruturas moleculares das tiossemicarbazonas <b>TS1-8</b> avaliadas frente a fungos micotoxigênicos.....	33
<b>Figura 7</b>	Fotografias das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias da classe tiossemicarbazonas monossobstituídas no crescimento das espécies do gênero <i>Aspergillus</i> .....	35
<b>Figura 8</b>	Fotografias das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias da classe tiossemicarbazonas monossobstituídas <b>TS-3</b> e <b>TS-6</b> no crescimento das espécies do gênero <i>Fusarium verticillioides</i> .....	36
<b>Figura 9</b>	Estruturas químicas das tiossemicarbazonas dissobstituídas ensaiadas frente ao fungo filamentosso <i>Aspergillus parasiticus</i> e leveduriforme <i>Candida albicans</i> .....	37
<b>Figura10</b>	Estruturas moleculares das bases de Schiff avaliadas frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	38
<b>Figura11</b>	Fotografia das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima - MFC da base de Schiff <b>BS-7</b> frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> .....	40
<b>Figura12</b>	Fotografia das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima - MFC da base de Schiff <b>BS-7</b> no crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	41
<b>Figura13</b>	Estruturas moleculares dos compostos mesoiônicos contendo o grupo estirila <b>MI1-9</b> avaliados frente aos fungos micotoxigênicos.....	43
<b>Figura14</b>	Estruturas químicas dos compostos mesoiônicos contendo o grupo fenila substituído <b>MI10-16</b> avaliados frente aos fungos micotoxigênicos.....	44
<b>Figura15</b>	Fotografia das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima - MFC de compostos mesoiônicos.....	46
<b>Figura16</b>	Efeito das substâncias da classe tiossemicarbazonas, <b>TS-3</b> e <b>TS-6</b> na produção de ergosterol por <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	48
<b>Figura17</b>	Efeito das substâncias da classe de compostos mesoiônicos, <b>MI-16</b> , <b>MI-2</b> e <b>MI-11</b> na produção de ergosterol por <i>Fusarium verticillioides</i> .....	49
<b>Figura18</b>	Efeito de <b>TS-3</b> e <b>TS-6</b> no desenvolvimento do sistema vegetativo de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	51
<b>Figura19</b>	Espectro de UV/Vis da substância <b>TS-6</b> .....	52
<b>Figura20</b>	Avaliação da citotoxicidade da tiossemicarbazona <b>TS-6</b> em células Vero.....	54
<b>Figura21</b>	Curva de sobrevivência de células Vero determinada por captação de VN após tratamento com <b>TS-6</b> .....	55
<b>Figura22</b>	Curva de sobrevivência de células Vero determinada por redução de MTT após o tratamento com <b>TS-6</b> .....	56



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Dose letal 50% das aflatoxinas em diferentes espécies animais.....	11
<b>Tabela 2</b>	Fungos micotoxigênicos utilizados no estudo.....	22
<b>Tabela 3</b>	Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de semicarbazonas frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	32
<b>Tabela 4</b>	Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de tiosemicarbazonas monossubstituídas frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	34
<b>Tabela 5</b>	Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) para as substâncias tiosemicarbazonas dissubstituídas frente a isolados de <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	37
<b>Tabela 6</b>	Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de bases de Schiff frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	39
<b>Tabela 7</b>	Concentração inibitória mínima - MIC ( $\text{mg/mL}$ ) de bases de Schiff frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	42
<b>Tabela 8</b>	Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de substâncias sintéticas da classe de compostos mesoiônicos frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Penicillium citrinum</i> .....	45
<b>Tabela 9</b>	Determinação do valor de Máxima Concentração Não Citotóxica da substância <b>TS-6</b> em células Vero.....	53
<b>Tabela10</b>	Determinação de valores de MCNC e CC50 da substância <b>TS-6</b> por captação do VN e redução do MTT em células Vero.....	57

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Produção Agrícola .....	3
2.2. Micotoxicologia.....	4
2.3. Fungos Micotoxigênicos de Interesse Agropecuário.....	5
2.4. Micotoxinas e Impactos à Saúde Humana e Animal.....	9
2.5. Uso de Substâncias Químicas no Controle de Fungos Micotoxigênicos em Alimentos .....	12
2.6. As Tiossemicarbazonas e Semicarbazonas.....	14
2.7. As Bases de Schiff.....	15
2.8. Os Compostos Mesoiónicos .....	16
2.9. Ergosterol como Possível Alvo para o Mecanismo de Ação de Substâncias Sintéticas .....	17
2.10. Influência das Substâncias Sintéticas no Desenvolvimento do Sistema Vegetativo Fúngico.....	17
2.11. O Efeito Quelante como Possível Mecanismo de Ação de Substâncias Sintéticas.....	18
2.12. Estudo de Toxicidade Celular .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1. Reagentes e Solventes .....	20
3.2. Equipamentos .....	20
3.3. Substâncias Sintéticas Avaliadas em sua Atividade Antifúngica.....	21
3.3.1. Meio de cultivo e solubilização das substâncias químicas .....	21
3.3.2. Fungos micotoxigênicos utilizados no estudo.....	21
3.3.3. Cultivo e preparação dos inóculos fúngicos.....	22
3.3.4. Preparação dos inóculos dos fungos filamentosos .....	22
3.3.5. Teste de viabilidade e quantificação dos inóculos fúngicos.....	23
3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe Semicarbazonas frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	23
3.4.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe semicarbazonas frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	23
3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe Tiossemicarbazonas Monossubstituídas frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	24
3.5.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas monossubstituídas frente a espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	24
3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe Tiossemicarbazonas Dissubstituídas frente a Fungo Filamentoso <i>Aspergillus parasiticus</i> e Fungo Leveduriforme <i>Candida albicans</i> .....	24

3.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) das Substâncias Sintéticas da Classe Bases de Schiff frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	25
3.7.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) das substâncias sintéticas da classe bases de Schiff frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	25
3.7.2. Determinação da concentração inibitória mínima (mic) de substâncias sintéticas da classe bases de Schiff frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	25
3.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe de Compostos Mesoioônicos frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Penicillium citrinum</i> .....	25
3.8.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe de compostos mesoioônicos frente <i>Fusarium verticillioides</i> .....	26
3.9. Determinação do Efeito de Substâncias da Classe Tiossemicarbazonas Monossubstituídas sobre o Conteúdo de Ergosterol de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	26
3.10. Determinação do Efeito de Substâncias da Classe dos Compostos Mesoioônicos no Conteúdo de Ergosterol de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	27
3.11. Avaliação do Efeito de Tiossemicarbazonas <b>TS-3</b> e <b>TS-6</b> no Desenvolvimento do Sistema Vegetativo de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	27
3.12. Avaliação da Atividade Quelante de Substâncias Sintéticas da Classe Tiossemicarbazonas Monossubstituídas.....	27
3.13. Avaliação da Citotoxicidade de Substância Sintética da Classe Tiossemicarbazona .....	28
3.13.1. Determinação da máxima concentração não citotóxica (MCNC).....	28
3.13.2. Determinação da concentração citotóxica 50% (CC50).....	29
3.14. Análises Estatísticas .....	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
4.1. Determinação do MIC de Substâncias da Classe Semicarbazonas frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	31
4.1.1. Determinação do MFC de substâncias da classe semicarbazonas frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	32
4.2. Determinação do MIC de Substâncias da Classe Tiossemicarbazonas Monossubstituídas frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	33
4.2.1. Determinação do MFC de substâncias da classe tiossemicarbazonas monossubstituídas frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	34
4.3. Determinação do MIC de Substâncias da Classe Tiossemicarbazonas Dissubstituídas frente a Fungo Filamentoso <i>Aspergillus parasiticus</i> e Fungo Leveduriforme <i>Candida albicans</i> .....	36
4.4. Determinação do MIC de Substâncias da Classe Bases de Schiff frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	38
4.4.1. Determinação do MFC de substâncias sintéticas da classe bases de Schiff frente a espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> .....	39
4.5. Determinação do MIC de Substâncias Sintéticas da Classe Bases de Schiff frente a Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas .....	41
4.6. Determinação do MIC de Compostos Mesoioônicos frente a Espécies do Gênero <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Penicillium citrinum</i> .....	42

4.6.1. Determinação do MFC de compostos mesoiônicos frente <i>Fusarium verticillioides</i> .....	45
4.7. Determinação dos Possíveis Mecanismos de Ação de Substâncias Sintéticas frente a Fungos Micotoxigênicos .....	46
4.7.1. Efeito das tiossemicarbazonas monossubstituídas <b>TS-3</b> e <b>TS-6</b> no conteúdo de ergosterol de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	47
4.7.2. Efeito de compostos mesoiônicos <b>MI-2</b> , <b>MI-11</b> e <b>MI-16</b> no conteúdo de ergosterol de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	48
4.8. Efeito das Tiossemicarbazonas Monossubstituídas <b>TS-3</b> e <b>TS-6</b> no Desenvolvimento do Sistema Vegetativo de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	50
4.9. Estudo da Atividade Quelante da Tiossemicarbazona <b>TS-6</b> .....	51
4.10. Determinação da Citotoxicidade da Tiossemicarbazona <b>TS-6</b> .....	53
4.10.1. Determinação da máxima concentração não citotóxica (MCNC).....	53
4.10.2. Determinação da concentração citotóxica 50% (CC50).....	54
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil produz e exporta *commodities* agrícolas, a produtividade de matérias primas e qualidade do produto final confrontam com aspectos da segurança alimentar devido aos riscos de contaminação muitas das vezes de caráter imprevisível e de difícil controle. A contaminação de alimentos por micotoxinas é uma questão complexa, suscitando inovações tecnológicas e medidas profiláticas ao desenvolvimento fúngico que pode ocorrer na fase de plantio, na colheita e durante o armazenamento dos alimentos, incluindo etapas posteriores de processamentos de produtos agrícolas até a sua comercialização. O crescimento fúngico em produtos alimentícios é cotidianamente observado quando os alimentos são manipulados e armazenados de forma inapropriada. Essa situação se agrava quando se tratam de matérias primas armazenadas para futura comercialização.

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar que teve um grande desenvolvimento, principalmente a partir da década de 1960, com ações ampliadas do aspecto forense à avaliação de risco, na utilização de estudos toxicológicos subsidiando ações regulatórias de substâncias químicas presentes nos alimentos, no meio ambiente e nos locais de trabalho. Nesse contexto podemos destacar as vertentes disciplinares que contemplam os estudos das micotoxinas, consideradas substâncias químicas naturais de alto potencial toxicológico, passíveis de serem veiculadas aos animais de criação e de produção e a população através de alimentos.

No Brasil, a Resolução 274, de 15 de outubro de 2002 do Ministério da Saúde, estabeleceu limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho (BRASIL, 2002). As aflatoxinas eram as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estavam previstos na legislação. O limite máximo permitido de 20 ppb, em alimentos destinados ao consumo humano, para a soma das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, foi estabelecido pelo Ministério da Agricultura em 1996 e pelo Ministério da Saúde, em 2002. Os níveis de micotoxinas foram regulamentados recentemente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA através da RESOLUÇÃO - RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011, que estabeleceu os limites máximos para aflatoxinas (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub> e M<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB<sub>1</sub>), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias primas (ANVISA, 2011).

A normativa da ANVISA já entrou em vigor e prazos para os produtores se adaptarem findam em janeiro de 2016 e estabelece os limites das micotoxinas em 14 categorias de alimentos, como: leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros e prazos de acordo com o risco sanitário envolvido para cada uma das micotoxinas e alimentos destinados ao consumidor infantil, que representam maior risco. O Brasil sendo um produtor e exportador de *commodities* agrícolas, matérias primas produzidas por diferentes produtores com características uniformes e não submetidas a processamento industrial, e que podem ser estocados por um determinado período de tempo, terá que investir em novas tecnologias para garantir a qualidade da produção.

As micotoxinas presentes em alimentos decorrem principalmente pelos fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento de fungos, pelas práticas agrícolas inadequadas na colheita, manipulação e armazenamento. As matérias primas utilizadas na composição de produtos destinados a alimentação de animais de produção, podem representar fonte de risco potencial de contaminação humana face às características químicas das micotoxinas. Uma vez presentes em produtos alimentícios, não são facilmente eliminadas através de processos tecnológicos, e assim se torna imprescindível a adoção de métodos eficazes no controle do

desenvolvimento de fungos nos alimentos. O Brasil tem características climáticas favoráveis ao desenvolvimento de fungos nos alimentos e terá que desenvolver ou adotar tecnologias nos processos de produção agrícola para atender as normas da ANVISA, que estabelece prazos para que os níveis de micotoxinas nos alimentos estejam de acordo com os estabelecidos pela normativa. Provavelmente vai demandar medidas preventivas enérgicas nos setores de produção agropecuária.

Os limites máximos toleráveis de micotoxinas em diversos alimentos foram estabelecidos e o monitoramento da produção deverá ocorrer de forma sistemática visando o cumprimento da legislação. Tendo em vista as características toxicológicas das micotoxinas e a dificuldade de descontaminação dos alimentos após a sua produção, além das boas práticas agrícolas adotadas, o uso criterioso e adequado de substâncias sintéticas com potenciais atividades biológicas destinadas a inibição do crescimento fúngico em alimentos e matérias primas se torna relevante.

O objetivo geral deste trabalho de tese foi avaliar as atividades antifúngicas de substâncias sintéticas das classes semicarbazonas, tiosemicarbazonas monossubstituídas, tiosemicarbazonas dissubstituídas, bases de Schiff e compostos da classe mesoiônicos frente a fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário no Brasil e na Argentina.

Dentre os objetivos específicos estão determinar a concentração inibitória mínima (MIC); determinar a concentração fungicida mínima (MFC); avaliar a influência de substâncias sintéticas no conteúdo do ergosterol; testar a ação de substâncias sintéticas no desenvolvimento do sistema vegetativo fúngico; avaliar o efeito quelante de substâncias sintéticas e avaliar *in vitro* a citotoxicidade de substâncias sintéticas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção Agrícola

Desde o final dos anos 1990, poucos países cresceram tanto no comércio internacional do agronegócio quanto o Brasil. O País é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários. É o primeiro produtor e exportador de café, açúcar, etanol e suco de laranja. Além disso, lidera o ranking das vendas externas do complexo de soja (grão, farelo e óleo), que é o principal gerador de divisas cambiais. No início de 2010, um em quatro produtos do agronegócio em circulação no mundo eram brasileiros. A projeção do Ministério da Agricultura é que, até 2030, um terço dos produtos comercializados seja do Brasil, em função da crescente demanda dos países asiáticos. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, totalizando 53,2 milhões de toneladas na safra 2009/2010. A primeira idéia é o cultivo do grão para atender ao consumo na mesa dos brasileiros, mas essa é a parte menor da produção. O principal destino da safra são as indústrias de rações para animais. Cultivado em diferentes sistemas produtivos, o milho é plantado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MAPA, 2003). O grão é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais. O estudo das projeções de produção do cereal, realizado pela assessoria de gestão estratégica do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), indica aumento de 19,11 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020. Em 2019/2020, a produção deverá ficar em 70,12 milhões de toneladas e o consumo em 56,20 milhões de toneladas. Esses resultados indicam que o Brasil deverá fazer ajustes no seu quadro de suprimentos para garantir o abastecimento do mercado interno e obter excedente para exportação, estimado em 12,6 milhões de toneladas em 2019/2020. Número que poderá chegar a 19,2 milhões de toneladas. O Brasil está entre os países que terão aumento significativo das exportações de milho, ao lado da Argentina (MAPA, 2003).

Em relação ao mercado interno, com terras férteis, extensas e clima propício para a agricultura, o Brasil é um dos principais produtores e fornecedores mundiais de alimentos. Os programas de sanidade vegetal do Ministério da Agricultura garantem alimentos seguros e mantêm o País como peça chave do comércio globalizado. A agricultura brasileira enfrenta desafios, como o atendimento à crescente demanda por alimentos e produtos agropecuários, em quantidade e qualidade. O Brasil se destaca na produção de culturas, como soja, milho, arroz, feijão e cana-de-açúcar. O arroz e o feijão são destinados, principalmente, ao consumo interno. Outra cultura que se destaca no mercado interno é o algodão, que cresce a cada ano e já supera, em 60%, a produção dos Estados Unidos da América. O Brasil alcançou o terceiro lugar na exportação do produto. No entanto, a soja, representa hoje o maior peso na balança comercial brasileira (MAPA, 2003).

Em climas tropicais e subtropicais, como o do Brasil, o desenvolvimento fúngico é favorecido por fatores como condições de umidade e temperatura. Os fungos crescem e se proliferam bem em cereais, principalmente, no milho, no amendoim, trigo, cevada, sorgo e arroz, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento. O crescimento fúngico e produção de micotoxinas em cereais podem ocorrer nas diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou no armazenamento dos grãos (DILKIN, 2002; GALVANO et al., 2005; AMARAL et al., 2006). Lesões provocadas por insetos e escarificação na cutícula dos grãos no momento da colheita, facilitam a penetração do fungo. Os principais substratos para a produção dessas toxinas são os cereais, cujas perdas, segundo estimativa da FAO situam-se ao

redor de 25% dos grãos produzidos. Existem muitos tipos de micotoxinas, algumas são consideradas importantes do ponto de vista de saúde pública: aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>), ocratoxina A, patulina, fumonisina, deoxinivalenol e zearalenona (FAO, 1995; GIMENO, 2000).

A agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) encontrou uma micotoxina que afeta o crescimento humano no trigo brasileiro, a portaria divulga constatação de níveis de micotoxinas no trigo brasileiro. *Giberela* é um teleomorfo do gênero *Fusarium* e, no caso do trigo, o deoxinivalenol é um subproduto com efeito tóxico, que se acumula no fígado e se liga a enzimas precursoras de hormônios do crescimento de seres humanos e animais. Com ele, tanto o crescimento de massa corporal, como de altura podem ser prejudicados. Portanto, a partir de fevereiro, o Brasil deve se adequar à legislação já vigente em outros países para evitar níveis nocivos dessa micotoxina no cereal. Segundo pesquisas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), os produtores podem evitar essa contaminação no momento da floração até o período de enchimento dos grãos. Isso porque, quando há umidade ao redor da espiga e a temperatura é favorável, o fungo germina e penetra nos tecidos da planta (NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2011).

Para garantir a qualidade e segurança dos alimentos a Coordenação-Geral de Qualidade Vegetal (CGQV) classifica e certifica produtos vegetais, fiscalizando estabelecimentos que preparam, embalam e comercializam esses produtos destinados diretamente ao consumo humano (MAPA, 2003). Apesar do controle e medidas adotadas, nos confrontamos com diversas pesquisas alertando e comprovando a presença de micotoxinas nos diversos alimentos supracitados destinados ao consumo humano, também utilizados na produção animal, representando outra via de contaminação para a população.

## 2.2. Micotoxicologia

A Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes da interação das substâncias químicas com os organismos vivos, englobando o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos nocivos de substâncias químicas e de agentes físicos; estudo das alterações de resposta (lesões bioquímicas, fisiopatológicas e psíquicas) em um ser vivo ou em seus descendentes e como a ciência que define os limites de segurança dos agentes químicos e físicos (SPINOSA et al., 2008). A toxicologia de alimentos é uma área de aplicação da toxicologia que estabelece as condições em que os alimentos podem ser ingeridos sem causar danos à saúde. Sua importância está em assegurar a qualidade dos alimentos, pela detecção de contaminantes como as micotoxinas. A toxicologia ambiental se ocupa do estudo das substâncias químicas presentes em matrizes ambientais como solo, água, ar e os efeitos adversos que podem ser ocasionados ao meio ambiente e aos organismos biológicos em interação com estas substâncias e assim avalia o impacto sobre a saúde pública (KLASSEN et al., 1996; SPINOSA et al., 2008; OGA et al., 2008).

A toxicologia veterinária visando não somente animais de companhia e também, animais de produção, se encarrega na prevenção e tratamento de intoxicações dos animais, tendo como objetivo a saúde e bem-estar animal acarretando em benefícios e segurança na alimentação do ser humano. As questões ligadas ao meio ambiente e aos ecossistemas como preservação do ar, do solo, da água e dos animais em seu habitat natural também estão contidas na área de atuação do médico veterinário.

Os fungos micotoxigênicos são conhecidos desde os tempos bíblicos e naquela época, surtos de micotoxicoses ocorriam periodicamente em determinadas regiões. Porém, na década de 1950, enfermidades como a aleucia tóxica alimentar (ATA), na Ucrânia e surtos de eczema facial de ovinos, descritos na Nova Zelândia foram enfermidades associadas à presença de fungos no alimento consumido. A ocratoxina (OTA), produzida por fungos do gênero



*Aspergillus* e *Penicillium* em cereais mofados e vários produtos alimentares, foi envolvida na etiologia de uma doença humana fatal conhecida como Nefropatia Endêmica dos Balcãs (GALVANO et al., 2005, KHOURY; ATOUI, 2010).

O estudo das micotoxinas teve o seu início na década de 1960, época que predominava a guerra fria, por ocasião de um evento ocorrido na Inglaterra que despertou grande interesse internacional, mobilizando vários pesquisadores. No episódio, ocorreu a morte de milhares de aves sendo denominado “doença X dos perus” (Turkey X Disease) por ter causa desconhecida. Após a realização de análises microbiológicas e químicas, verificou-se a presença do *Aspergillus flavus* no amendoim importado do Brasil e utilizado na alimentação das aves. Foi possível então a comprovação que o fungo era o responsável pela produção de uma micotoxina posteriormente denominada aflatoxina, responsável pelo alto índice de mortalidade das aves. A partir deste episódio, outras espécies fúngicas e suas micotoxinas foram descritas e na década de 1980, grandes avanços ocorreram nas pesquisas científicas na identificação desses agentes tóxicos (BENNETT; KLICH, 2003; SPINOSA et al., 2008).

O Brasil foi pioneiro na América Latina a trabalhar com micotoxinas, iniciando as atividades nesta área em 1967. Em 1980, foi organizado então o *I Encontro Nacional: Micotoxinas: Problemas e Soluções*. A partir de então foi implantado o Programa Nacional de Micotoxinas (aflatoxinas em amendoim e milho) e os Encontros Nacionais, que acontecem a cada 02 anos. Em 1986 foi realizado no Chile o Encuentro Nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis em el Sector Agropecuario e em 1989 El Instituto de Investigaciones Agropecuarias, consciente da necessidade de atualizar os avanços dos estudos realizados nos país desde o encontro de 1986, organizaram a Jornada Nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis. Em 1988 a Argentina organizou o Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre Micotoxinas, quando reuniu participantes de vários países com o objetivo de implantar a Rede Latino Americana de Micotoxinas (SABINO, 2013).

O termo micotoxina é derivado de *myco*, que significa fungo, e “toxina” que significa toxicante de origem biológica. Um toxicante ou agente tóxico é qualquer substância química que ao interagir com o organismo vivo provoca algum efeito nocivo. A toxina, substância tóxica produzida por seres vivos pode receber o nome genérico do ser vivo que a produz, e toxinologia, a área da toxicologia destinada ao estudo das toxinas (SPINOSA et al., 2008).

A micotoxicologia pode ser definida como o estudo de subprodutos metabólicos resultantes do crescimento de fungos em alimentos, de tal forma que quando outros organismos são expostos a quantidades relativamente pequenas desses subprodutos, resultam em alterações na estrutura ou rompimento nas funções de células, tecidos, órgãos ou sistemas orgânicos (WYATT, 2005).

### **2.3. Fungos Micotoxigênicos**

Os fungos, também chamados de bolores ou mofos podem, pela sua ação direta, podem ocasionar vários problemas aos produtos armazenados. Desenvolvendo-se sobre sementes, podem causar perda do poder germinativo da planta; afetar a qualidade por descoloração do arroz e da manteiga de cacau; produzir aromas desagradáveis, como no caso do café, além de alterar as condições físicas por desidratação dos produtos onde crescem. Podem ocasionar também a diminuição do valor nutritivo das proteínas na maioria dos produtos, como por exemplo, dos óleos e gorduras, do amendoim e da soja etc., além de prejudicar seriamente o aspecto externo dos alimentos. Desta forma, os fungos podem produzir toxinas no amendoim, arroz e muitos outros produtos, além de abrir caminho para outros agentes de deterioração. Espécies fúngicas produtoras de micotoxinas podem ser classificadas em três grupos, conforme o habitat e os substratos oferecidos para o seu desenvolvimento, da seguinte forma: a) fungos de campo: são aqueles que geralmente

contaminam o alimento antes mesmo das colheitas; b) fungos de armazenamento: aqueles que se desenvolvem durante o armazenamento do alimento e são os principais responsáveis pela deterioração dos cereais, matérias primas e das rações, e c) fungos de decomposição: são os que tornam os alimentos impróprios para o consumo (MÍDIO; MARTINS, 2000; GIMENO, 2005; GALVANO et al., 2005).

O avanço significativo no sistema de produção animal intensivo é ao mesmo tempo a causa e a consequência do aumento na produção de grãos, destacando-se a avicultura e a suinocultura em particular, pois requerem uma grande quantidade de grãos para atender as necessidades nutricionais dos animais. Por esta razão, a produção aumenta a cada ano e após a colheita, parte desta fica estocada até a sua utilização. As condições de estocagem são determinadas por uma interação complexa entre os grãos, o macro e o micro-ambiente e uma variedade de organismos incluindo microrganismos, insetos, ácaros, roedores e pássaros. Em geral, a prevenção do crescimento fúngico na pré-colheita fica comprometida por fatores inalcançáveis pelo homem como o clima, uma vez que ambos, chuva excessiva ou insuficiente durante a fase crítica de colheita pode levar ao desenvolvimento e contaminação fúngica, deterioração dos grãos e produção de micotoxinas. No entanto, a manipulação dos grãos na pós-colheita apresenta muito mais oportunidades para se controlar o crescimento fúngico e suas consequências (SANTIN, 2005).

A produção de micotoxinas por fungos filamentosos é sazonal e diferenciada geograficamente, o que dificulta o diagnóstico das micotoxicoses em animais de criação, principalmente sob a forma subaguda ou crônica. As condições que afetam a produção de toxinas pelo fungo incluem o gênero fúngico, susceptibilidade genética da planta hospedeira, temperatura ambiental, umidade relativa do ar e do substrato, além de população microbiológica (SPINOSA et al., 2008). Existem várias espécies fúngicas micotoxigênicas, que podem produzir diferentes tipos de micotoxinas, sendo que algumas espécies são capazes de produzir mais de um tipo de toxina, que podem ser encontradas simultaneamente em um único produto. Dentre os principais fungos produtores, destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (GIMENO, 2000; FONSECA, 2000) e o gênero *Penicillium* (SANTIN, 2005), considerados os de maior importância para alimentos e ração, por serem os mais encontrados e os maiores produtores de micotoxinas.

São vários os fatores que promovem o desenvolvimento de fungos em alimentos, incluindo as práticas agrícolas inadequadas e condições climáticas. O metabolismo fúngico origina substâncias altamente tóxicas que podem ocasionar grandes perdas econômicas pela deterioração de produtos agrícolas, diminuição na produção devido aos efeitos toxicológicos ocasionados aos animais de criação, e processos patológicos diversos que podem acometer o consumidor que inadvertidamente se alimenta de produtos contaminados (DILKIN, 2002). As aflatoxinas podem ser encontradas como contaminantes naturais nos cereais (essencialmente no milho, trigo e arroz) e nos subprodutos de cereais, bagaços de oleaginosas (algodão, amendoim, coco, girassol e outros), mandioca, assim como numa série de alimentos para humanos entre os quais se destacam os cereais, produtos de cereais, frutos secos, produtos de salsicharia, especiarias, vinhos, leguminosas, frutas, leite e derivados (GIMENO, 2000).

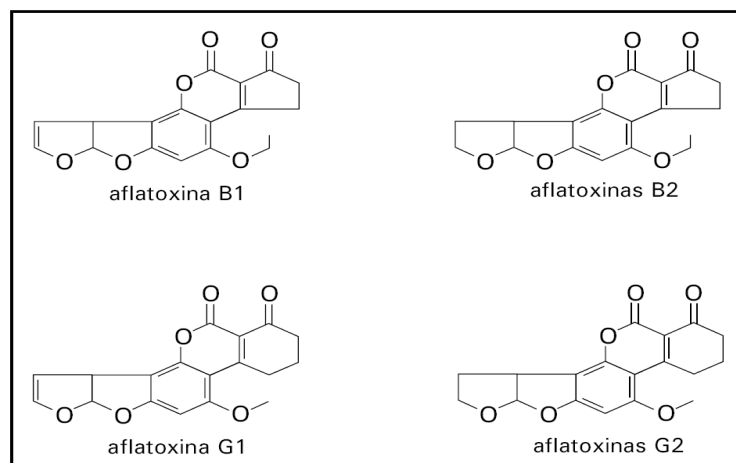
De maneira geral, os grãos possuem elementos fúngicos (conídios) em sua superfície, os quais permanecerão em estado de latência, se as condições ambientais (temperatura, umidade relativa e atividade de água) permanecerem impróprias ao seu desenvolvimento. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, os conídios germinam, formam hifas e, ao desenvolverem seu micélio sobre a superfície dos grãos, reduzem o seu valor nutritivo, porque utilizam parte dos nutrientes para o seu próprio crescimento e se o fungo for toxígeno, diversas micotoxinas podem surgir nos produtos agrícolas (CRUZ, 2010). As micotoxinas são compostos policetônicos resultantes de reações de condensação que se produzem quando, sob determinadas condições físicas, químicas e biológicas, se interrompe a redução dos grupos

cetônicos na biossíntese dos ácidos graxos realizada pelos bolores. Estes ácidos graxos são metabólitos primários utilizados pelos bolores como fonte de energia. As micotoxinas formam-se habitualmente no final da fase exponencial ou no início da fase estacionária do crescimento dos bolores toxigênicos (GIMENO e MARTINS, 2003).

O gênero *Aspergillus* é um grupo taxonômico que engloba organismos cujas características patológica, agrícola, industrial, farmacêutica, científica e cultural são de muita importância. São agentes essenciais nos processos de biodegradação, têm sido isolados de materiais de mais variadas origens, óleo de aviação, múmias egípcias, fusíveis elétricos, produtos plásticos. É um grupo amplo de fungos cosmopolitas que possuem um papel importante no ecossistema, pelo envolvimento na decomposição de uma grande variedade de substratos orgânicos naturais. Espécies de *Aspergillus* são generalistas e podem crescer e reproduzir em diferentes fontes de carbono devido a expressiva flexibilidade nutricional. Diversas enzimas e ácidos orgânicos são utilizados na nutrição, processo complementado pela capacidade metabólica em secretar numerosos metabólitos secundários de baixo peso molecular, provavelmente de importância no equilíbrio ecológico. Esses fungos podem ser encontrados em quase todos os lugares do planeta, degradando substratos naturais e substratos feitos pelo homem (BAKER; BENNETT, 2008).

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem ao Filo Ascomycotina, se caracteriza por apresentar um conidióforo com o ápice dilatado (vesícula) que produz células conidiogênicas (fiálides) das quais se originam os conídios (KLICH, 2002). Os conídios apresentam-se em diferentes cores, dependendo da espécie e são produzidos em longas cadeias do final das fiálides (MIDIO, 2000). Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são produtoras de micotoxinas, em especial as aflatoxinas. Essas toxinas são produzidas principalmente por *A. flavus* Link, *Aspergillus parasiticus* Speare, *Aspergillus nomius* Kurtzman e *Aspergillus pseudotamarii*. As aflatoxinas são compostos naturais extremamente tóxicos e carcinogênicos (YU et al., 2005). Entre estes fungos micotoxigênicos, as cepas de *A. flavus* e *A. pseudotamarii* são produtores apenas da série B. As aflatoxinas são biossinteticamente consideradas bisfurano cumarinas, derivadas de decacetídeos, compostos heterocíclicos distinguíveis cromatograficamente em série B, com fluorescência azul (Blue), quando submetidas à radiação ultravioleta de comprimento de onda longo. As aflatoxinas geralmente são produzidas entre 13 e 42 °C, embora entre 25 a 30 °C seja considerada temperatura ótima para a sua síntese (YU et al., 2005; SPINOSA et al., 2008). *Aspergillus flavus* é considerada a principal espécie produtora de aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, sendo a aflatoxina B<sub>1</sub> considerada carcinogênica para humanos e classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) no grupo toxicológico I, indicando que há evidência suficiente de carcinogenicidade em humanos (IARC, 1993).

A produção das aflatoxinas é favorecida por vários fatores, especialmente umidade relativa do ar (superior a 80%), temperatura ambiental e condições de integridade e teor de umidade do substrato. A ingestão de produtos contaminados produz um quadro de intoxicação conhecido como aflatoxicose (MANNING, 2005; SPINOSA et al., 2008).



**Figura 1.** Estruturas químicas das aflatoxinas (SPINOSA et al., 2008).

*Aspergillus nomius* é uma espécie produtora de aflatoxinas do grupo B ( $B_1$  e  $B_2$ ) e do grupo G ( $G_1$ ,  $G_2$ ), conforme Figura 1 (SPINOSA et al., 2008). Compostos heterocíclicos distinguíveis cromatograficamente em série B, com fluorescência azul (*Blue*), e em série G, com fluorescência verde (*Green*), quando submetidas à radiação ultravioleta de comprimento de onda longo (YU et al., 2005; FREIRE et al., 2007; SPINOSA et al., 2008). *Aspergillus nomius* é uma espécie similar *A. flavus* isolado de *commodities* agrícolas. Em estudos recentes realizados em amostras de solo da Tailândia foi demonstrado que este fungo é mais comum do que se pensa e pode ser a espécie de *Aspergillus* produtora de aflatoxina predominante em certas condições geográficas locais, podendo ser considerada como o agente etiológico potencial de eventos de contaminação devido à habilidade em produzir grandes quantidades dessa toxina (EHRLICH et al., 2007). *Aspergillus parasiticus* é uma espécie fúngica produtora de aflatoxinas  $B_1$  e  $B_2$ , assim como *A. flavus*, produzindo também aflatoxinas  $G_1$ ,  $G_2$  e se desenvolve naturalmente em produtos alimentícios, principalmente em alimentos tipo grãos (FREIRE et al., 2007; SPINOSA et al., 2008).

*Aspergillus ochraceus* é uma espécie fúngica produtora de ocratoxina A (OTA), uma das primeiras micotoxinas a ser descrita após as aflatoxinas, isolada e identificada a partir de uma cultura deste fungo, por Van der Merwe em 1965. Toxina encontrada, especialmente em aveia, cevada, centeio, trigo, grãos de café e em outros produtos para consumo humano e animal (BENNETT; KLICH, 2003; GALVANO et al., 2005; FREIRE et al., 2007). A IARC classifica a OTA como uma substância do Grupo 2B, ou seja, um agente possivelmente cancerígeno para o homem (IARC, 2005).

O gênero *Fusarium* também é produtor de diferentes micotoxinas, incluindo as fumonisinas que foram descritas e caracterizadas em 1988 (BENNETT; KLICH, 2003). A principal espécie produtora de fumonisina é *F. verticillioides*, anteriormente classificado como *F. moniliforme*. Outras duas espécies, *F. proliferatum* e *F. nygamai* também produzem esta micotoxina. Este fungo é encontrado principalmente no milho produzindo esses metabólitos secundários. A maioria das espécies do gênero *Fusarium* são fungos do solo e tem uma distribuição mundial. Alguns são patógenos de plantas causando podridão de raiz e tronco, murcha vascular ou podridão. Outras espécies do gênero causam a podridão de armazenamento e são produtores de micotoxinas importantes (MYCOLOGY ON LINE, 2012). Embora já tenham sido identificados cerca de 20 tipos de fumonisinas, somente três, FB1, FB2 e FB3, foram até o momento, associadas a algum processo patológico (CRUZ, 2010). Temperaturas em torno de 25 °C são consideradas ótimas para o crescimento desse fungo, embora ele possa crescer em temperaturas que variam entre 5 e 40 °C. A temperatura

ótima para a produção de fumonisinas encontra-se entre 20 e 25 °C (SANTIN, 2005; SPINOSA, et al., 2008).

O gênero *Penicillium* também produz uma grande variedade de micotoxinas, incluindo a citrinina. Esta micotoxina é um subproduto metabólico de origem cumarínica, oriundo do crescimento de várias espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Esta e outras micotoxinas são produzidas durante o desenvolvimento fúngico em grãos, alimentos processados e produtos alimentícios, oriundos ou não do processamento e da manipulação em citricultura. O consumo de baixa concentração, por animais sensíveis as micotoxinas, pode conduzir à morte dentro de poucas horas. O mais comum é a ocorrência de intoxicações que variam de agudas a crônicas, afetando, principalmente os animais criados sob-regime de confinamento, tais como aves e suínos. A citrinina é imunotóxica para animais jovens, comprometendo tanto a resposta humoral adaptativa como a resposta natural, quando assimilada em baixas concentrações, mesmo após uma única exposição. Assim, os animais em idade de vacinação representam um grupo de risco para o qual se deve dar mais atenção, especialmente porque essa micotoxina pode comprometer sua capacidade de resposta às diferentes vacinas, sem sintomas clínicos indicativos de imunossupressão ou intoxicação (GALVANO et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; CRUZ, 2010).

#### **2.4. Micotoxinas e Impactos a Saúde Humana e Animal**

Segundo o sistema adotado pela IARC (1993), as micotoxinas são classificadas como carcinogênicas para humanos (Grupo I), possíveis carcinogênicas para humanos (Grupo II), não classificáveis quanto ao potencial carcinogênico para humanos (Grupo III).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana diretamente através do consumo de cereais, sementes comestíveis, condimentos, frutas, bebidas entre outros (SUAAD; NASSER, 2011), e indiretamente através de produtos alimentícios obtidos de animais que receberam alimentos ou rações (LOPES et al., 2005; VIEIRA et al., 2006), contaminados com micotoxinas, podendo ocorrer resíduos em leite, carne, ovos e outros derivados. (SPINOSA et al., 2008). O impacto das aflatoxinas na alimentação humana é um tema de interesse mundial. Humanos que ingerem alimentos contaminados com aflatoxina eliminam uma quantidade variável de metabólitos nos fluidos corporais ou estes são acumulados nos tecidos. A ocorrência de aflatoxinas em tecidos humanos ou fluidos é mais um problema de países tropicais e subtropicais que em países frios ou de clima temperado (GALVANO et al., 2005). Segundo o Art. 4º da Resolução da ANVISA, os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido (ANVISA, 2011).

Epidemiologistas focam em pesquisas na etiologia das doenças e lembram que a exposição às micotoxinas é quase inevitável devido ao consumo de cereais pela população e como resultado, essas substâncias têm a capacidade de afetar negativamente a saúde humana e modifica a susceptibilidade a doenças (TURNER et al., 2012). Estima-se que 35% dos casos de neoplasia em humanos estejam diretamente relacionados à dieta e a presença de aflatoxinas em alimentos, sendo esta considerada como um dos principais fatores relacionados à indução de neoplasia hepática, principalmente em países tropicais (FERREIRA et al., 2006).

Contaminantes e resíduos de substâncias químicas podem atingir os organismos dos animais através da alimentação, por meio do manejo, da água e do solo. Assim, podem estar presentes nos tecidos e produtos derivados desses animais destinados ao consumo humano. Os contaminantes são substâncias químicas que não adicionadas intencionalmente aos alimentos, podem estar presentes como resultado dos processos de produção e durante o cultivo dos

grãos utilizados para fabricação de rações destinadas à criação dos animais e os resíduos são as substâncias aplicadas intencionalmente com intuito profilático ou terapêutico (SPINOSA et al., 2008; LOPES et al., 2009).

A toxidez é a capacidade inerente da substância química de provocar intoxicação, a propriedade que a substância química possui, em maior ou menor grau, de provocar efeitos nocivos. Uma medida relativa do risco da exposição a uma substância, dependendo, portanto, das condições de exposição, tais como a dose ou concentração, a duração e frequência de exposição, a via de exposição e propriedades físico-químicas da substância como lipossolubilidade, estabilidade, constante de dissociação, pressão de vapor, tamanho da molécula, etc. além da suscetibilidade individual do organismo exposto. A toxidez de uma substância química pode ser avaliada através da Dose Letal 50%, dose que causa a morte de 50% da população exposta ao agente, e quanto menor o valor da  $DL_{50}$ , maior a toxidez da substância (OGA et al., 2008; SPINOSA et al., 2008). Na Tabela 1 se observa a toxidez em  $DL_{50}$  de aflatoxinas estabelecidas em algumas espécies animais.

Do ponto de vista toxicológico para o ser humano que pode eventualmente ingerir produtos contaminados, é necessário o controle rigoroso das concentrações destas substâncias nos alimentos e com base na avaliação toxicológica das substâncias, caracterizando o risco que podem representar para a saúde humana e animal.

Os peixes estão presentes na dieta alimentar do homem, possuindo um alto valor nutricional e com uma grande diversidade de espécies, pertencendo a um grupo de suma importância econômica (FAO, 2006; 2008). Devido à estabilidade química da molécula da aflatoxina, esta pode ficar presente no músculo e tecidos de peixes que são alimentados com ração contaminada por fungos micotoxigênicos produtores desta toxina e ser uma fonte potencial de exposição humana pelo consumo de pescado e produtos derivados de pescado contaminados pela aflatoxina. A presença de aflatoxinas nos ingredientes que compõem as rações deve ser monitorada uma vez que tem sido detectada de forma a ser um agente interferente no sistema de produção e de possível transmissibilidade ao homem que faz uso do peixe como parte de sua dieta (LOPES et al., 2005; FARABI et al., 2006; LOPES et al., 2009).

Considerando-se o risco que ingredientes utilizados nas rações animais possam apresentar pelos níveis elevados de toxinas, bem como pela carência de estudos sobre os efeitos das aflatoxinas nas diversas espécies de peixes, torna-se necessária uma avaliação em espécies de valor econômico utilizadas na piscicultura destinadas à alimentação humana (LOPES et al., 2005). O acúmulo de micotoxinas em tecidos de peixes, devido ao consumo de alimento contaminado, pode causar redução do crescimento e do hematócrito e a repressão do sistema imune do peixe (VIEIRA et al., 2006).

O Brasil produz cerca 70 mil toneladas de tilápias. Esse negócio já movimentava 105 milhões de dólares por ano no país. Os Estados Unidos são os maiores compradores do peixe, adquirindo 135 mil toneladas por ano no mercado mundial. A China é o maior produtor do planeta e responde por 45% da oferta global (EPAMIG, 2008).

Matérias primas e rações avícolas procedentes do estado do Rio de Janeiro apresentaram níveis altos de contagem fúngica nas análises realizadas, sendo o gênero *Aspergillus* spp. o mais frequente e *A. flavus* a espécie prevalente (ROSA et al., 2006).

**Tabela 1.** Dose Letal 50% (DL50) das aflatoxinas, em diferentes espécies animais.

Afs	Espécie animal	Sexo	Idade / Peso	Via de administração	Toxicidade DL50 (mg/kg)
AFB1	Pato	M	1 dia	Oral	0,37
AFB1	Pato	M/F	1 dia	Oral	0,33-0,36
AFB1	Galinhas	-	-	Oral	6,5-16,5
AFB1	Rato	M/F	1 dia	Oral	1,0
AFB1	Rato	M	21 dias	Oral	5,5
AFB1	Rato	F	21 dias	Oral	7,4
AFB1	Rato	M	100 g	Oral	6,0
AFB1	Rato	F	150 g	Oral	17,9
AFB1	Rato fisher	M/F	0-4 dias	IP	1,1-1,36
AFB1	Rato fisher	M/F	70 dias	IP	0,75-1,3
AFB1	Rato fisher	M/F	12 dias	IP	12-15
AFB1	Rato fisher	M/F	21 dias	IP	8,0
AFB1	Rato fisher	M/F	42 dias	IP	4,0-5,0
AFB1	Camundongo (CFW Swiss)	M	30 dias	IP	>150,0
AFB1	Camundongo (CFW Swiss)	M	58 dias	IP	40,0
AFB1	Camundongo (CFW Swiss)	M	100 dias	IP	12,0
AFB1	Hamster	M	30 dias	Oral	10,2
AFB1	Cão	M/F	Adulto*	IP	1,0
AFB1	Cão	M/F	Adulto*	Oral	0,5-1,0
AFB1	Gato	M/F	Adulto*	Oral	0,55
AFB1	Truta arco-íris	M/F	9 meses	IP	0,81
AFB1	Coelho	M/F	3 meses	Oral ou IP	0,30
AFB1	Suínos	M	Lactante*	Oral	0,62
AFB1	Porquinho da Índia	M	250 g	IP	1,4
AFB1	Ovino	M	2 a	Oral	2,0
AFB1	Macaco	M	2 anos	Oral	2,2
AFB1	Macaco	F	38-44 meses	Oral	7,8
AFG1	Pato	M/F	1 dia	Oral	0,79
AFG2	Pato	M/F	1 dia	Oral	172,5
AFM1	Pato	M/F	1 dia	Oral	16,6

IP = intraperitoneal, M = machos, F = Fêmeas (SPINOSA et al., 2008)

A análise do risco consiste em processo sistemático de avaliação do risco, para melhor caracterizar o risco. O risco é a probabilidade do aparecimento de um efeito adverso e a magnitude desse efeito. Na avaliação do risco alimentar, o risco é a probabilidade de ocorrer um efeito adverso na população consumidora exposta aos alimentos. Na identificação do perigo, são identificados os agentes que podem estar presentes em um determinado alimento ou grupo de alimentos (SPINOSA et al., 2008). Os agentes biológicos, químicos ou físicos que podem causar efeitos adversos à saúde da população exposta, devem ser criteriosamente identificados e caracterizados segundo seu potencial toxicológico (GOODMAN; GILMAN, 1996). A identificação específica do perigo constitui um passo fundamental na avaliação de risco, fazendo parte do processo de estimativa de risco. O Regulamento Técnico da ANVISA

trata dos princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos, incluída as micotoxinas, em alimentos que constituam riscos à saúde humana (ANVISA, 2011).

A avaliação da exposição busca estabelecer o grau de exposição da população aos agentes tóxicos, sendo definida como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos ou físicos através de alimentos. Para estimar a exposição humana às substâncias químicas presentes nos alimentos, são necessários três dados fundamentais como a concentração da substância no alimento (mg/kg), o consumo do alimento (kg) e o peso corpóreo (kg) individual ou da população em estudo. A avaliação da exposição indica a quantidade do perigo que a população ou segmentos dessa população pode estar exposta, estimada através dos níveis de perigo nas matérias primas, nos ingredientes dos alimentos incorporados ao alimento primário e no entorno alimentar geral. Esses dados se combinam com as pautas de consumo de alimentos da população destinatária de consumidores para avaliar a exposição ao perigo durante um determinado período de tempo nos alimentos realmente consumidos. São consideradas também as mudanças ocorridas nos níveis ao longo de toda a cadeia de produção de alimentos. Para estabelecer limites máximos desses contaminantes em alimentos, a ANVISA se apóia na ingestão diária aceitável - IDA, esta estima quanto uma pessoa pode ingerir de uma substância por dia e durante toda a vida, sem colocar sua saúde em risco (SPINOSA et al., 2008; ANVISA, 2011).

As principais fontes de informações sobre a toxicidade da substância química e do seu potencial carcinogênico são obtidas em experimentos com animais de laboratório, na caracterização da dose-resposta de substâncias potencialmente tóxicas presentes nos alimentos. A AFB<sub>1</sub> teve a sua Dose Letal 50% (DL50) determinada em 0,81 mg/kg para truta arco-íris pela via de inoculação intraperitoneal em animais com idade de 9 meses (SPINOSA et al., 2008).

Os altos níveis de resíduos de aflatoxina B<sub>1</sub> têm sido atribuídos ao alto teor de gordura na musculatura de determinadas espécies de peixes o que pode ser atribuído às diferentes rotas do metabolismo da AFB<sub>1</sub> nessas espécies. Estudos experimentais demonstraram o acúmulo de AFB<sub>1</sub> no nível de  $4.25 \pm 0.85$  ppb no músculo comestível de peixes marítimos alimentados com AFB<sub>1</sub>, sugerindo um risco significativo para a transmissão de AFB<sub>1</sub> ao consumidor humano, tendo em vista que o limite estabelecido pela FDA foi de 5 ppb para aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos humanos (EL-SAYED, 2009).

## 2.5. Uso de Substâncias Químicas no Controle de Fungos Micotoxigênicos em Alimentos

A avaliação da eficácia de substâncias químicas no controle da germinação, crescimento e produção de micotoxinas por fungos presentes em alimentos tem sido realizada. A eficiência do *orto*-fenilfenolato de sódio foi testada em armazém por meio de pulverização de solução contendo esse princípio ativo no amendoim. Os resultados mostraram que todas as concentrações das soluções testadas não controlaram a produção de aflatoxina quando aplicadas ao amendoim em casca e úmido (FONSECA, 1996).

O ácido propiônico, também tem sido utilizado e seu efeito nas concentrações de 3,0 g/kg (AP1) e 5,0 g/kg (AP2), foram avaliados em laboratório para verificar sua eficiência sobre o crescimento fúngico e produção de aflatoxinas, quando aplicado sobre amendoim em casca úmido. A substância foi considerada promissora para ser utilizada na concentração de 5,0 g/kg em condições de campo para controlar o crescimento fúngico em amendoim em casca (CALORI-DOMINGUES et al., 1996).

Na Argentina, as espécies *Fusarium* predominantes em grãos de milho são *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, e *Fusarium subglutinans*. Essas espécies têm sido isoladas de grãos de milho assintomáticos, no campo e no armazenamento pós-colheita. Os



antioxidantes butilato de hidróxi anisoíla (BHA) e propil parabeno (PP) foram avaliados no controle do crescimento fúngico para as espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. O efeito de BHA e PP no controle do crescimento micelial de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* teve mais eficácia na concentração de 500 µg g<sup>-1</sup>. Além disso, PP foi mais efetivo que BHA, inibindo quase completamente ambas as espécies na concentração de 500 µg g<sup>-1</sup>. Entretanto na concentração de 100-200 µg g<sup>-1</sup> os antioxidantes foram relativamente ineficazes contra ambas as espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (TORRES et al., 2003).

A contaminação das colheitas pode ser prevenida ou diminuída usando ácidos como o benzóico, ascórbico, propiônico, fórmico e acético. Pequenas concentrações destes fungicidas nos alimentos devem ser efetivas a um pH situado um pouco acima do seu pK (constante de dissociação de um ácido). Em um maior pH, grande parte deste ácido se encontrará sem dissociar, não apresentando nenhum efeito sobre o crescimento fúngico. Por outro lado, a quantidade de ácido adicionado ao produto armazenado deve estar relacionada com a quantidade de água do mesmo, e deve estar distribuído de uma maneira uniforme através de todo volume a tratar. No entanto, o emprego destes ácidos em subdoses pode levar ao risco de que se produza um incremento na capacidade toxigênica de determinados fungos, representando assim um risco para cereal (MALLMANN et al., 2006).

Os antioxidantes fenólicos, ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido 4-hidroxibenzóico, catequina, ácido cafeico e ácido clorogénico foram estudados quanto aos seus efeitos sobre o crescimento de doze espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos e a produção de ocratoxina A (OTA). *Aspergillus ochraceus* não foi inibido por nenhum dos compostos fenólicos e, *A. carbonarius* teve efeito inibitório altamente variável frente aos compostos ensaiados. Os ácidos vanílico e 4-hidroxibenzóico apresentaram os melhores efeitos inibitórios de crescimento e da produção de OTA (PALUMBO et al., 2007).

Alimentos como fubá, farelo de soja e ração avícola, foram submetidos ao processo físico de descontaminação por exposição à radiação gama. Foi demonstrado o efeito de doses de radiação sobre a contagem das amostras a partir da primeira e da segunda coleta, respectivamente. Observou-se no estudo que 8 Gy foi eficiente em eliminar a microbiota contaminante dos substratos (RIBEIRO, 2009).

Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma semente economicamente importante na Argentina. Uma das estratégias usadas para reduzir a entrada de micotoxinas na cadeia do amendoim é o uso de tratamentos químicos durante a fase de armazenagem para reduzir o crescimento fúngico e produção de micotoxinas. O uso de antioxidantes como butilato de hidróxi anisoíla (BHA) e propil parabeno (PP) e butilato de hidróxi tolueno (BHT) são utilizados. Concentrações de 1 mmol/L, estimularam a acumulação de OTA em todas as condições ambientais avaliadas. Entretanto em concentrações iguais ou superiores que 5 mmol/L de PP, a produção de toxina foi inibida, e quando associado baixas concentrações de BHA (1 mmol/L) o crescimento fúngico e produção de OTA foram estimulados por algumas espécies *Aspergillus* seção *Nigri*, fato observado com outras substâncias antifúngicas avaliadas. Concentrações sub-inibitórias (1 mmol/L) de BHT e THB aumentou a taxa de crescimento e estimulou a produção de aflatoxina B1 por espécies *Aspergillus* seção *Flavi* (PASSONE et al., 2007; BARBERIS et al., 2009a; 2009b). As substâncias tetraborato de potássio e bórax foram também avaliadas quanto a sua atividade *in vitro* frente *Fusarium sulphureum* um importante fitopatógeno. Os autores mostraram que esses compostos na concentração de 20g/L inibiram completamente o crescimento de micélio e a germinação do conídio deste fungo (LI et al., 2012).

Nas práticas agrícolas, o uso de fungicidas é uma técnica tradicional. Para diminuir a contaminação no período pré-colheita, o tratamento de culturas com fungicidas da classe organofosforados como o diclorvos foi eficiente em inibir *A. sulphureum*, *P. verrucosum* e *A. ochraceus*. Outros fungicidas como o iprodiona, vêm sendo usados em *commodities* agrícolas

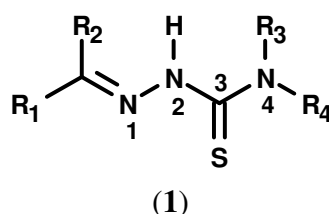
para prevenir o crescimento de várias espécies fúngicas, incluindo os produtores de OTA (VARGA et al., 2010).

Em aquicultura, a eficácia do aluminossilicato de sódio hidratado (HSAS, 0,5%) em proteger a truta arco-íris dos danos hepáticos causados por ração contaminada com aflatoxina B1 também foi investigada. Os grupos experimentais foram alimentados com suas respectivas dietas durante 12 meses, mensalmente cada grupo foi amostrado para análises anatomopatológicas e histopatológicas para verificação da presença de lesões hepáticas. Apesar da presença de HSAS, todos os grupos que receberam dieta contaminada com aflatoxina B1 apresentaram lesões hepáticas indicativas do processo carcinogênico, sendo que exemplares alimentados com essas dietas por mais longo prazo apresentaram hepatocarcinoma ou colangiocarcinoma. Estes resultados indicaram que a concentração de HSAS usada no presente estudo não foi efetiva em prevenir o desenvolvimento de lesões hepáticas induzidas por aflatoxina B1 em truta arco-íris (ARANA et al., 2011).

## 2.6. As Tiossemicarbazonas e Semicarbazonas

As substâncias sintéticas das classes semicarbazonas e tiossemicarbazonas representam uma classe de compostos de considerável interesse científico devido às propriedades químicas e biológicas que essas substâncias apresentam, tais como antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras. Essa classe de compostos é conhecida, também, pelas suas excelentes propriedades para formarem complexos organometálicos, comportando-se como agentes quelantes.

As tiossemicarbazonas e semicarbazonas são substâncias orgânicas que possuem em sua estrutura átomos de nitrogênio e enxofre para as tiossemicarbazonas e oxigênio para as semicarbazonas compreendidos em uma função imina (C=N) e ureia ou tiouréia. A estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC (PANICO et al., 1993) é observada na Figura 2.

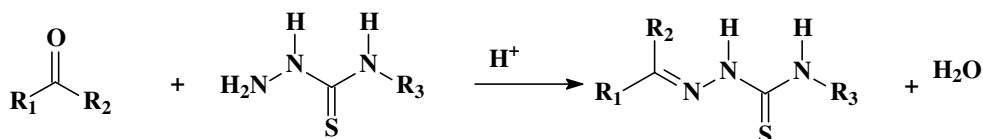


**Figura 2.** Estrutura geral das tiossemicarbazonas.

As tiossemicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias bastante conhecidas por suas aplicações importantes na pesquisa de novos fármacos, em função de seu largo espectro de ação (BERALDO; GAMBINO, 2004). Alguns autores atribuem esta propriedade à alta afinidade que as tiossemicarbazonas apresentam pela enzima ribonucleotídeo redutase, responsável pelo passo crucial na síntese do DNA e, conseqüentemente, da divisão celular (YU et al., 2005). Outros consideram que suas propriedades biológicas são devidas à capacidade que apresentam de formar complexos com cátions metálicos, formando quelatos. Por outro lado, autores sugerem que o mecanismo de ação das tiossemicarbazonas é ainda complexo e deve acontecer através da inibição de múltiplos alvos. Neste sentido, as tiossemicarbazonas apresentam-se como ligantes versáteis tanto na forma neutra quanto na forma aniônica, podendo formar ligação coordenada com metais através do átomo de enxofre e do átomo de nitrogênio azometina (C=N). Esta capacidade de formar ligação coordenada é aumentada se houver grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina (CASAS et al., 2000).

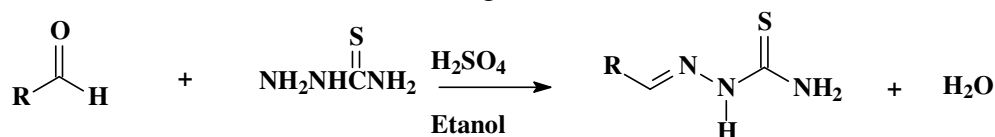
Suas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal em razão de suas atividades biológicas e do provável mecanismo de ação que envolve a capacidade quelante dessas substâncias. Apesar da ampla versatilidade farmacológica desses compostos como uma classe, especificidades estruturais podem levar à manifestação de atividades específicas. Essa classe de compostos pode formar complexos metálicos, e em alguns casos é possível modular a atividade através do desenho do ligante ou através da escolha do metal. De modo geral pode-se dizer que tiossemicarbazonas e semicarbazonas agem, seja como inibidores de enzimas, através da complexação de metais endógenos ou através de reações de redox, seja através de interações com o ADN e da inibição da síntese do ADN. Além disso, alguns complexos metálicos desses ligantes apresentam a habilidade de mimetizar a ação de certas enzimas. A atividade biológica dessa classe de compostos frente a diversas culturas de fungos como *Macrophomina phaseolina*, *F. oxysporum*, *A. niger*, *Amathia alternata*, *Paecilomyces variotii* vêm sendo investigada e relatada na literatura (BERALDO, 2004).

A síntese das tiossemicarbazonas é geralmente obtida pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas (Figura 3). Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos processos de síntese, em especial de compostos heterocíclicos. Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua obtenção, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (CHATTOPADHYAY et al., 1989; DU et al., 2002).



**Figura 3.** Reação geral de obtenção de tiossemicarbazonas com catálise ácida.

Recentemente, Goulart (2010) relatou a síntese com catálise ácida de uma série de tiossemicarbazonas preparadas a partir da reação da tiossemicarbazida com aldeídos devidamente substituídos derivados do benzaldeído e do cinamaldeído, assim como cinco aldeídos heterocíclicos, conforme mostrado na Figura 4.



**Figura 4.** Síntese de tiossemicarbazonas derivadas do benzaldeído e dos cinamaldeídos, devidamente substituídos e de aldeídos heterocíclicos.

## 2.7. As Bases de Schiff

As bases de Schiff são iminas provenientes da condensação de substâncias carbonílicas com aminas, sendo importantes intermediários envolvidos em diversas transformações enzimáticas. As bases de Schiff têm sido sintetizadas e suas atividades biológicas pesquisadas, especialmente a atividade antifúngica. As substâncias sintéticas da classe bases de Schiff, iminas oriundas têm apresentado atividade antifúngica, antibacteriana, citotóxica e antitumoral. Algumas bases de Schiff com 2,4-dicloro-5-fluorofenil têm demonstrado efeito inibidor de crescimento de fungos de interesse clínico como *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Trichophyton mentagrophytes*, e *Penicillium marneffeii*. Os valores de MIC para

esses compostos foram em torno de 6,3-12,5 µg/mL indicando que essas substâncias são tão potentes quanto o fluconazol, utilizado no tratamento clínico de infestações fúngicas (KARTHIKEYAN et al., 2006). Compostos da classe bases de Schiff já foram testados quanto a atividade biológica por nosso grupo, que demonstrou que Bases de Schiff derivadas de piperonal apresentaram atividade antifúngica frente a fungos filamentosos do gênero *Microsporum*, *Trichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum*. Os dados demonstraram que esses compostos possuem uma boa atividade antifúngica aos fungos dermatófitos testados com valores de MIC variando de 62,5 a 500 µg/mL (ECHEVARRIA et al., 1999).

## 2.8. Os Compostos Mesoiónicos

Pesquisadores no campo da química medicinal possuem considerável interesse nos compostos mesoiônicos devido a determinadas características estruturais que estes possuem. O primeiro composto mesoiônico foi sintetizado há mais de cem anos por Fischer e Besthorn (OLLIS et al., 1985). De 1895 a 1905, Busch descreveu a preparação e propriedades químicas de alguns compostos mesoiônicos (NEWTON; RAMSDEN, 1982). Esses primeiros compostos sintetizados foram representados por estruturas bicíclicas, e somente em 1938, Schömberg representou os compostos mesoiônicos com estruturas de ressonância com cargas. Simpson, baseando-se nas estruturas propostas por Schömberg, sugeriu o nome de compostos mesoiônicos para essa classe de substâncias (KIER; ROCHE, 1967).

Os mesoiônicos possuem uma característica básica que é o fato de não poderem ser representados por apenas uma estrutura totalmente covalente ou iônica e não terem, todavia um comportamento típico de ilídeos ou betaínas. Para esses compostos uma das definições mais utilizadas é: “um sistema heterocíclico de 5 membros com carga positiva, contrabalançada por carga negativa localizada em uma cadeia exocíclica, que não pode ser representado por estruturas normais covalentes, sendo melhor descrito por um híbrido de ressonância de todas as formas possíveis carregadas, envolvendo no anel a presença de caráter aromático ( $4n + 2$ )  $\pi$  elétrons” (OLLIS et al., 1985).

A atividade biológica dos compostos mesoiônicos tem sido relacionada ao caráter aromático planar do anel heterocíclico, ao tamanho relativamente pequeno, à variação da densidade eletrônica em torno do anel e à possibilidade de diferentes padrões de distribuição eletrônica em função dos variados sistemas heterocíclicos. A estrutura dotada de carga positiva e negativa, bem separada, possibilita interação com várias moléculas orgânicas, entre as quais os ácidos nucleicos e proteínas, um aspecto relevante ao potencial desses compostos como agentes medicinais (NEWTON; RAMSDEN, 1982; SHINZATO et al., 1989).

Derivados da classe 1,3,4-triazólio-5-tiolato foram testados frente a fungos dermatófitos, bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras com atividade biológica, suscitando pesquisas com outros compostos mesoiônicos, das classes dos 1,3,4-triazólio-5-tiolatos, 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas e 1,2,3-oxadiazólio-5-olatos frente a células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos mostraram a inibição do crescimento de carcinoma de Ehrlich, Sarcoma 180, leucemia L1210 e o tumor B10MCII e aumento significativo da sobrevivência dos animais tratados (ECHEVARRIA et al., 1992; GRYNBERG et al., 1992). Posteriormente, outras pesquisas revelaram atividade significativa do cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina frente ao modelo B16-F10 de melanoma murino. Este composto mesoiônico teve efeitos citotóxicos e antiproliferativos frente a linhagens celulares de melanoma humano, o que resultou em registro de patente em 2004 (SENFF-RIBEIRO et al., 2004).

Alguns estudos relatam ação antiparasitária significativa de derivados da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida frente aos parasitos causadores da leishmaniose, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi* (DA SILVA et al., 2002;

RODRIGUES et al., 2007). Além disso, ação significativa antiparasitária *in vivo* e *in vitro* do composto mesoiônico cloreto de 4-fenil-5-[4'-(3,4-metilenodioxifenil)-1(e)-3(e)-butadienil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina frente ao *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (FERREIRA et al., 2008). Compostos heterocíclicos derivados da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas-*para*-estiril-substituídos na forma de seus cloridratos também foram testados frente as enzimas DNA topoisomerase I e topoisomerase II $\alpha$ , revelando ação inibitória das enzimas (DA SILVA, 2007).

## 2.9. Ergosterol como Possível Alvo para o Mecanismo de Ação de Substâncias Sintéticas

As células fúngicas e humanas apresentam muitas semelhanças e compartilham muitas vias de metabolismo intermediário constituído de enzimas similares dificultando a obtenção de agentes com atividade antifúngica com a seletividade requerida para que se possa obter uma molécula antifúngica segura. Diferentes alvos são propostos para o desenvolvimento de novos antifúngicos, incluindo, inibidores da biossíntese do ergosterol, inibidores de DNA fúngico, e compostos que ajam inibindo a síntese da parede celular desses organismos (ZACCHINO, 2001; LACAZ et al., 2002; KATHIRAVAN et al., 2012). Existem várias limitações impostas pelos fármacos utilizados no tratamento clínico de humanos e de animais, como alta toxidez, por exemplo, nefrotoxicidade, e hepatotoxicidade, além de resistência dos fungos aos compostos disponíveis até o momento. Neste contexto, a pesquisa de novos agentes antifúngicos que sejam mais potentes, mas, sobretudo mais seguros se torna cada vez mais necessária. A busca de novos agentes antifúngicos que atuem de modo seguro está direcionada para obtenção de compostos, que causem a inibição de um processo do patógeno, que não exista no hospedeiro, ou seja, apresentem toxidez seletiva (ZACCHINO, 2001).

Diferente da membrana plasmática de células animais que apresenta colesterol, em fungos o ergosterol é o principal esterol presente na membrana celular, exercendo papel vital para essas células ao modular a fluidez da membrana, alterando o crescimento e a proliferação celular. Os agentes antifúngicos podem exercer sua atividade através da interação direta com o ergosterol ou através da inibição de sua síntese. Os agentes antifúngicos que atuam em nível do ergosterol o fazem por formação de complexo com o ergosterol ou inibindo alguma das etapas da sua biossíntese (ZACCHINO, 2001). Na literatura existem relatos que propõe a inibição do ergosterol como possível mecanismo de ação de substâncias sintéticas. Guran et al. (1998) demonstraram que derivados químicos de ciclofosfazona, com atividade quelante, afeta os níveis de ergosterol de fungos, incluindo espécies do gênero *Aspergillus*. Ryder et al. (1986) associaram também a atividade antifúngica de substâncias sintéticas com inibição da biossíntese de ergosterol da célula fúngica. Os autores relataram em *Candida albicans* a direta inibição de esqualeno epoxidase, uma enzima que participa da síntese de ergosterol, por tolnaftato e tolclilato, ambos pertencentes à classe de tiocarbamato.

## 2.10. Influência das Substâncias Sintéticas no Desenvolvimento do Sistema Vegetativo Fúngico

O ciclo de vida de fungos filamentosos consiste principalmente de duas fases: a fase do crescimento em hifas (formas vegetativas) e a fase reprodutiva, ou seja, a fase da esporulação (no caso de desenvolvimento assexuado, também conhecido como conidiação). Para que o fungo seja contaminante de alimentos destinados ao consumo humano, este organismo necessita de condições adequadas incluindo, temperatura e umidade para o seu desenvolvimento. Tais condições favorecem a germinação dos conídios permitindo que as hifas penetrem no substrato nutritivo, como por exemplo, no tecido de uma planta ou em grãos estocados (AMARAL et al., 2006; NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2011). Desta forma, a

germinação é uma etapa crucial na proliferação e disseminação do fungo no alimento. As substâncias sintéticas podem inibir o crescimento fúngico através do bloqueio de sua germinação. Yildirim e Yapici (2007) descreveram que a germinação, bem como o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea*, um importante patógeno de plantas e frutas, são inibidos por substâncias químicas como aditivos alimentares incluindo, ácido sórbico e propilparabeno e ativadores de plantas como ipradion e óxido de potássio. A inibição da germinação de conídios de fungos filamentosos por alcalóides também foi descrita (SINGH et al., 2009).

Metabolismo secundário está comumente associado com processo de esporulação em microrganismos, incluindo fungos (SEKIGUCHI; GAUCHER, 1977; CALVO et al., 2002). Em *Aspergillus* spp. foi descrito que mudanças na fase de crescimento reprodutiva desses fungos são reguladas pelos níveis de produção dos metabólitos secundários, como por exemplo o das micotoxinas (CALVO et al., 2002; TAO; YU, 2011). Acredita-se que as micotoxinas, sejam produzidas para ativar também a esporulação fúngica (ADAMS; YU, 1998). Sequenciamento de genoma revelou que 40 potenciais genes estão relacionados com a produção de micotoxinas, que são produzidas no momento da esporulação (NIERMAN et al., 2005). Neste contexto, a relação entre produção de micotoxina e esporulação vem sendo documentada em fungos micotoxigênicos, como os do gênero *Aspergillus*. Reib (1982) relatou que certas substâncias químicas que inibem a esporulação de *A. parasiticus* são capazes de afetar também a produção de aflatoxina por este fungo. Esses dados foram corroborados por Bennett e Papa (1988) que relataram que mutantes de *Aspergillus* deficientes em esporulação são incapazes de produzir aflatoxina. No gênero *Fusarium* a relação entre esporulação e produção de micotoxina também foi descrita. A mutação do gene FCC1 resultou na redução da esporulação e consequente diminuição da biossíntese de fumonisina B1 (SHIM; WOLOSHUK, 2001).

## **2.11. O Efeito Quelante como Possível Mecanismo de Ação de Substâncias Sintéticas**

O ferro exerce papel essencial em espécies procarióticas e eucarióticas por fazer parte fundamental em várias vias bioquímicas e se torna assim, indispensável para a proliferação celular. Algumas substâncias tiveram atividade antifúngica atribuída, em parte, pela habilidade da molécula atuar como ligante tridentado que liga íons metálicos (OPLETALOVÁ et al., 2008; DEBEBE et al., 2011).

Substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas vêm sendo alvo de pesquisas em suas atividades quelantes, e são descritas como excelentes quelantes de metais de transição assim como o ferro, cobre e zinco (YU et al., 2005). As tiossemicarbazonas apresentam diversificadas atividades biológicas e, alguns autores atribuem esta propriedade à sua alta afinidade pela enzima ribonucleotídeo redutase, que tem o ferro em uma de suas subunidades, responsável pelo passo crucial na síntese do DNA e, conseqüentemente, da divisão celular. Suas propriedades biológicas são atribuídas à capacidade que apresentam de formar complexos com cátions metálicos, formando quelatos. Neste sentido, as tiossemicarbazonas apresentam-se como ligantes versáteis podendo formar ligação coordenada com metais através do átomo de enxofre e do átomo de nitrogênio azometina (C=N) (TENÓRIO et al., 2005). As substâncias com atividade quelante de metais de transição podem também apresentar como possível via de ação a complexação com o ferro não-heme presente no meio celular levando a efeitos antifúngicos (ZAREMBER et al., 2009).

## **2.12. Estudos de Toxicidade Celular**

A Toxicologia é definida pela Organização Mundial de Saúde como a "disciplina que estuda os efeitos nocivos dos agentes químicos e dos agentes físicos (agentes tóxicos) nos

*sistemas biológicos e que estabelece também, a magnitude do dano em função da exposição dos organismos vivos a esses agentes. Estuda a natureza e os mecanismos de lesões e a avaliação das diversas alterações biológicas produzidas pelos agentes nocivos"* (COREY, 1988). Dentro da bateria de ensaios *in vitro* necessários para o registro de uma substância, se encontram os chamados "ensaios de citotoxicidade". Mediante estes ensaios é possível detectar os efeitos adversos e/ou de interferência de uma substância com diferentes estruturas e/ou mecanismos celulares tais como: a integridade da membrana, o citoesqueleto, o metabolismo, a síntese e/ou degradação, a liberação de constituintes ou produtos celulares, a regulação iônica ou a divisão celular (REPETTO, 2002).

Os ensaios de citotoxicidade são úteis para definir a citotoxicidade basal, tais como a capacidade intrínseca de um componente de causar a morte de células como resultado de danos severos de funções celulares. Ensaios de citotoxicidade também são necessários para definir a faixa de maior concentração e de forma mais detalhada, fornecer informações significativas sobre outros parâmetros, tais como genotoxicidade ou morte celular programada (EISENBRAND et al., 2002). Os estudos toxicológicos *in vitro* são amplamente utilizados porque empregam vários métodos importantes. Entre eles se destaca a avaliação da atividade citotóxica de substâncias sobre a proliferação de células cancerosas de humanos segundo a análise da sulforrodamina B (SKEHAN et al., 1990). Técnicas imunológicas tais como a IFI (imunofluorescência indireta) que permite determinar a integridade do citoesqueleto. De igual forma, o ensaio da determinação da perda da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH), a visualização e ponderação do dano morfológico celular, o ensaio de quantificação de proteínas, ensaio da captação do vermelho neutro e o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) estão dentro dos métodos que podem ser utilizados para avaliar a toxicidade e quantificar a viabilidade celular após exposição a substâncias tóxicas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Para determinar se uma substância apresenta risco real ou potencial para determinado tipo de célula, é necessário um método que possa medir a citotoxicidade e/ou a viabilidade celular de forma precisa, dado que a quantificação da citotoxicidade é importante para a posterior inovação de outros tipos de ensaios biológicos. Entre os métodos para quantificar a citotoxicidade de um composto podemos citar: a) Os que medem o dano celular recente. Neste caso se detecta a diminuição do metabolismo basal medindo os níveis de ATP ou a atividade mitocondrial. Um ensaio que mede a atividade mitocondrial é o ensaio de redução do MTT; b) Os que medem o dano celular grave. Neste caso se detecta perda da integridade da membrana medindo-se as enzimas liberadas. Ensaio de liberação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, G3PDH e da enzima LDH ou a exclusão de corantes. Estes últimos se baseiam na habilidade da membrana celular das células viáveis para excluir corantes vitais. Os corantes usados podem ser fluorescentes, como o iodeto de propídio, não fluorescentes como violeta de genciana e azul de tripan (FENTEM, 1994); c) Os que medem perda de células. Neste caso as células mortas se desprendem do substrato e se pode medir o número por contagem celular, com a quantificação do ADN ou quantificando as proteínas totais.

Neste contexto, uma alternativa ao controle do desenvolvimento de fungos micotoxigênicos em grãos de cereais usados na alimentação poderia ser abordada, em função do emprego de substâncias sintéticas em concentrações não tóxicas. Uma vez que esses compostos vêm sendo pesquisados quanto a ação antimicrobiana, englobando os estudos do seu mecanismo de ação. As pesquisas direcionadas ao estudo de relações estrutura/atividade permitem que novas moléculas sejam sintetizadas com baixa citotoxicidade.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes e Solventes

- Meio batata-dextrose ágar (Difco)
- Meio Sabouraud-dextrose ágar (extrato de levedura: Difco; peptona: Difco e glucose: Sigma)
- Meio RPMI-1640 com glutamina, sem bicarbonato (Gibco laboratories, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EUA)
- Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Meio de cultura Mueller Hinton Caldo (Difco)
- Anfotericina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Itraconazol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Dimetilsulfóxido (Sintorgan<sup>®</sup> Indústria Argentina e Merck Darmstadt, Germany)
- Hepes (Gibco laboratories, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EUA)
- Histopaque<sup>®</sup> - 1077 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- L-glutamina (Parafarm, Argentina e Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Antibióticos Penicilina, Estreptomicina e Neomicina (Gibco laboratories, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EUA)
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (Invitrogen, Oregon, EUA)
- Soro fetal bovino (Gibco laboratories, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EUA)
- Hoechst 33258 (1 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Ácido acético (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Metanol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Cloreto de sódio (Merck Darmstadt, Germany)
- Clorofórmio (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Álcool isoamílico (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Etanol (Merck Darmstadt, Germany)
- Agarose (Invitrogen, Oregon, EUA)
- Tris-HCl (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Gás Nitrogênio sob pressão (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil)
- Ergosterol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Lanosterol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Hexano (Nuclear, São Paulo, Brasil)
- Éter (Merck Darmstadt, Germany)
- Cloreto férrico (Vetec, São Paulo, Brasil)
- Ácido sulfúrico (Vetec, São Paulo, Brasil)
- Tween 20 (Merck Darmstadt, Germany)
- Cloranfenicol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)
- Etanol (Merck Darmstadt, Germany)
- *p*-iodonitrotetrazolium violeta (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)

#### 3.2. Equipamentos

- Estufa bacteriológica (Heraeus, São Paulo, Brasil)
- Cabine de segurança química (Permutation)
- Incubator Shaker (Innova 4080)
- Leitor de microplacas (Bio-Rad 680)



- Espectrofotômetro (Thermo Spectronic Genesys 10 UV-Vis)
- Centrífuga (Analítica Mikro 120)
- Câmera Digital (Panasonic Lumix)
- Agitador magnético (IKA RCT basic Biovera)
- Cabina de Segurança Biológica (VECO Bio Seg 09)
- Leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS)
- Microscópio binocular óptico (Zeiss Axiostar Plus)
- Microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss Axiostar Plus)
- Balança Analítica (AUX- 220 Shimadzu)
- Espectrofotômetro (Shimadzu UV-mini 1240, Kioto, Japão)
- Bomba de vácuo (Primatec)
- pHmetro (Gehaka PG1800)
- Vórtex (Biomixer 9L 901)
- Autoclave (Hirayama)
- Sistema de água Milli-Q (Millipore)

### 3.3. Substâncias Sintéticas Avaliadas quanto a sua Atividade Antifúngica

As substâncias sintéticas pesquisadas em sua atividade antifúngica pertencem à classe semicarbazonas (**SM**), tiosemicarbazonas monosubstituídas, tiosemicarbazonas dissustituídas (**TS**), bases de Schiff (**BS**), e compostos da classe mesoiônicos (**MI**). Todas as estruturas moleculares estão apresentadas nos resultados e discussão. As substâncias sintéticas avaliadas em sua atividade biológica foram sintetizadas e suas estruturas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas de rotina como infravermelho, massas e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , no Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Campus Seropédica, RJ. Os processos das sínteses das substâncias realizadas por nosso Grupo de Pesquisa são baseados nos princípios da Química Verde como o uso da irradiação por micro-ondas, considerada promissora, pois permite a economia de energia e, em alguns casos, a eliminação do uso de solvente orgânico.

#### 3.3.1. Solubilização das substâncias sintéticas e meio de cultivo

As substâncias sintéticas das diversas classes foram avaliadas em sua atividade antifúngica pela técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC), e foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO): Tween 20: RPMI 1640, diluídas na razão de 1:1:8. O meio de cultivo sintético RPMI-1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Gibco), utilizado nos experimentos foi tamponado com ácido 3-[*N*-morfino] propanosulfônico (MOPS) (Sigma) na concentração final de 0,165 mol/L e o pH foi ajustado com NaOH 1 M para 7,0.

#### 3.3.2. Fungos micotoxigênicos utilizados no estudo

Para a avaliação das atividades antifúngicas de substâncias sintéticas, foram utilizadas cepas de fungos micotoxigênicos, obtidas na Coleção Micológica *Trichocomaceae* do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro, com o número de acesso da coleção (acrônimo da coleção seguido do número da cepa) indicando sua origem institucional (Tabela 2). Os fungos foram manipulados seguindo as normas de biossegurança vigentes para microrganismos da classe de risco 2.

**Tabela 2.** Fungos micotoxigênicos utilizados no estudo

Nome científico	Nº de acesso na coleção	Nº do lote	Origem
<i>Aspergillus flavus</i>	CMT 00040	000400803	Pimenta do reino preta
<i>Aspergillus nomius</i>	CMT 00328	003280500	NRRL 13137
<i>Aspergillus ochraceus</i>	CMT 00435	004351202	NRRL 3174
<i>Aspergillus parasiticus</i>	CMT 00334	003340503	NRRL 3000
<i>Fusarium verticillioides</i>	CMT 00177	001771098	UFRRJ 1128
<i>Penicillium citrinum</i>	CMT 00151	001511098	INCQS 40011

### 3.3.3. Cultivo e preparação dos inóculos fúngicos

As ampolas contendo os inóculos fúngicos das espécies de *Aspergillus*, *F. verticillioides* e *P. citrinum* foram desinfetadas com álcool 70%. A parte superior foi aquecida em chama de bico de Bunsen, para em seguida serem adicionadas gotas de água estéril na parte aquecida da ampola a fim de provocar choque térmico da mesma e o fragmento de vidro foi retirado com auxílio de pinça estéril. Foi adicionado ao líófilo, através de pipeta Pasteur estéril 1 mL de água purificada estéril e mantido em repouso por 15 minutos. Após esse período, a suspensão de cada líófilo, foi homogeneizada e 0,1 mL foi transferido em duplicata para placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud-dextrose ágar (SDA), plaqueadas com auxílio da alça de Drigalsky e incubadas em estufa bacteriológica durante 7 dias, a 25° C. Após ativação da cultura de dois inóculos subsequentes em meio SDA, procedeu-se então o repique das amostras para o meio de cultura batata-dextrose ágar (BDA) para obtenção dos conídios. As culturas do gênero *Aspergillus* foram incubadas durante 7 dias, a 35 °C, com exceção da espécie *A. ochraceus*, incubada durante 7 dias, a 25 °C. A espécie *F. verticillioides* foi incubada em estufa bacteriológica durante 48 horas, a 35 °C e até o sétimo dia, a 25 °C. A cultura do gênero *P. citrinum* foi crescida em meio Czapek-Dox ágar, pH 5,5 a 25 °C durante 7 dias.

### 3.3.4. Preparação dos inóculos dos fungos filamentosos

As colônias fúngicas de 7 dias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de salina (NaCl 0,85%), contendo Tween 20 (1%) estéril para obtenção de suspensão de conídios, mexendo-se delicadamente as colônias com a ponta de uma pipeta Pasteur. A mistura resultante de cada amostra fúngica foi retirada e transferida para um tubo de ensaio estéril e mantidos em repouso por 5 minutos para decantação das partículas maiores (possíveis hifas). A suspensão homogênea superior foi transferida para um tubo estéril e homogeneizada durante 15 segundos para logo a seguir proceder ao ajuste da densidade óptica (D.O.). Para ajustar o inóculo, a densidade óptica da suspensão de inóculos foi obtida em espectrofotômetro Genesys 10 UV Thermo Spectronic, a 625 nm. Após as leituras, procedeu-se o ajuste das densidades dessas suspensões de conídios para um D.O., conforme a espécie fúngica. Para o gênero *Aspergillus*, D.O de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80 a 82%) e para o gênero *Fusarium*, D.O de 0,15 a 0,17 (transmitância de 68 a 70%). Em seguida, as suspensões foram diluídas a uma concentração de 1:50 (correspondente a 2x a densidade necessária 0,8 x 10<sup>4</sup> a 1 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. Quando 100 µL do inóculo foram adicionados na placa de 96 poços,

contendo 100 µL do meio RPMI 1640, a concentração final obtida foi corresponde a  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL.

### **3.3.5. Teste de viabilidade e quantificação dos inóculos fúngicos**

Para o teste de viabilidade foi preparada uma diluição 1:200 da suspensão ajustada de conídios de *Aspergillus* spp., *F. verticillioides* e *P. citrinum* e uma diluição (1:100) da suspensão de *C. albicans* ajustada. De cada suspensão, 100 µL foram adicionados em 2 placas de Petri contendo SDA e plaqueadas com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30 °C e para verificação do crescimento fúngico foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após 24 horas.

### **3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe Semicarbazonas frente a Espécies do Gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides***

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de substâncias sintéticas da classe semicarbazonas foi realizada segundo a metodologia descrita para fungos filamentosos em conformidade com o CLSI (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial) antigo NCCLS (Comitê Nacional de Padronização Clínica Laboratorial), norma M38-A (NCCLS, 2002a). Os testes de microdiluição em caldo foram realizados em placas de poliestireno de 96 poços com fundo em U e para realização dos ensaios foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640, tamponado com MOPS 0,165 M, pH 7,0 em todos os poços e 100 µL de cada substância a 1 mg/mL foram adicionados no primeiro poço de cada coluna e em seguida foi realizada a diluição seriada (1:2), agitando e transferindo 100 µL para o poço seguinte. O processo foi repetido até o último poço onde foram desprezados os 100 µL finais. A faixa de concentração de cada substância testada variou de 500 a 3,9 µg/mL. Para o sistema controle foi adicionado o eluente das substâncias, ou seja, 100 µL de DMSO: Tween 20: RPMI 1640 (1:1:8) no primeiro poço e realizada também a diluição seriada (1:2), igualmente descrito para as substâncias. Em seguida, foram adicionados 100 µL da suspensão de conídios ( $0,8 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  UFC/ mL) em todos os poços, exceto nos poços referentes ao controle do meio, no qual somente RPMI 1640 foi adicionado. As placas foram incubadas a 35 °C, durante 48 h para os fungos filamentosos. Após este período foi realizada a leitura visual para determinação do MIC. O agente antifúngico anfotericina B (AMB, Sigma) nas concentrações de 16 a 0,12 µg/mL foi utilizado como padrão de referência para os fungos filamentosos.

O MIC foi determinado para os fungos filamentosos como a menor concentração da substância capaz de inibir completamente (100%) o crescimento visível do fungo. No teste de microdiluição em caldo, o crescimento em cada poço de MIC foi comparado com o do controle de crescimento com o auxílio de espelho de leitura.

#### **3.4.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe semicarbazonas frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides***

A concentração fungicida mínima (MFC) foi determinada para as substâncias sintéticas semicarbazonas capazes de inibir o crescimento de fungos micotoxigênicos segundo o protocolo descrito por Espinel-Ingroff (2001), com modificações. O ensaio de MFC foi realizado após incubação a 35 °C 48 h das placas de 96 poços referentes ao ensaio de MIC, conforme descrito no item 3.4. Para a determinação da MFC, anteriormente à leitura espectrofotométrica das placas do ensaio MIC, cada poço foi homogeneizado e uma alíquota

de 1 µL foi retirada e adicionada em meio SDA. A concentração fungicida mínima foi determinada como sendo a menor concentração sem crescimento visual de colônias fúngicas. Os resultados foram avaliados 2, 3 e 9 dias durante o período de incubação a 30 °C.

### **3.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe Tiossemicarbazonas Monossustituídas frente a Espécies do Gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides***

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas foi realizada segundo a metodologia descrita no item 3.4.

#### **3.5.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas monossustituídas frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides***

A determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas monossustituídas foi realizada segundo a metodologia descrita no item 3.4.1.

### **3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe Tiossemicarbazonas Dissustituídas frente a Fungo Filamentoso *Aspergillus parasiticus* e Fungo Leveduriforme *Candida albicans***

Nessa etapa foi realizado *screening* com as substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas dissustituídas, que o grupo de pesquisa estava trabalhando no momento. Foi avaliado o potencial antifúngico das moléculas e verificou-se que *Aspergillus parasiticus* foi sensível a ação das substâncias e prosseguimos na realização dos ensaios em triplicata para confirmar os achados. Foi incluído nas avaliações o fungo leveduriforme *Candida albicans* para ampliar o estudo da atividade biológica. A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas dissustituídas frente a fungo filamentoso *A. parasiticus* foi realizada de acordo com a norma M38-A do CLSI (NCCLS, 2002a) conforme metodologia descrita no item 3.4.

Para os experimentos com *C. albicans*, a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) das substâncias sintéticas foi realizada segundo metodologia para fungos leveduriformes em conformidade com a norma M27-A2 do CLSI (NCCLS, 2002b). Foi utilizado inóculo de *C. albicans* amostra ATCC 24433. Após crescimento da levedura em meio BDA por 24 h a 35 °C, as colônias fúngicas foram ressuspensas em solução salina e a densidade do inóculo ajustado, através de leitura em espectrofotômetro Genesys 10 UV Thermo Spectronic, a 530 nm, equivalente a uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Esta suspensão-padrão de levedura contém de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A suspensão para uso foi produzida diluindo 1:100 a suspensão celular, seguida de uma diluição de 1:20 com meio RPMI 1640. Quando 100 µL do inóculo foram adicionados na placa de 96 poços, contendo 100 µL do meio RPMI 1640, a concentração final obtida foi corresponde a  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células por mL. Todos os compostos foram solubilizados em DMSO:Tween 20:RPMI (1:1:8) e testados em concentrações variando de 500 a 3,9 µg/mL. O antifúngico itraconazol (ITC) foi utilizado como padrão de referência para *C. albicans*.

### **3.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe Bases de Schiff frente a Espécies do Gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides***

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de substâncias sintéticas da classe bases de Schiff foi realizada segundo metodologia descrita no item 3.4.

#### **3.7.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe bases de Schiff frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides***

A determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe bases de Schiff foi realizada segundo metodologia descrita no item 3.4.1.

#### **3.7.2. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de substâncias sintéticas da classe bases de Schiff frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**

Para avaliar um pouco mais as atividades biológicas dessa classe de substâncias, foi incluída a determinação da concentração inibitória mínima das bases de Schiff frente a bactérias. Essas substâncias foram sintetizadas e também faziam parte de projetos de pesquisa realizados pelo nosso grupo. A atividade antibacteriana foi realizada com bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* ATCC 33019, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/Fiocruz. As culturas foram mantidas em ágar Mueller Hinton e ágar nutriente (*P. aeruginosa* somente) a 8 °C. A suspensão de inóculo de cada linhagem, em ágar Mueller Hinton, foi preparada para alcançar um inóculo final de 10<sup>3</sup> UFC/mL. Subculturas de todas as espécies foram realizadas para verificar a viabilidade celular.

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada em ensaio em microplacas com 96 poços, segundo o documento M7-A6 do CLSI (NCCLS, 2003) com *p*-iodonitrotetrazolium violeta (*p*-INT) como indicador colorimétrico de crescimento microbiano (ELOFF, 1998). Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO: Tween 20: Mueller Hinton (1:1:8) e testadas em oito concentrações (1.000 - 7,8 µg/mL). O Cloranfenicol (Sigma, concentração na faixa de 64 a 0,5 mg/mL em 95% Etanol/H<sub>2</sub>O) foi utilizado como padrão de referência. Para o controle de crescimento e esterilidade, foi utilizada água destilada estéril, sem solventes ou compostos. Posteriormente, 5 µL de inóculo foram aplicados nos poços e as microplacas foram incubadas a 37 °C, *overnight*. Em seguida, 20 µL de *p*-INT (Sigma), 0,2 mg/mL adicionados na solução aquosa e mais uma vez, as placas foram incubadas por um período de 2 horas, a 37 °C. A concentração inibitória mínima - MIC foi definida como a menor concentração dos compostos que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano, conforme indicado pelo reagente de *p*-INT colorimétrico. Os testes foram realizados em triplicata.

### **3.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) de Substâncias Sintéticas da Classe de Compostos Mesoioônicos frente a Espécies do Gênero *Aspergillus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum***

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de substâncias sintéticas da classe de compostos mesoioônicos foi realizada segundo metodologia descrita no item 3.4.

### **3.8.1. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe de compostos mesoiônicos frente *Fusarium verticillioides***

A determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias sintéticas da classe de compostos mesoiônicos foi realizada segundo a metodologia descrita no item 3.4.1.

### **3.9. Determinação do Efeito de Substâncias da Classe Tiossemicarbazonas Monossustituídas sobre o Conteúdo de Ergosterol de *Aspergillus parasiticus***

As substâncias da classe tiossemicarbazonas, **TS-3** (125 e 250 µg/mL) e **TS-6** (31,2 e 62,5 µg/mL) foram utilizadas para avaliar o efeito desses compostos no conteúdo de esteróis de *A. parasiticus* CMT 00334. As substâncias foram solubilizadas em DMSO:Tween 20:RPMI (1:1:8). A amostra fúngica foi crescida em meio BDA por 48 h a 35 °C por 7 dias. Para obtenção dos conídios foi realizada uma raspagem das células de seis placas de cultivo em cada experimento, com auxílio de pipeta Pasteur. A suspensão dos conídios foi recuperada com salina suplementada com Tween-20 a 1%. Em seguida, foi feita a transferência da suspensão celular para tubo de centrifuga, permanecendo em repouso por 5 min para precipitação das possíveis hifas. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 4000 x g durante 10 min. Os conídios (*pellet*) foram lavados 3 vezes com salina, e ressuspensos em 2 mL de meio RPMI 1640. A concentração celular final foi ajustada através de contagem em câmara de Neubauer para  $1 \times 10^7$  células/mL em volume final de 1000 µL e incubadas por 48 h sob agitação. Foram incluídos no experimento, o controle meio, sem adição de substâncias e controle DT correspondente a cada concentração do eluente das substâncias avaliadas. Para analisar os níveis de esteróis de *A. parasiticus* frente às substâncias sintéticas, após 48 h, as amostras foram centrifugadas, e as células lavadas duas vezes com 100 µL de PBS pH 7.2. Os lipídeos totais foram extraídos das células fúngicas através de uma mistura de solventes orgânicos com clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; e 1:2 v/v), adicionados ao *pellet* em volume final de 300 µL (SOARES et al., 1995). Em cada etapa, as amostras foram vigorosamente agitadas por um minuto cada, através de vórtex e mantidas sob agitação durante 1 h a temperatura ambiente. Após esse período, em cada etapa de extração com os solventes, as amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes reservados e reextraídos os *pellets* e descartados após a terceira etapa da extração. Os sobrenadantes reservados foram evaporados até a secagem sob fluxo de nitrogênio e submetidos à partição de Folch (FOLCH et al., 1957). Para isso, as amostras lipídicas foram ressuspensas em mistura de clorofórmio:metanol:água (8:4:3 v/v/v) agitadas e mantidas em repouso para a separação das fases. A fase superior foi desprezada e a fase inferior (lipídios neutros) foi evaporada até a secagem sob fluxo de nitrogênio. Para análise da composição de esteróis, as amostras lipídicas foram ressuspensas em 30 µL de uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1) para posterior aplicação em placas de cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC). Foram utilizadas placas de vidro revestidas por sílica gel 60 com marcador de fluorescência F-254 (Sigma). A corrida cromatográfica foi realizada com a mistura de solventes orgânicos contendo hexano:éter: ácido acético (60:30:1,5 v/v/v). A revelação foi obtida com solução de cloreto férrico em meio ácido (50 mg de cloreto férrico, 5 mL de ácido acético e 5 mL de ácido sulfúrico em 90 mL de água destilada) após aquecimento para visualização e identificação das bandas de esteróis (LARSEN et al., 2004). Como padrões foram aplicados ergosterol (4 µg) e lanosterol (1 µg). A quantificação densitométrica do ergosterol foi realizada utilizando-se o *software* Image J. A área do sistema controle obtida após análise no Image J foi convertida para 100%.

### 3.10. Determinação do Efeito de Substâncias Sintéticas da Classe dos Compostos Meso-iônicos no Conteúdo de Ergosterol de *Fusarium verticillioides*

Os efeitos das substâncias da classe de compostos meso-iônicos **MI-16** (3,9 e 7,8 µg/mL), **MI-2** (7,8 e 15,6 µg/mL) e **MI-11** (3,9 e 7,8 µg/mL) no conteúdo do ergosterol de *F. verticillioides* CMT 00177 foram testados. *F. verticillioides* foi crescido em BDA e incubado durante 48 h, a 35 °C e até o sétimo dia, a 25 °C. As substâncias foram solubilizadas em DMSO:Tween 20:RPMI (1:1:8). Para obtenção dos conídios realizamos uma raspagem das células de 6 placas de cultivo em cada experimento, com auxílio de pipeta Pasteur. A suspensão dos conídios foi recuperada com salina suplementada com Tween-20 a 1%. Em seguida, foi feita a transferência da suspensão celular para tubo de centrifuga, permanecendo em repouso por 10 min. A suspensão celular foi centrifugada a 4000 x g durante 10 min. O *pellet*, constituído por conídios foi lavado duas vezes com salina e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI 1640. A concentração celular final foi ajustada para  $1 \times 10^7$  células/mL. Os procedimentos adotados na extração do ergosterol foram realizados como descrito no item 3.9.

### 3.11. Avaliação do Efeito de Tiossemicarbazonas TS-3 e TS-6 no Desenvolvimento do Sistema Vegetativo de *Aspergillus parasiticus*

A amostra fúngica foi crescida em meio BDA por 48 h a 35 °C durante 7 dias. Os conídios foram obtidos conforme descrito no item 3.3.4. Conídios ( $1 \times 10^7$  células/mL) foram incubados em 2 mL de meio RPMI 1640 pH 7,0 suplementado ou não (controle) com **TS-3** (125 e 250 µg/mL) e **TS-6** (31,2 e 62,5 µg/mL). Após 48 h de incubação a 26 °C, uma alíquota de cada tubo foi observada em aumento de 400 x em microscópio óptico Zeiss Axiostar Plus acoplado a câmera digital.

### 3.12. Avaliação da Atividade Quelante de Substâncias Sintéticas da Classe Tiossemicarbazonas Monossustituídas

Para avaliar a atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  pela tiossemicarbazona **TS-6**, foi utilizada uma solução da tiossemicarbazona 30 µM em DMSO (10 mM), e de sulfato ferroso em água (1,6 mM) para obtenção dos espectros de UV em espectrofotômetro (Shimadzu UV-mini 1240). Para análise da interação das amostras com o metal, foi utilizada solução de íons  $\text{Fe}^{2+}$  na concentração de 3,75 mM. Os espectros obtidos foram sobrepostos através do programa Origin 8.0.

Para padronizar o perfil apresentado nos espectros de UV/Vis do efeito da complexação da **TS-6** com os íons de  $\text{Fe}^{2+}$  foi realizado o experimento com EDTA, pois baseado na literatura este quelante complexa de forma equimolar com o  $\text{Fe}^{2+}$ . Para avaliar o efeito quelante frente ao  $\text{Fe}^{2+}$  foram utilizadas soluções em água destilada (5,0 mL) contendo alíquotas das soluções-estoque de **TS-6** ( $10 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> em DMSO) necessárias para obter as concentrações de  $3,75 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. A cada solução foi adicionado  $\text{FeSO}_4$  ( $16 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>) em água destilada para uma concentração final de  $3,75 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>. As determinações espectrofotométricas foram obtidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-mini 1240) com as soluções contidas em cubeta de quartzo (1,7 mL). A habilidade das amostras formarem quelantes com os íons de  $\text{Fe}^{2+}$  foi calculada usando a equação 1 e expressa em porcentagem (LIM et al., 2009).

$$\text{Efeito quelante (\%)} = -[1 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}})] \times 100\% \quad (1)$$

Para determinação da estequiometria do complexo ligante (TS-6) e o metal ( $\text{Fe}^{2+}$ ) foi usado o Método de Mollard ( $\text{Fe}^{2+} 25 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) segundo a equação 2 (JUNIOR; CROUCH, 1988). As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-mini 1240).

$$l/m = C_l \times A_m / C_m \times A_l \quad (2)$$

onde,  $l/m$  = razão entre ligante e metal  
 $C_l$  = concentração do ligante  
 $C_m$  = concentração do metal  
 $A_l$  = absorvância do ligante  
 $A_m$  = absorvância do metal

### 3.13. Avaliação *In Vitro* da Citotoxicidade de Substância Sintética da Classe Tiossemicarbazona

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade de substância tiossemicarbazona **TS-6** foram realizados no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Exatas, Físico-Químicas e Naturais situada na Universidade Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Córdoba, Argentina. A substância da classe tiossemicarbazona designada como **TS-6** foi selecionada para estudos de citotoxicidade *in vitro* em função de haver inibido todas as espécies do gênero *Aspergillus* e *F. verticillioides*.

Para o desenvolvimento dos experimentos foi utilizada a linhagem celular Vero, clone 76 de rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adquirida na Associação Banco Argentino de Células (ABAC) da cidade de Pergamino, província de Buenos Aires. As células foram mantidas em meio de crescimento para células Vero, o meio essencial mínimo de Eagle (MEM) pH 7,4 em solução salina balanceada de Earle, com glutamina (meio sintético Gibco). Este meio de cultivo foi suplementado com 8% de soro fetal bovino (SFB) e 30  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina. Para propagação da linhagem celular Vero, as células foram cultivadas e se multiplicaram em garrafas de vidro de 1.000  $\text{cm}^3$  até a formação de uma monocamada confluyente. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e as células desprendidas das garrafas com uma solução de tripsina contendo EDTA. A concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^5$  células/mL, para o teste de viabilidade ao azul de tripan (MARGNI, 1996). A suspensão celular foi homogeneizada e semeada em garrafas de cultivo e incubadas a 37 °C até formação de novas monocamadas celulares (VANELLA, 1964; LENNETTE; SCHMIDT, 1979).

#### 3.13.1. Determinação da máxima concentração não citotóxica (MCNC)

A determinação da MCNC foi baseada na observação em microscópio óptico do efeito citopático, incluindo o arredondamento ou retração celular e o surgimento de inclusões no citoplasma após tratamento com a substância sintética. Para este estudo, as células Vero foram crescidas em meio MEM pH 7,4 suplementado com 2% de SFB em microplacas de 96 poços na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de **TS-6** (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Cada concentração avaliada foi ensaiada em 4 poços. Os cultivos foram mantidos em estufa a 37 °C durante 72 horas e examinados diariamente ao microscópio óptico invertido. Para o sistema controle do eluente foi utilizado DMSO 1%, concentração máxima considerada não tóxica como descrito por Spesia (2004). A MCNC foi definida como a máxima concentração da substância **TS-6** que não gerou alteração visível no sistema celular empregado (PUJOL, 1995).



### 3.13.2. Determinação da concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>)

#### a) Por Captação do vermelho neutro (VN)

A viabilidade celular foi monitorada usando o teste de captação do Vermelho Neutro (VN) segundo Borenfreund e Puerner (1985). As células Vero foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço em meio MEM com 8% de SFB e incubadas a 37 °C durante 24 h. As monocamadas celulares confluentes foram tratadas durante 48 h com diferentes concentrações de **TS-6**, acima citadas, em triplicata. As células foram lavadas com 200 µL de PBS, adicionados 200 µL/poço de solução de VN (30 µg/mL em MEM) e a placa foi incubada a 37 °C por 3 h para favorecer a incorporação do corante pelas células. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e o corante foi extraído das células com uma mistura de ácido acético, etanol e água (1:50:49). Os valores de absorbância (D.O.) foram mensurados a 540 nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

Análises estatísticas de regressão linear, para o coeficiente de determinação  $>0,90$  foram realizadas utilizando o *software* Prisma 5.0. O sistema incluiu como controle, células sem tratamento com **TS-6**. A viabilidade relativa nos tratamentos foi expressa como porcentagem de diminuição de VN captado pelas células controles e a fração de sobrevivência (FS) foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$FS \% = \frac{\text{D.O. das células tratadas}}{\text{D.O. das células controle}} \times 100$$

#### b) Por redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

A viabilidade celular foi monitorada usando o teste de redução do MTT segundo Mosmann (1983). Foi utilizado o Kit Vybrant<sup>®</sup> MTT Cell Proliferation Assay (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies, Eugene, Oregon, EUA).

As células Vero foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço em meio MEM contendo 8% de SFB e incubadas a 37 °C durante 24 h. As monocamadas celulares confluentes foram tratadas durante 48 h com diferentes concentrações de cada substância, em triplicata. As soluções foram removidas das placas e as células foram lavadas com 200 µL de PBS/poço. Em seguida, foram adicionados 100 µL de MEM sem soro e 25 µL da solução de MTT (1mg/mL de MTT em PBS 0,01 M pH 7,2) a cada poço. A placa foi incubada a 37 °C durante 4 h. Ao final desse tempo, as monocamadas foram lavadas com 200 µL de PBS por cada poço e os cristais de formazana solubilizados com 100 µL/poço de DMSO. A interpretação dos resultados foi feita por leitura a 560 nm em leitor de microplacas.

Análises estatísticas de regressão linear, para um coeficiente de determinação  $>0,90$  (*software* Prisma 5.0) foram realizadas. O sistema incluiu como controle, células sem tratamento com as substâncias. A viabilidade relativa nos tratamentos foi expressa como porcentagem de diminuição da redução de MTT em comparação com as células controles e a fração de sobrevivência (FS) foi calculada seguindo a seguinte fórmula:

$$FS \% = \frac{\text{D.O. das células tratadas}}{\text{D.O. das células controles}} \times 100$$

### 3.14. Análises Estatísticas

As análises estatísticas para determinação da concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) por captação de VN e MTT foram calculadas por regressão linear utilizando o *software* Prisma 5.0. Pelo menos três experimentos independentes da extração de ergosterol e HPTLC foram realizados, no entanto, um resultado representativo foi selecionado, e utilizado para quantificação densitométrica através do *software* Image J.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

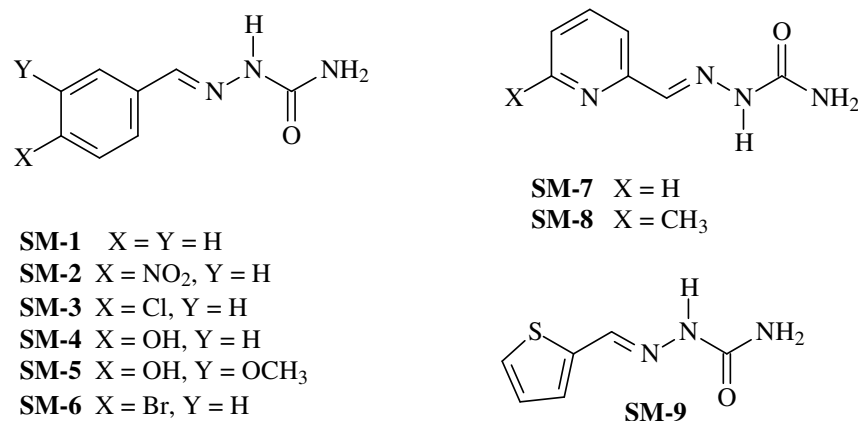
Foi avaliado o efeito de diferentes substâncias sintéticas na atividade antimicrobiana com enfoque em fungos micotoxigênicos. Dentre os compostos foram testados: 4 (quatro) séries de substâncias sintéticas: a) semicarbazonas, 9 (nove) substâncias; b) tiossemicarbazonas, sendo 8 (oito) monossubstituídas e 36 (trinta e seis) dissustituídas; c) bases de Schiff, sendo 7 (sete) derivadas da aminopiridina e benzaldeídos substituídos e d) cloridratos mesoiônicos, sendo 16 (dezesesseis) da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas. Além disso, as tiossemicarbazonas dissustituídas foram avaliadas frente ao fungo filamentoso *A. parasiticus* e leveduriforme *C. albicans*. Enquanto as bases de Schiff foram ensaiadas também quanto à atividade antibacteriana. As avaliações de atividades antifúngicas consistiram nas determinações dos valores da concentração inibitória mínima (MIC) para todas as substâncias, enquanto os ensaios para determinação da concentração fungicida mínima (MFC) foram realizados somente para as substâncias que apresentaram atividade contra fungos micotoxigênicos nas determinações do MIC.

### 4.1. Determinação do MIC de Substâncias da Classe Semicarbazonas frente a Espécies do Gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*

Os ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antifúngica das semicarbazonas (SM1-9) foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo em conformidade com a norma M38-A do CLSI, para fungos filamentosos (NCCLS, 2002a). Esta técnica apresenta mais sensibilidade quando comparada a outras técnicas (LASS-FLÖRL; PERKHOFER et al., 2008; LASS-FLÖRL, 2010). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção em Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ. A metodologia empregada confere exatidão e reprodutibilidade, permitindo avaliar inicialmente a atividade antifúngica das substâncias com perspectivas de uso no controle do desenvolvimento de fungos em alimentos no período de colheita e armazenamento. As substâncias que apresentaram efeito fungistático e fungicida sobre as cepas micotoxigênicas estudadas, foram selecionadas para serem submetidas a estudos quanto a sua citotoxicidade. Os resultados servirão de subsídios para estudar os mecanismos de ação tóxica, que dão suporte de segurança e sustentam a possibilidade de uso das substâncias em estudos futuros para fins farmacológicos.

Os testes de sensibilidade dos fungos em microdiluição em caldo foram realizados *in vitro* com base nos testes de referência reprodutíveis para fungos filamentosos. A metodologia dos testes de sensibilidade dessas espécies de fungos, assim como as condições do teste, incluindo a preparação, o tamanho do inóculo, o período e a temperatura de incubação, a formulação do meio, assim como os critérios para a determinação do MIC foram realizados em conformidade com a norma M38-A do CLSI (NCCLS, 2002a).

A determinação da atividade antifúngica de 9 substâncias sintéticas da classe das semicarbazonas foi realizada visando obter os valores de concentração inibitória mínima (MIC). A Figura 5 mostra as estruturas moleculares das semicarbazonas avaliadas.



**Figura 5.** Estruturas moleculares das semicarbazonas **SM1-9** avaliadas frente aos fungos micotoxigênicos.

Os resultados observados para as semicarbazonas indicaram que apenas os derivados **SM-1** e **SM-4** inibiram o crescimento de *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente. Ambos os compostos tiveram MIC igual a 500 µg/mL, conforme resultados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima - MIC (µg/mL) de semicarbazonas frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*.

Semicarbazonas	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. verticillioides</i>
<b>SM-1</b>	500	>500 <sup>a</sup>	>500	>500	>500
<b>SM-2</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>SM-3</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>SM-4</b>	>500	>500	>500	>500	500
<b>SM-5</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>SM-6</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>SM-7</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>SM-8</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>SM-9</b>	>500	>500	>500	>500	>500

Os MICs foram determinados conforme descrito no documento M38-A (NCCLS, 2002a) e descrito em material e métodos. A anfotericina B (AMB) foi utilizada como padrão de referência e teve MIC igual a 2 µg/mL para todos os gêneros *Aspergillus*, exceto *A. parasiticus* que teve MIC igual a 0,5 µg/mL. O MIC da AMB para *F. verticillioides* foi de 2 µg/mL. <sup>a</sup>A representação de >500, corresponde que a substância não afetou o crescimento fúngico até a concentração de 500 µg/mL.

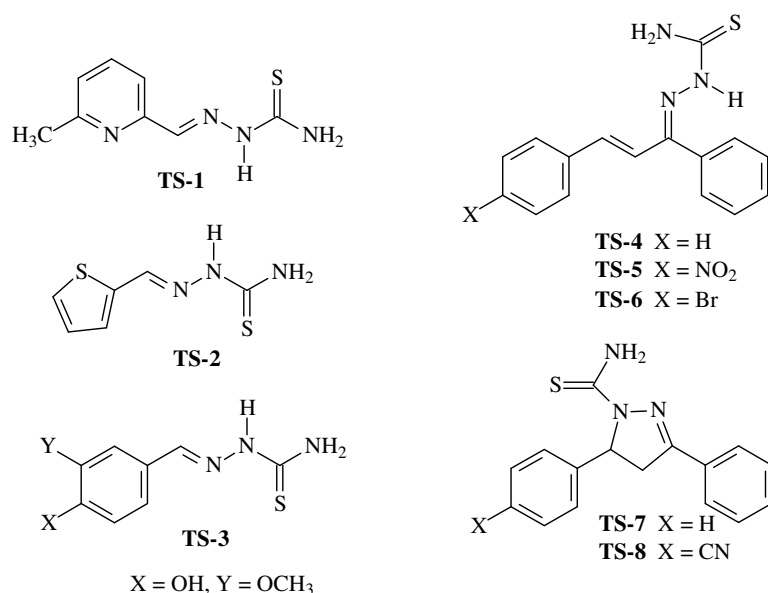
#### 4.1.1. Determinação do MFC de substâncias da classe semicarbazonas frente a espécies *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*

A determinação da concentração fungicida mínima (MFC) das semicarbazonas foi realizada segundo o protocolo descrito por Espinel-Ingroff (2001) com modificações, foram

avaliadas as substâncias com valores de MIC = 500 µg/mL, ou seja, a **SM-1** para *A. flavus* e **SM-4** para *F. verticillioides*. A MFC dessas semicarbazonas frente aos fungos micotoxigênicos teve efeito fungistático com MFC > 500 µg/mL e crescimento visível em 2 dias de cultivo (dados não mostrados).

#### 4.2. Determinação do MIC de Substâncias da Classe Tiossemicarbazonas Monossustituídas frente a Espécies do Gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*

A determinação da atividade antifúngica de 8 (oito) substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas monossustituídas foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo segundo o documento M38-A do CLSI, visando obter os valores de concentração inibitória mínima (MIC). Essa classe de substância teve atividade antifúngica mais efetiva quando comparada com a classe semicarbazonas. A Figura 6 mostra as estruturas moleculares das tiossemicarbazonas monossustituídas avaliadas.



**Figura 6.** Estruturas moleculares das tiossemicarbazonas **TS 1-8** avaliadas frente aos fungos micotoxigênicos.

A substância **TS-6** foi capaz de inibir o crescimento de todas as amostras fúngicas com MIC igual a 125 µg/mL para *A. nomius*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus* e MIC de 250 µg/mL para *A. flavus* e 500 µg/mL para *F. verticillioides*. Enquanto que, **TS-3** inibiu 100%, na concentração de 500 µg/mL, o crescimento de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *F. verticillioides*. As tiossemicarbazonas **TS-1**, **TS-2**, **TS-4** também tiveram efeito inibitório (MIC = 500 µg/mL) frente *A. parasiticus* (Tabela 4). Entre os fungos filamentosos testados *A. parasiticus* foi o mais sensível à ação das tiossemicarbazonas, além de ser um dos fungos que teve maior inibição no crescimento por ação da **TS-6** (MIC = 125 µg/mL). As tiossemicarbazonas **TS-3** e **TS-8** tiveram MIC igual a 500 µg/mL frente *A. parasiticus* e, também foram capazes de inibir a proliferação de *A. flavus* (Tabela 4).

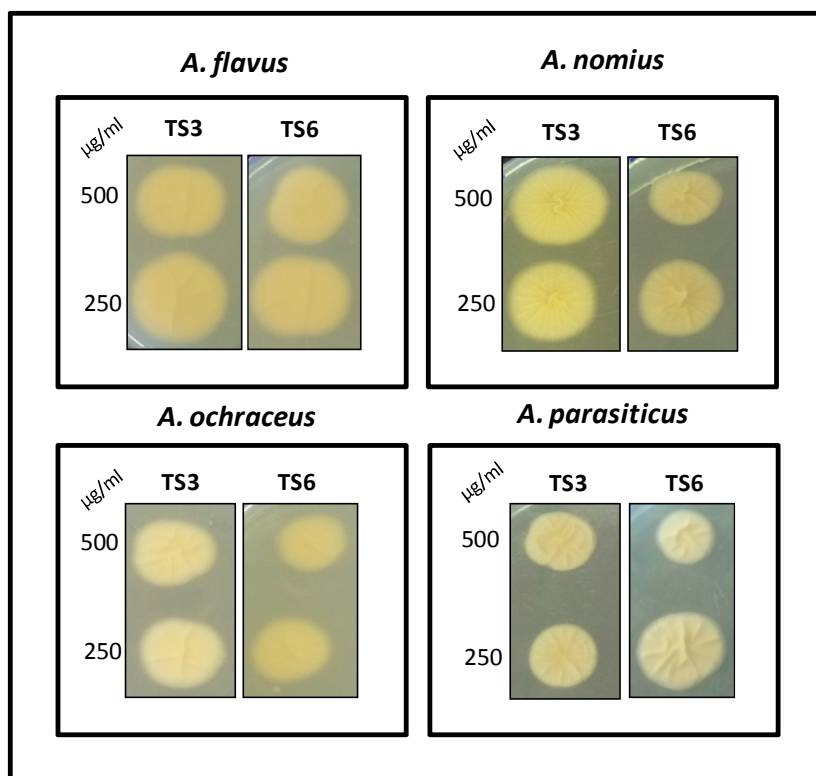
**Tabela 4.** Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de tiosemicarbazonas frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*.

Tiosemicarbazona	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. verticillioides</i>
TS-1	>500 <sup>a</sup>	>500	>500	500	>500
TS-2	>500	>500	>500	500	>500
TS-3	500	>500	>500	500	500
TS-4	>500	500	>500	500	>500
TS-5	>500	>500	>500	>500	>500
TS-6	250	125	125	125	500
TS-7	>500	>500	>500	>500	>500
TS-8	500	>500	>500	500	>500

Os MICs foram determinados conforme descrito no documento M38-A (NCCLS, 2002a) e detalhado em material e métodos. A AMB foi utilizada como padrão de referência e teve MIC igual a 2  $\mu\text{g/mL}$  para todas as espécies do gênero *Aspergillus*, exceto *A. parasiticus* que teve MIC igual a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . O MIC da AMB para *F. verticillioides* foi de 2  $\mu\text{g/mL}$ . <sup>a</sup>A representação de >500 corresponde que a substância não afetou o crescimento fúngico até a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ .

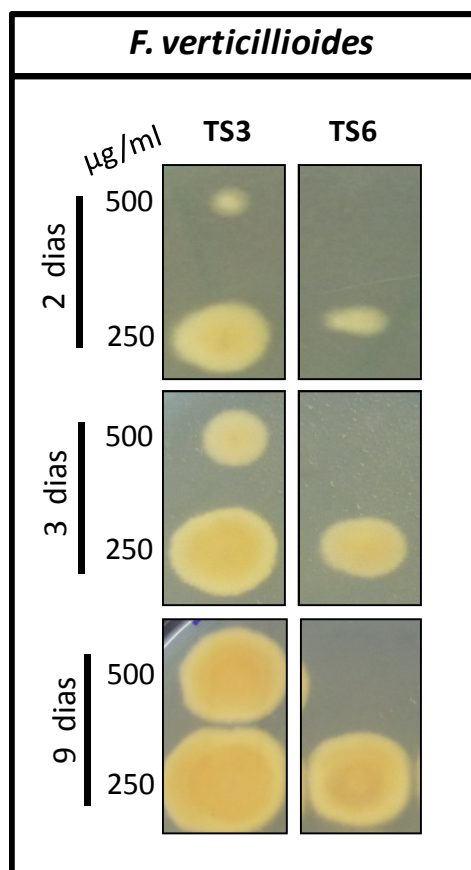
#### 4.2.1. Determinação do MFC de substâncias da classe tiosemicarbazonas monossustituídas frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*

A determinação da concentração fungicida mínima (MFC) foi realizada segundo o protocolo descrito por Espinel-Ingroff (2001) com modificações. Dentre as tiosemicarbazonas monossustituídas avaliadas foram selecionadas para os testes de MFC, as que tiveram melhor atividade antimicrobiana como **TS-3** e **TS-6**. **TS-3** com valores de MIC = 500  $\mu\text{g/mL}$  para *A. flavus*, *A. parasiticus* e *F. verticillioides* e, **TS-6** com valores de MIC = 125  $\mu\text{g/mL}$  para *A. nomius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* e MIC = 250  $\mu\text{g/mL}$  para *A. flavus* e MIC = 500  $\mu\text{g/mL}$  *F. verticillioides*. As substâncias **TS-3** e **TS-6** tiveram efeito fungistático (MFC > 500  $\mu\text{g/mL}$ ), após o segundo dia de cultivo já foi possível visualizar a formação de colônias nas amostras do gênero *Aspergillus* (Figura 7). Dentre as tiosemicarbazonas avaliadas somente a **TS-6** teve efeito fungicida contra *F. verticillioides* como observado na Figura 8, onde mesmo após inoculação dos conídios tratados em meio rico, não houve crescimento celular.



**Figura 7.** Fotografias das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias da classe tiossemicarbazonas monossubstituídas no crescimento das espécies do gênero *Aspergillus*. Os conídios foram adicionados a microplacas de 96 poços contendo meio RPMI 1640, pH 7,0 e concentrações de 500 µg/mL e 250 µg/mL das substâncias sintéticas **TS-3** e **TS-6**. Após 48 h de incubação a 35 °C e leitura visual para determinação do MIC segundo preconizado pelo documento M38-A do CLSI, cada poço foi homogeneizado e uma alíquota de 1 µL foi adicionada ao meio SDA. As placas foram observadas após 2, 3 e 9 dias de incubação a 30 °C.

A atividade biológica de substâncias sintéticas da classe tiossemicarbazonas em fungos vem sendo estudada por vários grupos (BERALDO; GAMBINO, 2004; YU et al., 2009). Nossos resultados sugerem que as tiossemicarbazonas monossubstituídas tiveram moderada atividade antifúngica para a maioria dos fungos micotoxigênicos testados, com valores de MIC de 500 µg/mL. Dentre os fungos *A. parasiticus* foi o mais sensível a ação desses compostos. De fato, a inibição do crescimento foi mais efetiva para os fungos do gênero *Aspergillus* que tiveram valores de MIC iguais a 125 µg/mL para a substância **TS-6**. Esses resultados foram comparáveis aos descritos por Rodríguez-Argüelles et al. (2009) que testaram a atividade biológica de 12 complexos de tiossemicarbazonas e, dentre estes, 10 compostos tiveram MIC > 200 µg/mL e 2 desses compostos foram capazes de inibir o crescimento de *A. niger* com MIC variando de 50 a 100 µg/ml.

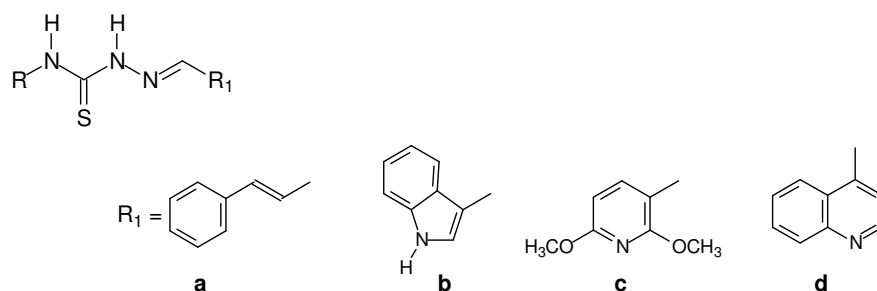


**Figura 8.** Fotografias das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de substâncias da classe tiossemicarbazonas monossustituídas **TS-3** e **TS-6** no crescimento de *Fusarium verticillioides*. As células foram submetidas ao mesmo procedimento descrito na Figura 7 para determinação do MIC. Para a determinação da MFC, cada poço foi homogeneizado e uma alíquota de 1 µL foi adicionada em meio SDA. Após incubação por 2, 3 e 9 dias a MFC foi determinada como sendo a menor concentração sem crescimento visual de colônias fúngicas.

#### **4.3. Determinação do MIC de Substâncias da Classe das Tiossemicarbazonas Dissustituídas frente a Fungo Filamentoso *Aspergillus parasiticus* e Fungo Leveduriforme *Candida albicans***

Foram avaliadas 36 substâncias da classe das tiossemicarbazonas dissustituídas derivadas do cinamaldeído, 3-indolcarboxaldeído, 2-piridinacarboxaldeído e 4-quinolinacarboxaldeído frente ao fungo filamentoso *A. parasiticus* e ao fungo leveduriforme *C. albicans*, a Figura 9 mostra as estruturas das tiossemicarbazonas avaliadas. Dentre as tiossemicarbazonas dissustituídas avaliadas, 13 tiveram atividade antimicrobiana, conforme mostrado pelos valores dos MIC na Tabela 5. As tiossemicarbazonas dissustituídas tiveram maior ação antifúngica especialmente para o fungo leveduriforme *C. albicans* e moderada ação antifúngica frente ao fungo filamentoso *A. parasiticus*. Esses resultados fizeram parte de um artigo na revista *Molecules* 2011, 16, doi:10.3390/molecules161210668. Microwave-Assisted Synthesis of New N1,N4-Substituted Thiosemicarbazones.





<b>TS9:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS17:</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS26:</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS35:</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d
<b>TS10:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS18:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS27:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS36:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d
<b>TS11:</b> R = <i>p</i> -NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS19:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS28:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS37:</b> R = <i>p</i> -CH <sub>3</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d
<b>TS12:</b> R = CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS20:</b> R = <i>p</i> -NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS29:</b> R = <i>p</i> -NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS38:</b> R = <i>p</i> -NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d
<b>TS13:</b> R = (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS21:</b> R = CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS30:</b> R = CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS39:</b> R = CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d
<b>TS14:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS22:</b> R = (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS31:</b> R = (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS40:</b> R = (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH; R <sub>1</sub> = 6d
<b>TS15:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS23:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS32:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS41:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d
<b>TS16:</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ; R <sub>1</sub> = 6a	<b>TS24:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS33:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS42:</b> R = CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d
	<b>TS25:</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ; R <sub>1</sub> = 6b	<b>TS34:</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ; R <sub>1</sub> = 6c	<b>TS43:</b> R = C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ; R <sub>1</sub> = 6d

**Figura 9.** Estruturas químicas das tiossemicarbazonas dissubstituídas ensaiadas frente ao fungo filamentosso *Aspergillus parasiticus* e leveduriforme *Candida albicans*.

Considerando-se a Tabela 5 pode ser observado que as tiossemicarbazonas com maior atividade antifúngica, **TS-12**, **TS-14**, **TS-19** e **TS-22**, tiveram valores de MIC = 250 µg/mL frente ao fungo leveduriforme *C. albicans*. Dentre as 13 tiossemicarbazonas que tiveram atividade antifúngica frente ao fungo filamentosso *A. parasiticus* apenas a **TS-15** não teve efeito antimicrobiano, as demais substâncias tiveram efeito inibitório com valores de MIC = 500 µg/mL.

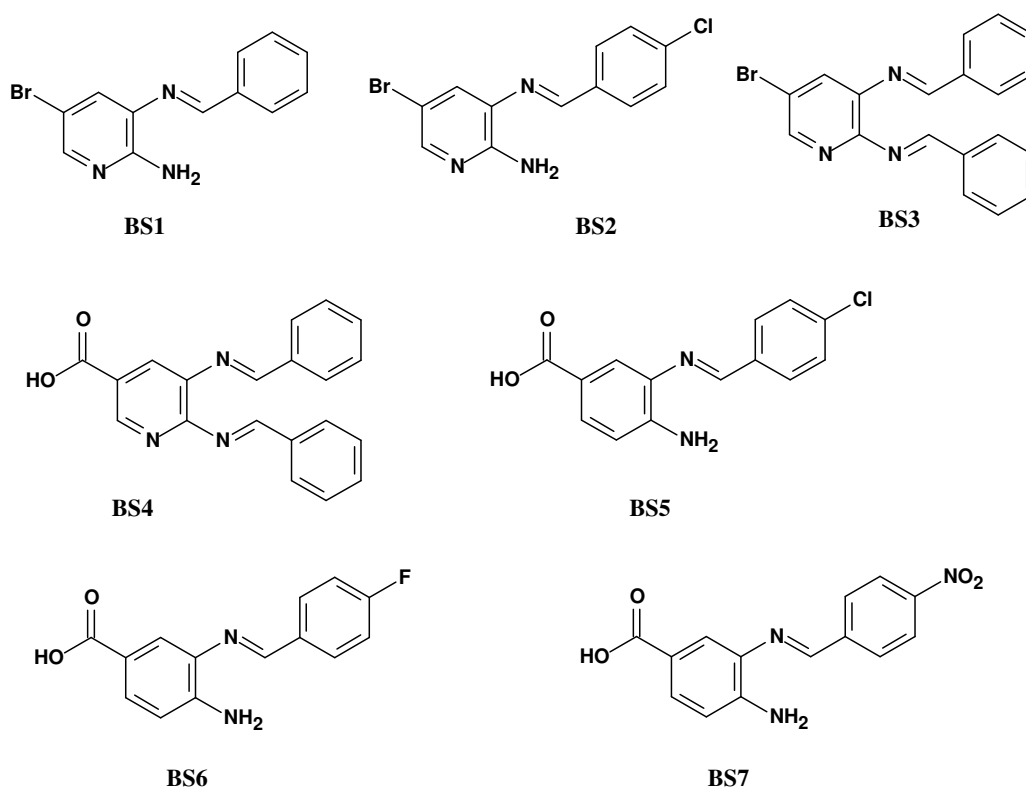
**Tabela 5.** Concentração inibitória mínima - MIC (µg/mL) para as substâncias tiossemicarbazonas dissubstituídas frente a isolados de *Candida albicans* e *Aspergillus parasiticus*.

Tiossemicarbazonas dissubstituídas	<i>Candida albicans</i> (µg/mL)	<i>Aspergillus parasiticus</i> (µg/mL)
<b>TS-12</b>	250	500
<b>TS-14</b>	250	500
<b>TS-15</b>	500	>500
<b>TS-17</b>	500	500
<b>TS-18</b>	>500	500
<b>TS-19</b>	250	500
<b>TS-20</b>	500	500
<b>TS-21</b>	>500	500
<b>TS-22</b>	250	500
<b>TS-23</b>	500	500
<b>TS-24</b>	>500	500
<b>TS-25</b>	500	500
<b>TS-32</b>	>500	500

Os MICs foram determinados conforme preconizado no documento M27-A2 (NCCLS 2002b) para *C. albicans* e M38-A para *A. parasiticus* (NCCLS, 2002a) conforme detalhado em material e métodos. O itraconazol (ITC) utilizado como padrão de referência para *C. albicans* teve MIC igual 0,03 µg/mL. A representação de >500 corresponde que a substância não afetou o crescimento fúngico até a concentração de 500 µg/mL.

#### 4.4. Determinação do MIC de Substâncias da Classe Bases de Schiff frente a Espécies do Gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*

Foram avaliadas as atividades antifúngicas de 7 (sete) substâncias sintéticas da classe bases de Schiff (**BS1-7**, conforme estruturas moleculares mostradas na Figura 10) através da determinação do MIC frente aos diferentes fungos micotoxigênicos. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a substância mais eficaz foi a **BS-7** (Tabela 6). Esta substância teve atividade contra todos os fungos testados. Valores de MIC iguais a 125 µg/mL foram determinados para *F. verticillioides* e para todos *Aspergillus* spp. exceto *A. nomius*, que teve seu crescimento completamente inibido somente com 250 µg/mL de **BS-7**. O fungo mais sensível à ação das bases de Schiff foi *A. parasiticus* que além de ter seu crescimento inibido por **BS-7** foi sensível também a **BS-1** e **BS-2** na concentração de 500 µg/mL. A substância **BS-1** inibiu, ainda, o fungo *A. flavus* quando tratado, também, com 500 µg/mL (Tabela 6).



**Figura 10.** Estruturas moleculares das bases de Schiff avaliadas frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*.

A base de Schiff **BS-7** teve o melhor efeito inibitório frente a todos os fungos ensaiados, conforme descrito anteriormente, e desta forma, podemos sugerir que a presença do grupo substituinte nitro no anel aromático ligado ao carbono azometínico pode ter contribuído para essa maior atividade antifúngica.

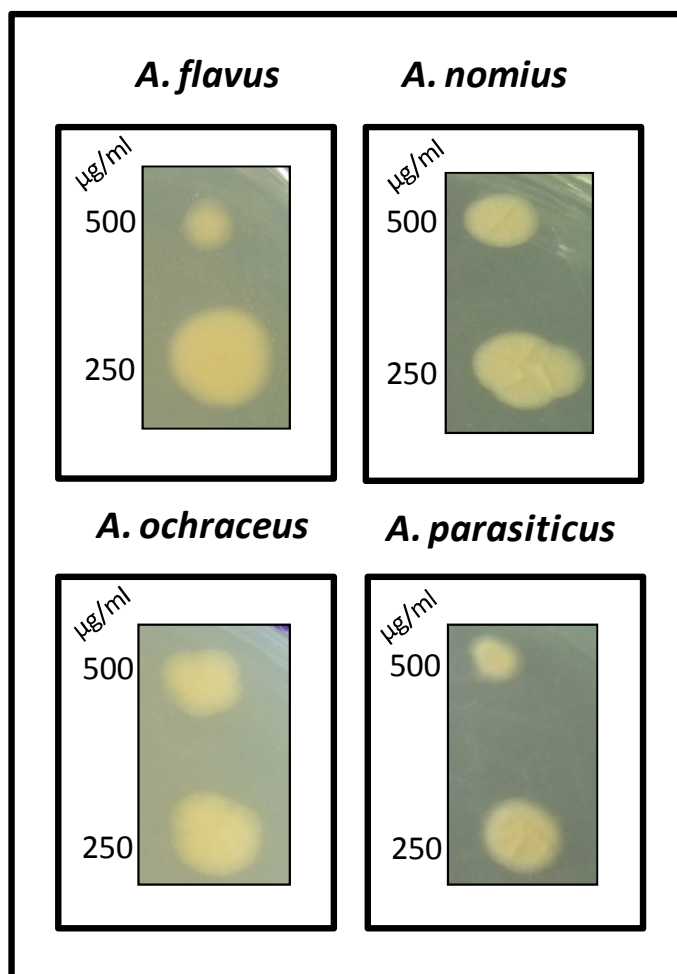
**Tabela 6.** Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de bases de Schiff frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides*.

<b>Bases de Schiff</b>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. verticillioides</i>
<b>BS-1</b>	500	>500	>500	500	>500
<b>BS-2</b>	>500	>500	>500	500	>500
<b>BS-3</b>	>500	>500	>500	>500	500
<b>BS-4</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>BS-5</b>	>500	>500	>500	>500	>500
<b>BS-6</b>	>500	>500	>500	>500	500
<b>BS-7</b>	125	250	125	125	125

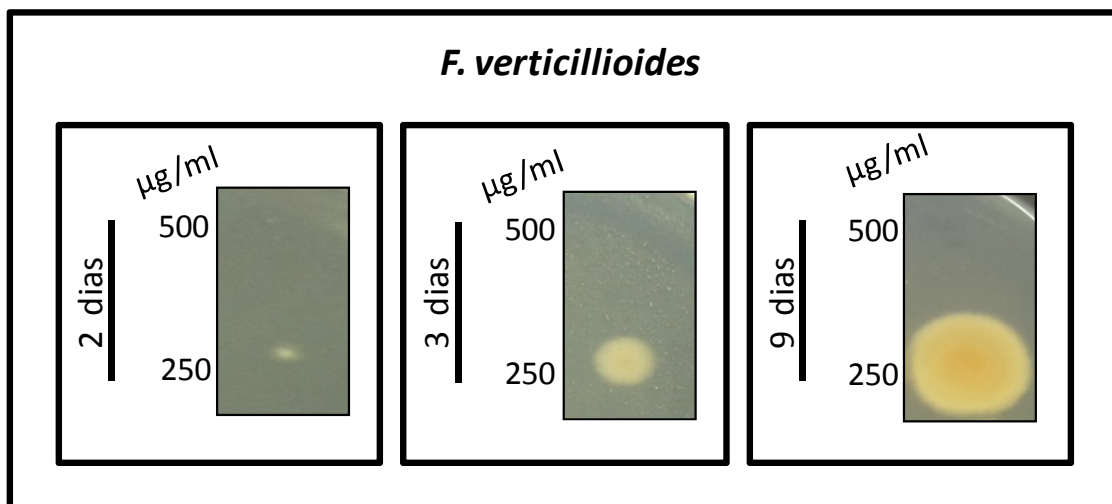
Os MICs foram determinados conforme descrito no documento M38-A (NCCLS, 2002a) e detalhado em material e métodos. A AMB utilizada como padrão de referência teve MIC igual a  $2 \mu\text{g/mL}$  para todos os gêneros *Aspergillus*, exceto *A. parasiticus* que teve MIC igual a  $0,5 \mu\text{g/mL}$ . O MIC da AMB para *F. verticillioides* foi de  $2 \mu\text{g/mL}$ . >500, corresponde que a substância não afetou o crescimento fúngico até a concentração de  $500 \mu\text{g/mL}$ .

#### **4.4.1. Determinação do MFC de substâncias da classe bases de Schiff frente a espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium verticillioides***

Nos ensaios para determinação das MFC das bases de Schiff foi verificado que as substâncias avaliadas inibiram o crescimento de *Aspergillus* spp. de forma fungistática (Figura 11). **BS-7** foi a única substância com efeito fungicida e determinado o MFC em  $500 \mu\text{g/mL}$  para *F. verticillioides*. A ausência de crescimento pode ser observada já no segundo e terceiro dias após adição dos conídios tratados em meio SDA na ausência de **BS-7** e foi confirmada após 9 dias de incubação a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 12).



**Figura 11.** Fotografia das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima - MFC da base de Schiff **BS-7** frente a espécies do gênero *Aspergillus*. As células fúngicas *A. flavus*, *A. nomius*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus* foram submetidas ao mesmo procedimento descrito no item 3.4 para determinação do MIC. Para a determinação da MFC, cada poço foi homogeneizado e uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  foi adicionado em meio SDA. Após incubação por 2, 3 e 9 dias a MFC foi determinada como sendo a menor concentração sem crescimento visual de colônias fúngicas.



**Figura 12.** Fotografia das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima - MFC da base de Schiff **BS-7** no crescimento de *Fusarium verticillioides*. As células foram submetidas ao mesmo procedimento descrito no item 3.4 para determinação do MIC. Para a determinação da MFC, cada poço foi homogeneizado e uma alíquota de 1 µL foi adicionada em meio SDA. Após incubação por 2, 3 e 9 dias a MFC foi determinada como sendo a menor concentração sem crescimento visual de colônias fúngicas.

#### **4.5. Determinação do MIC de Substâncias Sintéticas da Classe Bases de Schiff frente a Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas de 7 (sete) bases de Schiff, **BS1-7** através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC) frente as bactérias Gram-positivas *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. aureus* e Gram-negativas *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, conforme método preconizado pelo CLSI, e os resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de bases de Schiff frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Base Schiff	Bactérias						
	Gram-positivas			Gram-negativas			
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<b>BS-1</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>BS-2</b>	1	1	1	1	0,5	1	1
<b>BS-3</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>BS-4</b>	1	1	1	1	0,5	1	1
<b>BS-5</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>BS-6</b>	0,5	0,5	0,125	0,5	0,5	1	0,5
<b>BS-7</b>	1	1	1	1	1	1	1

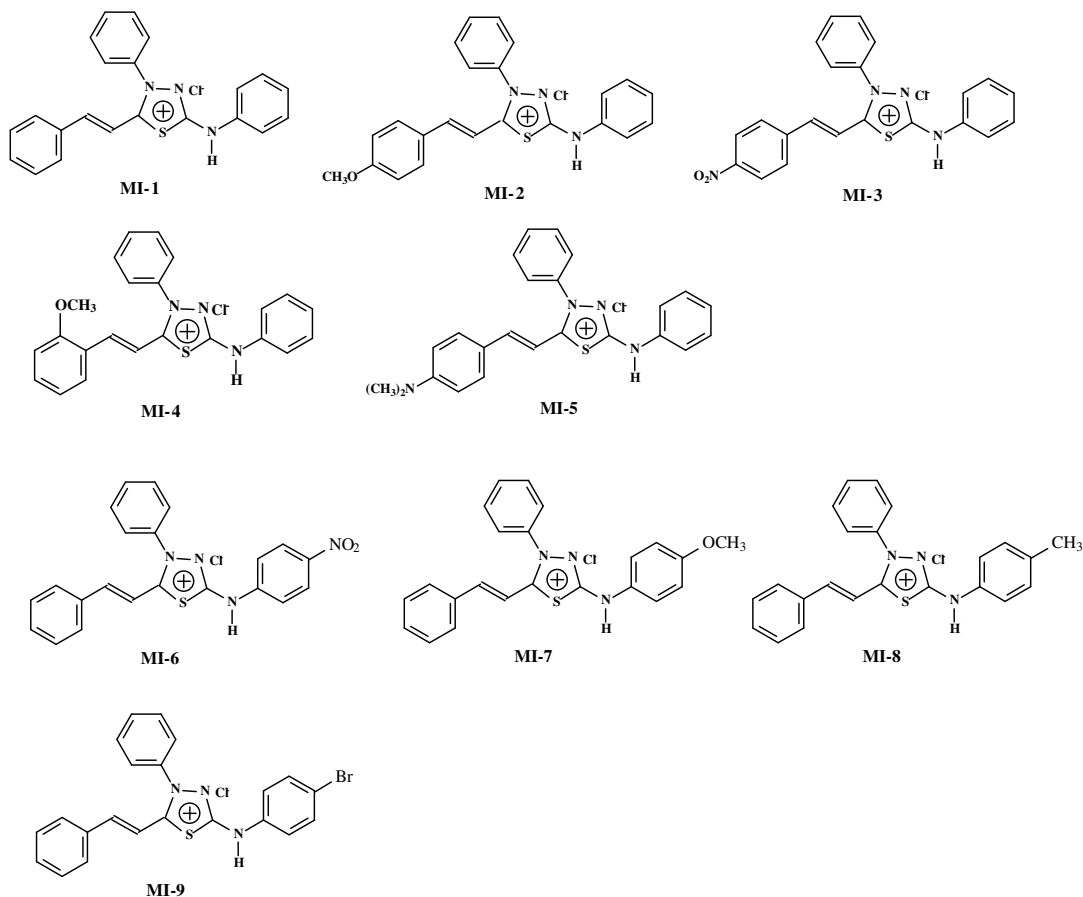
Os MICs foram determinados conforme preconizado no documento M7-A6 do CLSI (NCCLS, 2003) empregando-se o *p*-iodonitrotetrazolium violeta (*p*-INT) como indicador colorimétrico de crescimento microbiano, conforme detalhado em material e métodos. O Cloranfenicol utilizado como padrão de referência apresentou um MIC igual a 16  $\mu\text{g/mL}$ .

As bases de Schiff sintetizadas a partir de aldeídos e aminopiridinas tiveram atividade antimicrobiana para todas as bactérias testadas. No entanto, com valores de MIC na faixa de miligramas para maioria dos isolados. A substância mais eficaz foi a **BS-6** (Tabela 7) que teve MIC igual a 1 mg/mL somente para *P. aeruginosa*, e valor de MIC na faixa de miligramas (0,5 mg/mL) para *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis* e *K. pneumoniae* e, ainda, MIC igual a 0,125 mg/mL para *S. aureus*, o microorganismo mais sensível à ação das substâncias da classe bases de Schiff avaliadas neste trabalho. O Cloranfenicol utilizado como padrão de referência apresentou MIC igual a 16  $\mu\text{g/mL}$ .

Esses resultados permitiram uma avaliação mais ampla das atividades biológicas dessas moléculas, tendo em vista que essa classe de substâncias está contida em uma linha de pesquisa em desenvolvimento pelo nosso grupo de pesquisa.

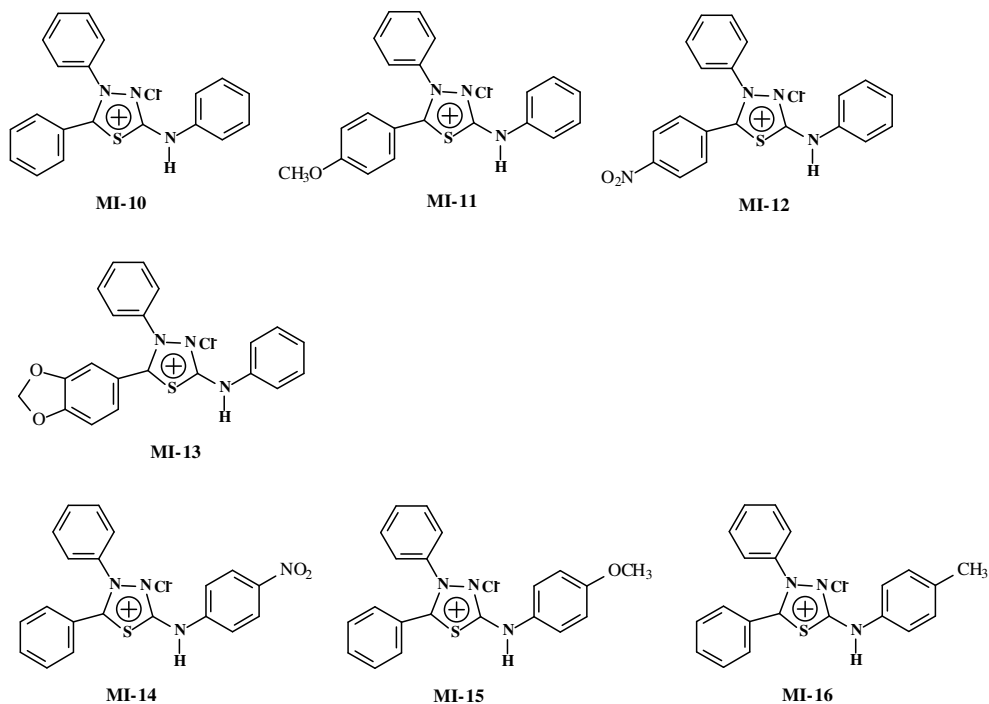
#### **4.6. Determinação do MIC de Compostos Mesoioônicos frente a Espécies do Gênero *Aspergillus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum***

Foram avaliados 16 (dezesseis) compostos da classe mesoioônicos na forma de cloridratos, **MI 1-16**, quanto a atividade antifúngica. Os cloridratos mesoioônicos avaliados neste trabalho de tese pertencem à classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas e possuem características estruturais que podem ser utilizadas para dividi-los em dois grupos, ou seja, os que possuem em sua estrutura um grupo estirila (**MI 1-9**) sendo que destes um não substituído (**MI-1**), cinco estiril-substituídos (**MI 2-5**) e quatro com substituintes no anel aromático ligado ao átomo de nitrogênio exocíclico (**MI 6-9**) (Figura 13).



**Figura 13.** Estruturas moleculares dos compostos mesoiônicos contendo o grupo estirila substituído **MI 1-9** avaliados frente aos fungos micotoxigênicos.

O segundo grupo possui em sua estrutura os substituintes no anel fenila ligado ao átomo de carbono-2 do anel heterocíclico (**MI 11-13**), substituintes no anel fenila ligado ao átomo de nitrogênio exocíclico (**MI 14-16**), além do derivado não substituído (**MI-10**). A Figura 14 mostra as estruturas dos compostos mesoiônicos substituídos com grupos fenila.



**Figura 14.** Estruturas químicas dos compostos mesoiônicos contendo o grupo fenila substituído **MI 10-16** avaliados frente aos fungos micotoxigênicos.

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica dos 16 compostos da classe mesoiônicos são mostrados na Tabela 6, revelando que *F. verticillioides* foi o fungo mais sensível à ação desses compostos. Dos 16 compostos mesoiônicos ensaiados 9 foram muito efetivos, inibindo 100% o crescimento de *F. verticillioides* com valores de MIC variando entre 7,8  $\mu\text{g/mL}$  a 125  $\mu\text{g/mL}$ . Os melhores valores de MICs nos ensaios com *F. verticillioides* incluem os mesoiônicos **MI-11** e **MI-16** com MIC = 7,8  $\mu\text{g/mL}$ , **MI-2** e **MI-3** com MIC = 15,6  $\mu\text{g/mL}$ , **MI-1**, **MI-5**, **MI-14** e **MI-15** com MIC = 31,2  $\mu\text{g/mL}$  e **MI-12** com MIC = 62,5  $\mu\text{g/mL}$ . **MI-13** foi também capaz de inibir o crescimento com MIC igual a 125  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 8). Em relação ao gênero *Aspergillus* o derivado **MI-5** teve MIC = 250  $\mu\text{g/mL}$  frente às espécies *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus*. Valores de MIC igual a 250  $\mu\text{g/mL}$  também foram determinados para os derivados **MI-13** e **MI-14** que inibiram o crescimento de *A. nomius* e *A. ochraceus*, respectivamente (Tabela 8).

Mesoiônicos como **MI-1**, **MI-2**, **MI-13** e **MI-14** tiveram atividade antimicrobiana frente a todos os fungos testados, inclusive para *P. citrinum* que teve menor sensibilidade as substâncias sintéticas avaliadas neste estudo. Em relação aos outros compostos avaliados nesses experimentos, os valores de MICs determinados foram iguais a 500  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 8).



**Tabela 8.** Concentração inibitória mínima - MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) de substâncias sintéticas da classe de compostos mesoiônicos frente a espécies do gênero *Aspergillus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum*.

Composto Mesoiónico	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>P. citrinum</i>
<b>MI-1</b>	500	500	500	500	31,2	500
<b>MI-2</b>	500	500	500	500	15,6	500
<b>MI-3</b>	500	500	>500	500	15,6	>500
<b>MI-4</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>MI-5</b>	250	250	>500	250	31,2	>500
<b>MI-6</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>MI-7</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>MI-8</b>	>500	500	>500	500	>500	>500
<b>MI-9</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>MI-10</b>	>500	500	>500	500	>500	>500
<b>MI-11</b>	500	500	500	500	7,8	>500
<b>MI-12</b>	500	500	500	500	62,5	>500
<b>MI-13</b>	500	250	500	500	125	500
<b>MI-14</b>	500	500	250	500	31,2	500
<b>MI-15</b>	500	500	>500	500	31,2	>500
<b>MI-16</b>	500	500	500	500	7,8	>500

Os valores de MICs para fungos micotoxigênicos foram determinados como descrito no documento M38-A (NCCLS, 2002a) e detalhado no item material e métodos. ITC foi utilizada como padrão de referência revelando MIC igual a 0,12  $\mu\text{g/ml}$  para espécies do gênero *Aspergillus* e *P. citrinum*. O MIC do ITC para *F. verticillioides* foi 4  $\mu\text{g/ml}$ . > 500 correspondem às substâncias que não afetaram o crescimento fúngico até a concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$ .

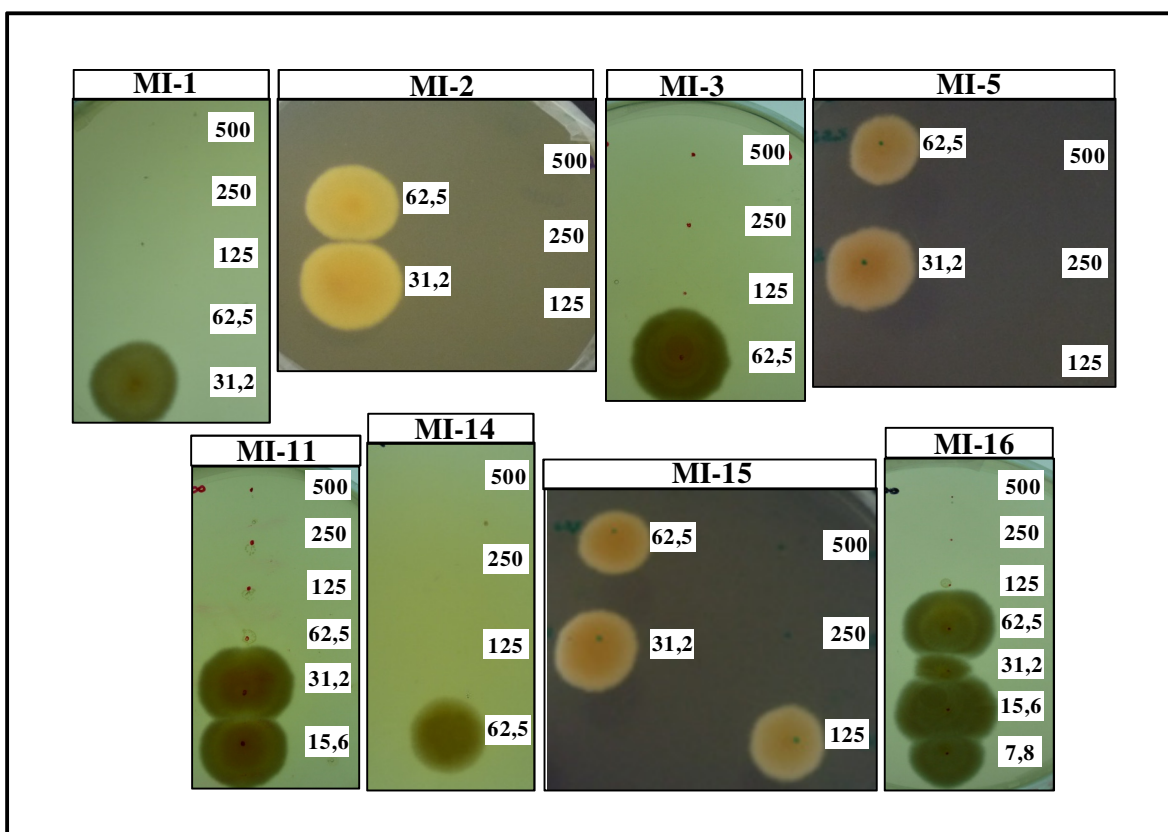
Em relação à estrutura molecular dos compostos mesoiônicos ensaiados os resultados obtidos indicaram que o grupo com maior atividade antifúngica frente *F. verticillioides* fora aqueles com grupos fenila substituídos com substituintes doadores de elétrons (**MI-11** e **MI-16**), seja ligado ao átomo de carbono-2 do anel heterocíclico ou ao nitrogênio exocíclico.

Considerando-se os compostos mesoiônicos com presença do grupo estirila, os derivados substituídos no átomo de carbono-2 (**MI-1**, **MI-2**, **MI-3** e **MI-5**) tiveram, também, boa atividade antifúngica frente *F. verticillioides*. O mesoiônico **MI-4** com substituinte na posição 2 do anel estirila, bem como aqueles substituídos no anel exocíclico (**MI-6**, **MI-7**, **MI-8** e **MI-9**) não tiveram atividade antifúngica frente aos fungos ensaiados (Tabela 8) sugerindo a importância da posição do grupo substituinte na molécula.

#### 4.6.1. Determinação do MFC de Compostos Mesoiónicos frente *F. verticillioides*

A determinação do MFC foi realizada somente com *F. verticillioides* devido aos valores de MIC obtidos frente aos compostos mesoiônicos serem indicativos de inibição efetiva. A Figura 15 mostra as fotografias das placas utilizadas para a determinação dos MFCs dos compostos mesoiônicos **MI-1**, **MI-2**, **MI-3**, **MI-5**, **MI-11**, **MI-14**, **MI-15** e **MI-16** frente a espécie *F. verticillioides*, após incubação por 2, 3 e 9 dias. Os valores de MFCs para os

fungos micotoxigênicos foram determinados como descrito por Espinel-Ingroff (2001) com modificações e detalhado em material e métodos. O efeito fungicida contra *F. verticillioides* foi determinado pela ausência de crescimento do fungo. Os valores de MFC dos compostos mesoiônicos avaliados foram 62,5 µg/mL para **MI-1** e **MI-11**, 125 µg/mL para as substâncias **MI-2**, **MI-3**, **MI-5**, **MI-14** e **MI-16** e 250 µg/mL para **MI-15**. Nossos dados indicam ação fungicida para esses 8 compostos mesoiônicos que tiveram atividade antimicrobiana para *F. verticillioides*, enquanto os outros compostos tiveram ação fungistática.



**Figura 15.** Fotografia das placas de ensaios para determinação da concentração fungicida mínima - MFC de compostos mesoiônicos. Os compostos **MI-1**; **MI-2**; **MI-3**; **MI-5**; **MI-11**; **MI-14**; **MI-15** e **MI-16** foram avaliados quanto ao MFC frente ao fungo *F. verticillioides*. As células foram submetidas ao mesmo procedimento descrito no item 3.4 para determinação do MIC. Para o cálculo da MFC, cada poço foi homogeneizado e uma alíquota de 1 µL foi adicionada em meio SDA. Após observação por 2, 3 e 9 dias a MFC foi determinada como sendo a menor concentração sem crescimento visual de colônias fúngicas.

Os resultados dos ensaios de sensibilidade dos 16 compostos mesoiônicos indicaram que essa classe de compostos é muito promissora quanto à atividade antifúngica frente aos fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário.

#### 4.7. Determinação dos Possíveis Mecanismos de Ação das Substâncias Sintéticas frente a Fungos Micotoxigênicos

As substâncias sintéticas das classes semicarbazonas e tiosemicarbazonas representam uma classe de compostos de considerável interesse científico devido às propriedades químicas e biológicas relacionadas para essas substâncias, tais como atividade

antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras. Essa classe de compostos é conhecida, também, pelas suas excelentes propriedades para formarem complexos organometálicos, comportando-se como agentes quimioterápicos.

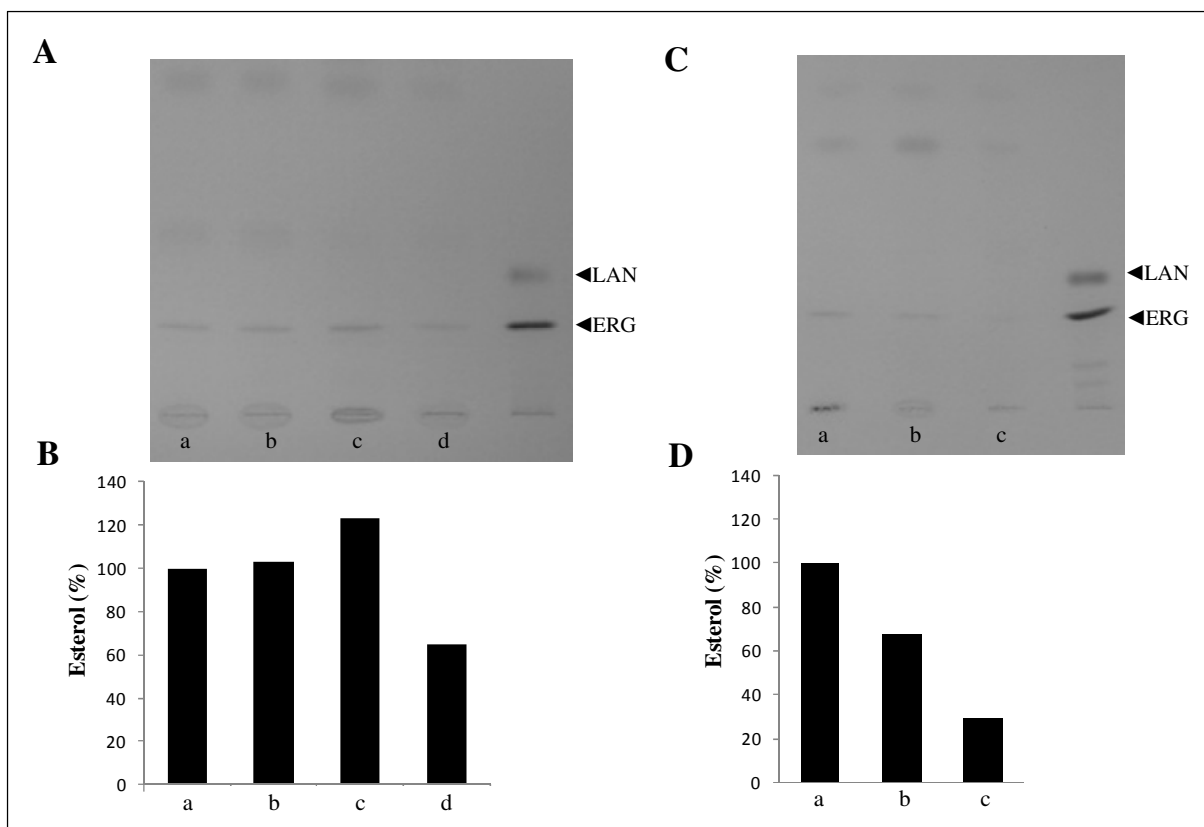
Alguns dos questionamentos realizados no início deste trabalho conduziram a respostas que permitem vislumbrar um futuro promissor a respeito do potencial de algumas substâncias sintéticas. Essas substâncias inibiram efetivamente fungos micotoxigênicos de impacto agroalimentar e na saúde humana. Assim, foram avaliadas possíveis vias de ação desses compostos visando contribuir para a elucidação de seus possíveis mecanismos de ação. Para os ensaios iniciais no qual testamos o efeito dos compostos no conteúdo de ergosterol fúngico, elegemos as substâncias que tiveram maior atividade antimicrobiana frente a diferentes fungos micotoxigênicos, como **TS-3** e **TS-6** e compostos mesoiônicos mais efetivos na inibição do crescimento fúngico. Para esse teste o efeito das tiossemicarbazonas foi ensaiado frente ao *A. parasiticus*, enquanto que, para os mesoiônicos foi utilizado *F. verticillioides*, o fungo mais sensível a esses compostos. Os outros testes foram realizados somente com a tiossemicarbazona **TS-6**, sendo os outros compostos alvos para futuros estudos.

#### **4.7.1. Efeito das tiossemicarbazonas monossubstituídas TS-3 e TS-6 no conteúdo de ergosterol de *A. parasiticus***

Outra possibilidade de ação biológica levando à morte fúngica pode envolver, como citado na Introdução, a inibição da biossíntese do lipídeo ergosterol, principal esterol constituinte da membrana celular. Assim, devido aos melhores resultados obtidos na inibição do fungo filamentoso *A. parasiticus* terem sido para as tiossemicarbazonas monossubstituídas **TS-3** e **TS-6** procedeu-se à investigação de suas ações frente ao conteúdo do ergosterol em culturas do referido fungo.

Os ensaios para avaliação dos efeitos das tiossemicarbazonas foram realizados utilizando concentrações sub-inibitórias de **TS-3** (250 e 125 µg/mL) e **TS-6** (62,5 e 31,2 µg/mL) no conteúdo de ergosterol de *A. parasiticus*. Após a extração do conteúdo lipídico das membranas de *A. parasiticus* a metodologia utilizada para a detecção e quantificação do conteúdo de ergosterol foi o HPTLC. A detecção foi realizada por comparação do R<sub>f</sub> com o ergosterol adquirido comercialmente e a quantificação através do uso do software Image J que realiza o cálculo a partir da densidade do *spot* referente ao esterol. Somente um tipo de esterol com R<sub>f</sub> similar ao ergosterol pode ser detectado por HPTLC no extrato lipídico de *A. parasiticus*. Nossos resultados mostram que ambas as tiossemicarbazonas, **TS-3** e **TS-6**, foram hábeis em alterar os níveis de ergosterol fúngico (Figura 16). No entanto, **TS-6** foi a substância mais efetiva, uma vez que reduziu o conteúdo de ergosterol fúngico em até 70% na concentração de 62,5 µg/ml. Metade desta concentração (31,2 µg/ml) foi capaz ainda de inibir em torno de 30% o ergosterol (Figura 16). A mesma inibição (~30%) foi observada para **TS-3**, porém somente quando o fungo foi incubado com 250 µg/ml deste composto. Na concentração de 125 µg/mL, **TS-3** não inibiu os níveis de esterol fúngico (Figura 16).

Observando-se os resultados mostrados na Figura 16 pode-se concluir que o conteúdo de ergosterol foi inibido tanto pela tiossemicarbazona **TS-3** quanto pela **TS-6** sendo que para **TS-6** a inibição foi de forma dependente da dose. Tais dados podem indicar que a inibição de ergosterol possa contribuir para a atividade antimicrobiana desta classe de substância sintética.



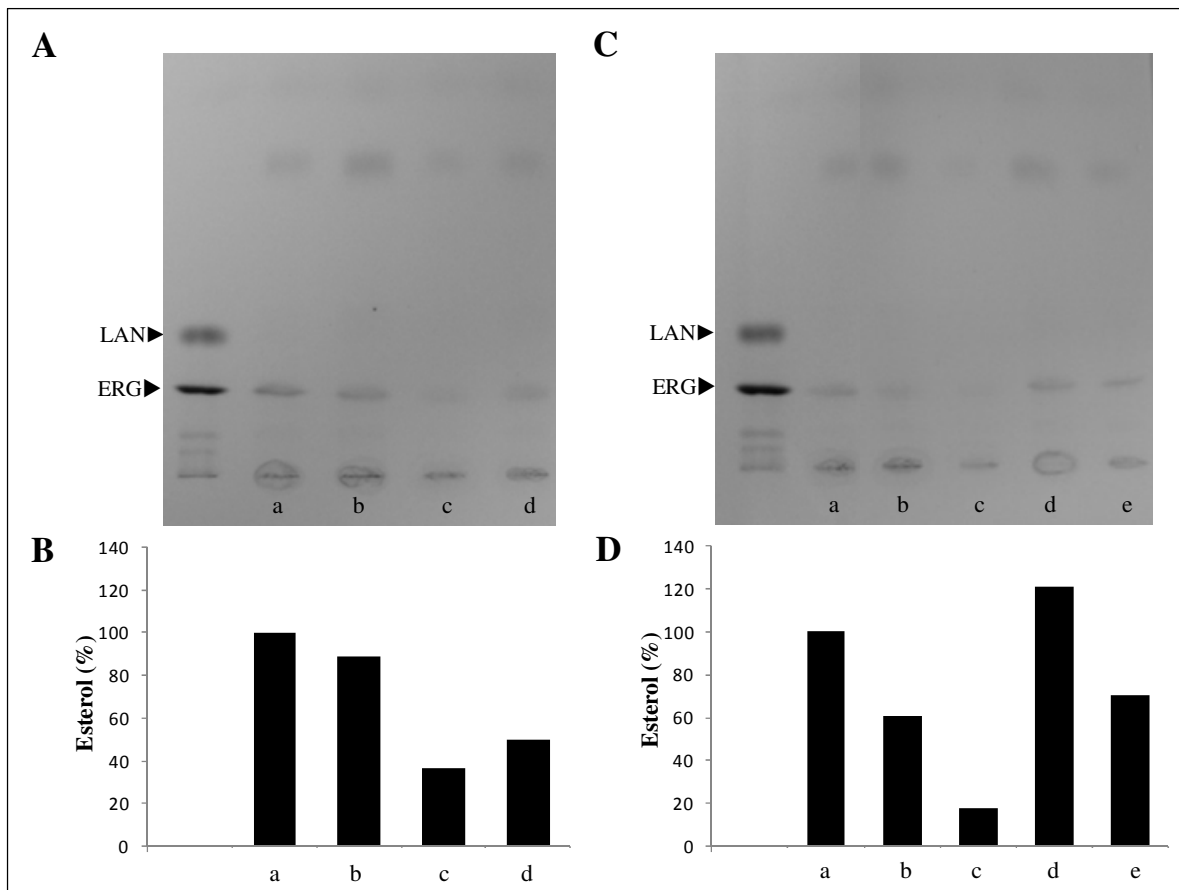
**Figura 16.** Efeito das substâncias da classe tiossemicarbazonas, **TS-3** e **TS-6** na produção de ergosterol por *A. parasiticus*. Os conídios foram incubados em meio RPMI 1640 na ausência (a) ou presença de 125 µg/mL (c) e 250 µg/mL (d) de **TS-3** (A) e 31,2 µg/mL (b) e 62,5 µg/mL (c) de **TS-6** (C) a 26 °C por 48 h. Os lipídios totais foram extraídos com uma mistura dos solventes clorofórmio e metanol como detalhado em material e métodos. Após a partição de Folch, a fase dos lipídios neutros foi recuperada e aplicada em placas de HPTLC. As placas de cromatografia foram reveladas em hexano/dietil éter/ácido acético (60:30:1,5) e os *spots* de ergosterol detectados com solução ácida de cloreto férrico. Os padrões de ergosterol (ERG) e lanosterol (LAN) foram aplicados no sistema HPTLC como indicado pelas setas. DMSO foi usado como eluente das substâncias sintéticas não alterando os níveis de ergosterol (b, painel A). A quantificação densitométrica (B e D) é correspondente a cada placa acima. A área do sistema controle obtida após análise no *software* Image J foi convertida para 100%.

#### 4.7.2. Efeito de compostos mesoiônicos MI-2, MI-11 e MI-16 no conteúdo de ergosterol de *Fusarium verticillioides*

A avaliação dos efeitos dos compostos mesoiônicos na produção de ergosterol de *F. verticillioides* foi realizada da mesma forma que para as tiossemicarbazonas frente ao fungo *A. parasiticus*. Foram avaliados os efeitos das substâncias da classe de compostos mesoiônicos **MI-16**, **MI-2** e **MI-11**, no conteúdo de ergosterol de *F. verticillioides*. Os compostos foram escolhidos em função dos menores valores de MIC determinados com essa espécie fúngica em presença das substâncias.

Os resultados apresentados na Figura 17 indicam que os compostos mesoiônicos avaliados foram capazes de inibir o conteúdo de ergosterol de *F. verticillioides*. O tratamento com 3,9 µg/mL e 7,8 µg/mL de **MI-16** diminuiu cerca de 60% e 50% o ergosterol fúngico, respectivamente (Figura 17 A, B). O composto **MI-2** reduziu o conteúdo de ergosterol em

torno de 40% na concentração de 7,8  $\mu\text{g/mL}$  e 80% na concentração de 15,6  $\mu\text{g/mL}$ . Enquanto que, a substância **MI-11** não alterou os níveis de esterol na concentração de 3,9  $\mu\text{g/mL}$ , inibindo em torno de 30% quando tratado com 7,8  $\mu\text{g/mL}$  deste composto (Figura 17 C, D).



**Figura 17.** Efeito das substâncias da classe de compostos mesoiônicos, **MI-16**, **MI-2** e **MI-11** na produção do ergosterol por *F. verticillioides*. Os conídios foram incubados em meio RPMI 1640 na ausência (a, A e C) ou presença de 3,9  $\mu\text{g/mL}$  (c) e 7,8  $\mu\text{g/mL}$  (d) de **MI-16** (A); 7,8  $\mu\text{g/mL}$  (b) e 15,6  $\mu\text{g/mL}$  (c) de **MI-2** (C) e 3,9  $\mu\text{g/mL}$  (d) e 7,8  $\mu\text{g/mL}$  (e) de **MI-11** (C) a 26 °C por 48 h. Os lipídios totais foram extraídos com uma mistura dos solventes clorofórmio e metanol como detalhado em material e métodos. Após a partição de Folch, a fase dos lipídios neutros foi recuperada e aplicada em placas de HPTLC. As placas de cromatografia foram reveladas em hexano/dietil éter/ ácido acético (60: 30: 1.5) e pontos de ergosterol detectados com solução ácida de cloreto de ferro. Os padrões de ergosterol (ERG) e lanosterol (LAN) foram aplicados no HPTLC como indicado pelas setas. DMSO:Tween:RPMI (1:1:8) usada como eluente das substâncias sintéticas não alterou os níveis de ergosterol (b, painel A). Quantificação densitométrica (B e D) correspondentes às bandas visualizadas na HPTLC. A área do sistema controle obtida após análise no *software* Image J foi convertida para 100%.

Os compostos mesoiônicos avaliados foram capazes de alterar o conteúdo de ergosterol, nas maiores concentrações testadas, indicando que a inibição do esterol possa também estar envolvida com a ação antifúngica dessas substâncias. A inibição de ergosterol por outras substâncias sintéticas já foi descrita na literatura. Guran et al. (1998) testaram o efeito de derivados químicos de ciclofosfazona, com atividade quelante, no ergosterol de

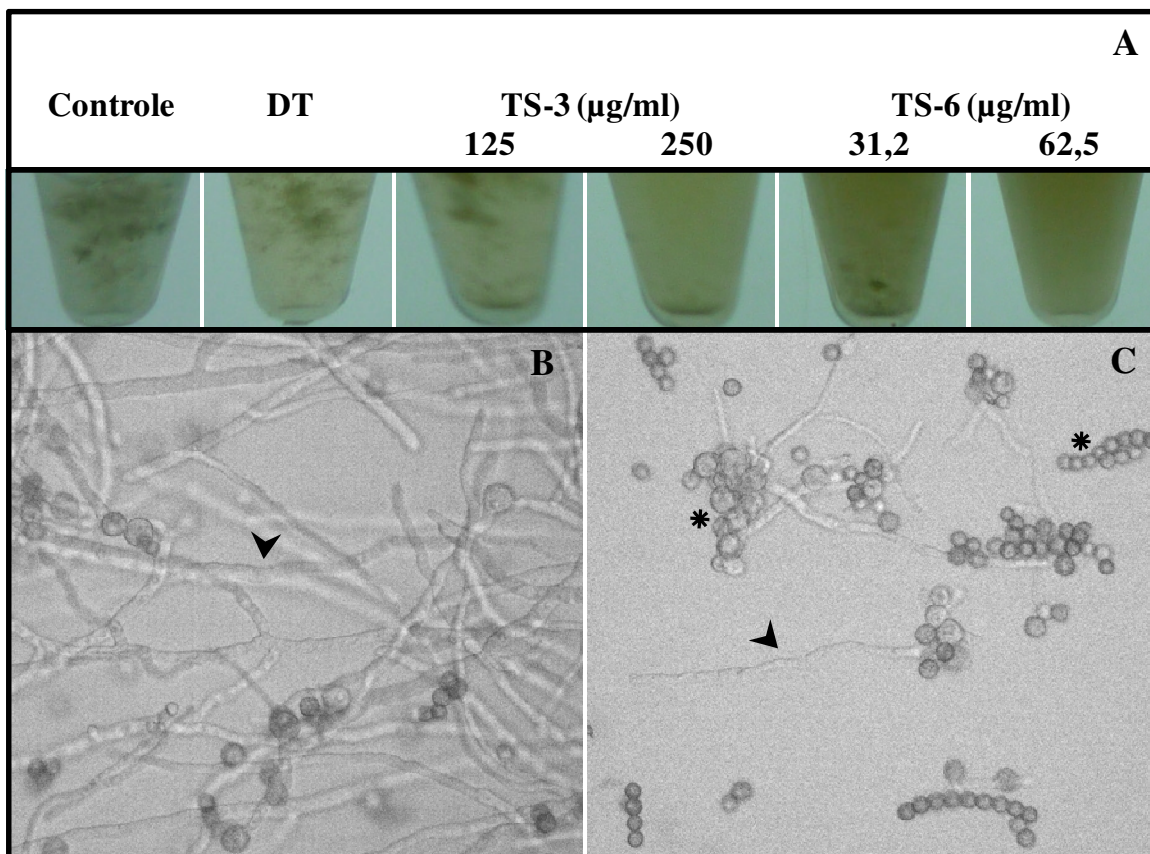
fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *A. flavus* e da levedura *C. albicans* e mostrou que tais compostos foram capazes de inibir o conteúdo de ergosterol em 66 a 98%. Desta forma, nossos dados sugerem que igualmente aos derivados de ciclofosfazona, as tiosemicarbonas podem atuar de forma similar aos antifúngicos da classe dos azóis, inibindo a biossíntese do ergosterol fúngico. De fato, a deficiência no conteúdo de esterol afeta propriedades importantes da membrana celular, levando a um aumento da fluidez e da permeabilidade de membrana, na qual a passagem seletiva de substâncias da célula é perdida, levando a uma intensa desorganização da célula fúngica, podendo ocasionar a morte (KATHIRAVAN et al., 2012).

No entanto, os dados não excluem a possibilidade que esses compostos possam interferir com outras vias metabólicas importantes para a proliferação fúngica. Experimentos adicionais precisam ser realizados para confirmação desses resultados, que possam esclarecer os mecanismos de ação dessas substâncias sintéticas com atividade antifúngica.

#### **4.8. Efeito de Tiosemicarbonas Monossustituídas TS-3 e TS-6 no Desenvolvimento do Sistema Vegetativo de *Aspergillus parasiticus***

*A. parasiticus* é um fungo filamentoso e desta forma quando conídios isolados são inoculados em meio de cultivo, ocorre a germinação dos conídios, seguida da formação de micélio. Em meio líquido/caldo essa transição morfológica é constatada através da visualização de aspecto particulado característico de crescimento vegetativo, onde aglomerados celulares são facilmente visíveis e de difícil deposição, como demonstrado na Figura 18A, para os sistemas controle e DT. A observação microscópica deste crescimento vegetativo é demonstrada na Figura 18B. Ao contrário, o crescimento de conídios, que são células unicelulares, cresce de forma semelhante a bactérias formando uma suspensão celular de aspecto homogêneo. Neste contexto, nossos dados mostraram que o tratamento do fungo com concentrações sub-inibitórias dos compostos **TS-6** (31,2 e 62,5 µg/ml) e **TS-3** (250 µg/ml) inibiu o desenvolvimento do sistema vegetativo de *A. parasiticus*, tendo crescimento em caldo característico de conídio, como mostrado na Figura 18A. Enquanto que, a concentração de 125 µg/ml de **TS-3** não inibiu a formação de hifas. Observação microscópica dos cultivos confirmou a ocorrência da inibição do desenvolvimento do sistema vegetativo de *A. parasiticus* pelas substâncias, evidenciada pela baixa formação de hifas e maior número de conídios (Figura 18C).

Nossos dados mostraram que a tiosemicarbona **TS-6** foi capaz de inibir a formação de micélio de *A. parasiticus*, o que pode bloquear o ciclo de vida deste fungo. É sabido que a produção de micotoxina está associada com a diferenciação e desenvolvimento celular, e que a maioria dos metabólitos secundários é produzida por organismos que exibem crescimento filamentoso e que apresenta uma morfologia relativamente complexa (CALVO et al., 2002). Dados na literatura mostraram que a inibição da esporulação de *A. parasiticus* também afeta a produção de aflatoxina por este fungo (REIB, 1982). Neste contexto, a habilidade do fungo em produzir micotoxinas, na fase de esporulação pode ainda ser comprometida, uma vez que a inibição do desenvolvimento do sistema vegetativo pode prejudicar o desenvolvimento do ciclo fúngico, ou seja, a germinação do conídio em micélio e de micélio em novos conídios (conídio-micélio-conídio). No entanto, estudos para avaliar a inibição de fungos micotoxigênicos por esses compostos sintéticos, bem como a relação da inibição do desenvolvimento do sistema vegetativo/germinação fúngica por **TS-6** com a produção de micotoxinas precisam ser realizados.



**Figura 18.** Efeito de **TS-3** e **TS-6** no desenvolvimento do sistema vegetativo de *A. parasiticus*. (A) Conídios foram incubados a 26 °C na ausência (controle) ou presença de concentrações sub-inibitórias de **TS-3** (125 e 250 µg/ml) e **TS-6** (31,2 e 62,5 µg/ml) em tubos contendo meio RPMI 1640, tamponado com MOPS, pH 7,0. DT corresponde ao sistema controle contendo o eluente das substâncias, DMSO:Tween 20:RPMI (1:1:8). Após 48 h de incubação foram montadas as lâminas e o material observado com aumento de 400 x em microscópio óptico Zeiss Axiostar Plus acoplado a câmera digital. O painel B é uma figura representativa da forma filamentososa (seta) correspondente aos sistemas controle e DT, enquanto o painel C é representativo da inibição da transição morfológica de conídio→micélio, mostrada pela baixa formação de hifas (seta) e maior número de conídios (asteriscos).

#### 4.9. Estudo da Atividade Quelante da Tiossemicarbazona TS-6

De modo geral pode-se dizer que tiossemicarbazonas e semicarbazonas agem, seja como inibidores de enzimas, através da complexação de metais endógenos ou através de reações de redox, seja através de interações com o ADN e da inibição da síntese do ADN. Além disso, alguns complexos metálicos desses ligantes apresentam a habilidade de mimetizar a ação de certas enzimas (BERALDO, 2004).

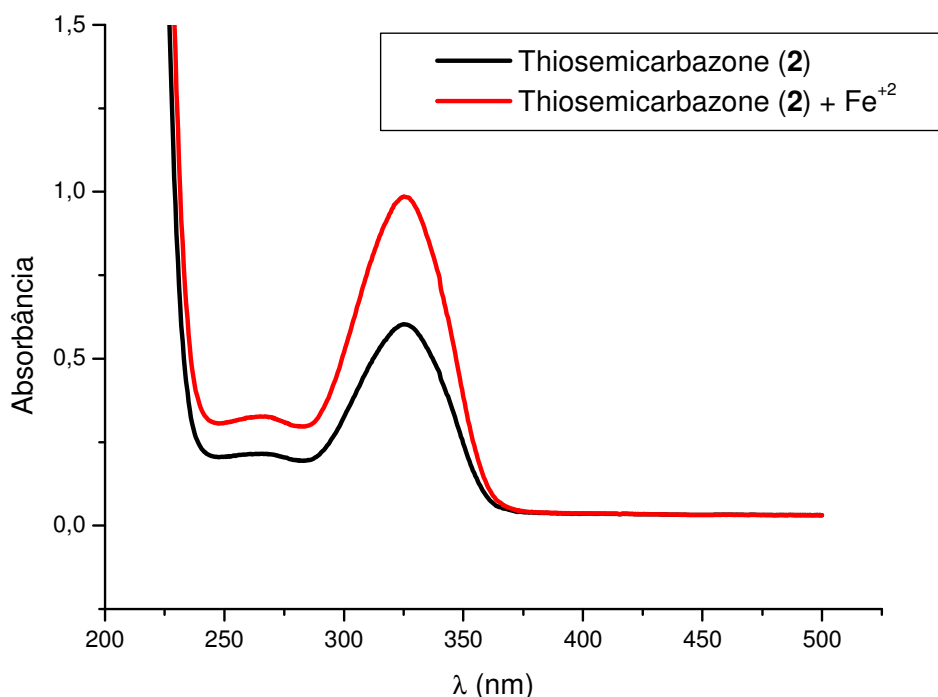
Assim, inicialmente foram realizados experimentos para avaliar a atividade quelante da substância da classe tiossemicarbazonas **TS-6** frente a íons de  $\text{Fe}^{2+}$ . A avaliação foi realizada utilizando-se a espectroscopia e, para tanto foi necessário obter os espectros de UV/Vis frente a soluções contendo íons de  $\text{Fe}^{2+}$  e **TS-6**. A avaliação da capacidade de complexação entre a tiossemicarbazona e íons de  $\text{Fe}^{2+}$  foi realizada através da espectrofotometria de UV-Vis de acordo com relatos na literatura (JUNIOR; CROUCH, 1988; FARIAS, 2009). Os espectros foram obtidos para soluções contendo **TS-6**, **TS-6-Fe<sup>2+</sup>**,

em diferentes concentrações. Após a avaliação das curvas obtidas pode-se observar que a concentração mais adequada para avaliação da formação de complexo foi de  $30 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  para a tiossemicarbazona e  $3,75 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  para o  $\text{Fe}^{2+}$ .

O efeito quelante da **TS-6** frente aos íons de  $\text{Fe}^{2+}$  foi avaliado, também, através da equação 1 (Material e Métodos) (LIM et al., 2009) e, expressos em percentuais com relação às soluções correspondentes na ausência do  $\text{Fe}^{2+}$ . A estequiometria do complexo da **TS-6** e íons de  $\text{Fe}^{2+}$  foram, também, investigados através de uma metodologia simples visando confirmar o efeito quelante desse ligante orgânico. Assim, utilizou-se o método de Mollard onde foi aplicada a equação 2 (Material e Métodos) (JUNIOR; CROUCH, 1988).

A Figura 19 mostra a superposição dos espectros de UV-Vis da **TS-6** ( $30 \mu\text{M}$ ) na ausência e presença de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $1,6 \mu\text{M}$ ). O efeito hipercrômico na absorção em 325 nm indica que houve formação de complexo sendo o efeito quelante calculado em 63,5 %. O número de coordenação obtido foi de 4, conforme esperado e relatado na literatura.

O efeito quelante de substância da classe tiossemicarbazona aos íons de  $\text{Fe}^{2+}$  foi confirmado neste estudo. Este resultado sugere a possibilidade de efeito quelante da **TS-6** frente aos íons de ferro não-heme presentes no conteúdo celular dos fungos filamentosos e, que provavelmente desenvolve interações que podem interferir no funcionamento de enzimas-chave envolvidas na síntese do DNA, conforme já relatado na literatura (BERALDO, 2004). No entanto, experimentos futuros precisam ser realizados para correlacionar o efeito quelante da substância da classe tiossemicarbazona (**TS-6**) com atividade antifúngica deste composto sobre fungos micotoxigênicos.



**Figura 19.** Espectro de UV/Vis da substância **TS-6**. Para avaliação da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  foi utilizada uma solução da tiossemicarbazona (**TS-6**) em DMSO ( $10 \text{ mM}$ ), e de sulfato ferroso em água ( $1,6 \text{ mM}$ ) para obtenção dos espectros de UV. As curvas foram obtidas em espectrofotômetro de UV/Vis na concentração de  $30 \mu\text{M}$  da tiossemicarbazona. Para análise da interação das amostras com o metal, utilizou-se solução de íons  $\text{Fe}^{2+}$  na concentração de  $3,75 \text{ mM}$ . Os espectros obtidos foram sobrepostos utilizando-se o programa Origin 8.0.



#### 4.10. Determinação *In Vitro* da Citotoxicidade da Tiossemicarbazona TS-6

A aplicabilidade de qualquer substância natural ou sintética sobre patógenos associados a sistemas celulares vivos requer avaliações quanto aos possíveis danos em nível celular e genômico (INAGAKI et al., 2007; ZHU et al., 2007). A atividade fungicida da substância sintética da classe tiossemicarbazonas, **TS-6** permite preconizar o seu uso no controle de crescimento de fungos micotoxigênicos presentes em matérias primas armazenadas. Porém, a atividade fungicida determinada, suscitou na avaliação da toxidez que esta substância poderia exercer sobre sistemas celulares eucariontes.

Na avaliação toxicológica de novas moléculas, os modelos *in vitro* têm certas vantagens intrínsecas, dado que se evitam as interferências das respostas do organismo, são versáteis, economizando tempo e dinheiro, podem ser automatizados e requerem quantidades muito pequenas do composto a ser investigado (GÁMEZ; MÁZ, 2007). Os estudos toxicológicos *in vitro* são amplamente utilizados e empregam um conjunto importante de métodos (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006); entre eles se destacam a avaliação da atividade citotóxica de substâncias através do ensaio de captação do vermelho neutro e o ensaio de redução de MTT que estão dentro dos métodos aos quais se pode utilizar para avaliar a toxidez e quantificar a viabilidade celular após exposição a substâncias tóxicas. É por estas razões que o emprego de sistemas celulares em monocamadas é uma ferramenta utilíssima para avaliar o potencial dano tóxico exercido, entre outras substâncias, por produtos naturais e sintéticos de uso médico humano e veterinário. Existem muitos alvos celulares para o dano, e geralmente, estes mecanismos convergem e produzem uma resposta celular comum. A morte celular seguirá mecanismos similares independentemente de que a causa do dano seja de natureza química, física ou biológica.

A linhagem celular Vero em particular, se adapta facilmente as condições de cultivo, o que é útil na hora de realizar a investigação de citotoxicidade. Na propagação da linhagem celular Vero, a confluência deste cultivo foi alcançada em 24-48 h após o cultivo, quando a concentração inicial aproximada foi de  $2 \times 10^5$  células/mL. Em paralelo se pode determinar o tempo de conservação das monocamadas celulares em um estado morfológico compatível com as células normais sendo estabelecido entre 20 - 28 dias de obtida a confluência, quando foram mantidas a 28 °C. A visualização realizada ao microscópio óptico durante esse tempo indicou ausência de alterações morfológicas celulares.

##### 4.10.1. Determinação da máxima concentração não citotóxica (MCNC)

A substância **TS-6** foi submetida aos estudos de toxicidade sobre as células Vero e o valor de MCNC foi determinado em 75 µg/mL conforme mostrado na Tabela 9.

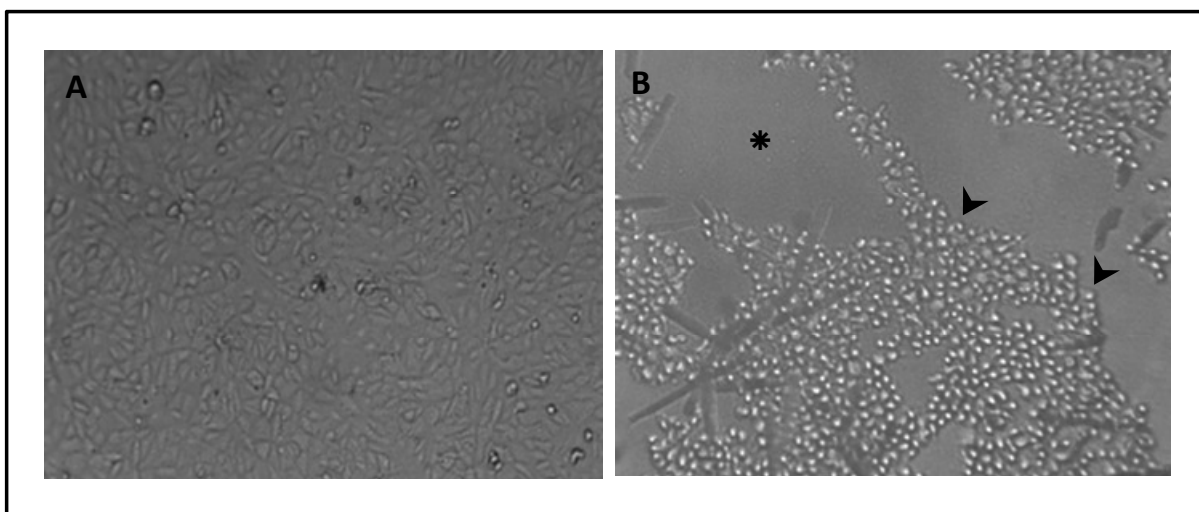
**Tabela 9.** Determinação do valor de Máxima Concentração Não Citotóxica da substância **TS-6** em células Vero.

	Concentrações de TS-6 avaliadas em sua capacidade citotóxica sobre células Vero (µg/mL)											
	10	25	50	75*	100	125	150	175	200	225	250	300
Dano celular visível	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+++	+++	+++

\*Valor que corresponde a MCNC em µg/mL utilizando visualização em microscópio.

A visualização das monocamadas tratadas indicou que a medida que a concentração de **TS-6** aumentou, o dano celular foi acentuado.

A Figura 20A exibe células Vero com morfologia normal caracterizadas nas monocamadas do sistema controle. Em contrapartida, a Figura 20B mostra monocamadas alteradas em sua morfologia como consequência do dano citotóxico exercido por **TS-6** quando utilizadas nas concentrações  $\geq$  a 175  $\mu\text{g/mL}$ . O dano celular exercido por esta tiossemicarbazona sobre as células Vero pode ser caracterizado através de células de menor tamanho, globosas, refringentes e murchas. As células se desprenderam da superfície onde estavam aderidas, gerando grupos celulares, dando uma grande descontinuidade à monocamada.



**Figura 20.** Avaliação da citotoxicidade da tiossemicarbazona **TS-6** em células Vero. As células foram crescidas em microplacas de 96 poços contendo meio MEM suplementado com 8% de SFB. Os cultivos controles e os tratados com os diferentes compostos foram mantidos em estufa a 37 °C durante 72 h, conforme detalhado em material e métodos. (A) foto representativa do cultivo celular confluinte, observado no sistema controle e em (B) células Vero tratadas com 100  $\mu\text{g/mL}$  de **TS-6**. Imagens obtidas após observação em microscópio óptico com aumento de 100 X. Setas indicam a alteração da morfologia celular com aspecto arredondado. A perda da confluência após o tratamento também foi observada, como demonstrado por asterisco.

#### 4.10.2. Determinação da concentração citotóxica 50% ( $\text{CC}_{50}$ )

É frequente encontrar mudanças morfológicas não mortais as quais são consideradas lesões reversíveis sugerindo que devem ser realizados outros estudos para evidenciar a ausência de alterações fisiológico-funcionais das células tratadas com substâncias sintéticas. Por esta razão, para elucidar se as alterações morfológicas celulares visíveis ao microscópio óptico coincidem com alterações fisiológicas, foi avaliada a citotoxicidade mediante outros métodos. Além da natureza das substâncias que são empregadas para combater os fungos micotoxigênicos, é indispensável efetuar estudos de citotoxicidade os quais fornecem dados preliminares (concentração, efeito, etc.) de grande valor para selecionar as moléculas com propriedades biológicas potenciais (POPOTA et al., 1998).

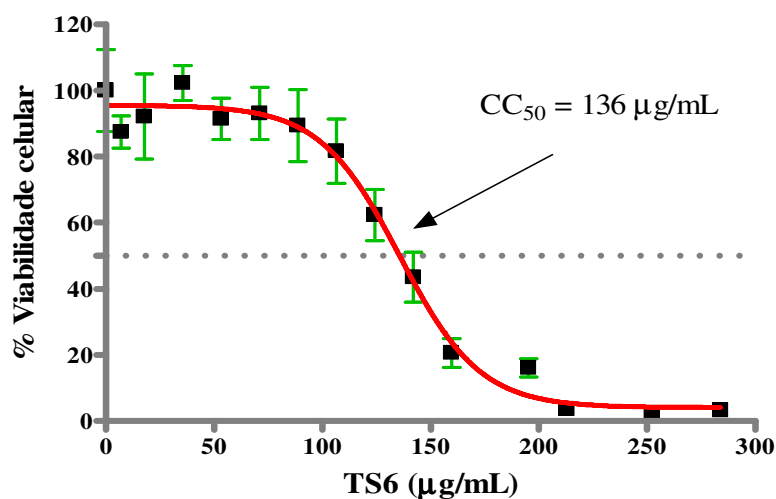
A citotoxicidade é um parâmetro que se define como: a toxidez de qualquer molécula avaliada sobre diversas linhagens celulares em cultivo (SUFFNES; DOURUS, 1982). O valor

de (MCNC) determinado em função do dano morfológico visível ao microscópio óptico é importante, porém incompleto.

#### a) Por captação do vermelho neutro (VN)

O ensaio de captação do VN é um ensaio quimiosensível que avalia a sobrevivência e viabilidade celular, baseada na capacidade das células viáveis de incorporar o VN, um corante supravital (GUTLEB et al., 2002). O VN é um corante catiônico fraco que penetra facilmente as membranas celulares por difusão não iônica, acumulando-se intracelularmente nos lisossomas onde se une com sítios aniônicos na matriz lisossomal. Alterações da superfície celular ou da membrana do lisossoma conduzem a uma fragilidade lisossomal e a outras mudanças que gradualmente se tornam irreversíveis. Tais mudanças provocadas pela ação de xenobióticos resultam em uma diminuição da captação do VN; assim, é possível distinguir células mortas, danificadas e vivas.

Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular remanescente logo após o tratamento, comparados aos valores obtidos no sistema controle. Esses valores foram utilizados para construir a curva de viabilidade celular (Figura 21) onde se observa certa relação dose-resposta de tipo linear. A  $CC_{50}$  de **TS-6**, que exerceu uma inibição de 50% sobre a viabilidade celular, foi calculada por intrapolação da curva dose-resposta e determinado um valor de 136  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 21). O valor do coeficiente de determinação  $R^2$  foi superior a 0,90 validando o método, indicando a correlação entre os pontos dos gráficos e confirmando uma relação dose-resposta.



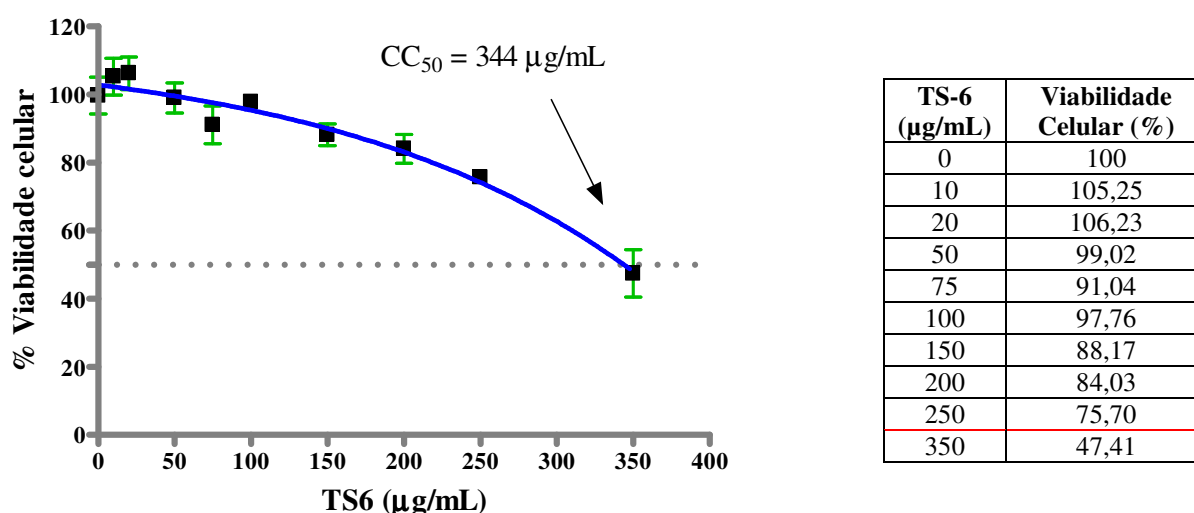
TS-6 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Viabilidade Celular (%)
0	100
10	87,46
20	92,14
35	102,29
50	91,43
75	93,08
90	89,39
105	81,64
125	62,29
140	43,49
160	20,61
195	16,05
215	3,66
250	2,24
290	3,21

**Figura 21.** Curva de sobrevivência de células Vero determinada por captação de VN após tratamento com **TS-6**. Células Vero ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo meio MEM com 8% de SFB e incubadas a 37 °C durante 24 h. As células foram tratadas durante 48 h com diferentes concentrações de **TS-6** variando de 10 a 300  $\mu\text{g/mL}$ . Após adição do VN (30  $\mu\text{g/mL}$  em MEM) a placa foi incubada a 37 °C por 3 h e a leitura realizada a 540 nm.

## b) Por redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT)

O MTT é um sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium], o qual é reduzido pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase das mitocôndrias das células vivas, dando origem a um produto (formazana) de cor azul, o qual pode ser detectado por espectrofotometria a 570 nm. Este método desenvolvido por Mosmann (1983) e modificado por Denizot e Lang (1986) tem sido muito utilizado para medir sobrevivência e proliferação celular. A quantidade de células vivas é proporcional à quantidade de formazana produzida.

A avaliação da **TS-6** mediante o ensaio de redução de MTT possibilitou a determinação do valor da  $CC_{50}$ . Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular remanescente após o tratamento comparado com os valores obtidos no sistema controle. A  $CC_{50}$  para a inibição do desenvolvimento celular foi calculada por intrapolação da curva dose-resposta e determinado um valor de 344  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 22). O valor do coeficiente de determinação  $R^2$  foi superior a 0,90 validando o método, indicando a correlação entre os pontos do gráfico e confirmando uma relação dose-resposta.



**Figura 22.** Curva de sobrevivência de células Vero determinada por redução de MTT após tratamento com **TS-6**. Células Vero ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram adicionadas em microplacas de 96 poços contendo meio MEM com 8% de SFB e incubadas a 37 °C durante 24 h. As monocamadas celulares foram tratadas durante 48 h com diferentes concentrações de **TS-6** (10 a 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Após adição de 25  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (1mg/mL em PBS 0,01 M pH 7,2), a placa foi incubada a 37 °C durante 4 h. Ao final desse período, as células foram lavadas e os cristais de formazana solubilizados em DMSO. A interpretação dos resultados foi feita após leitura a 560 nm.

Levando em consideração que as técnicas desenvolvidas são padronizadas, ensaios *in vitro* validados, e que para todas são empregadas células Vero como suporte celular, parece apropriado realizar uma análise comparativa entre os dados alcançados com esse modelo. No entanto, podemos ressaltar que por esse método também são obtidos valores extremos de toxicidade (MCNC) enquanto os outros expressam valores tóxicos médios, o que seria difícil sua comparação. Entende-se que a  $CC_{50}$  obtida, avaliada por qualquer dos dois métodos selecionados, representam um valor de toxicidade onde 50% de células estão vivas, mostra que a

MCNC indicaria um valor de concentração da substância **TS-6** na qual 100% das células permanecem viáveis e tenderiam a um comportamento similar no sistema controle.

Conforme o fundamento de cada técnica, a análise dos valores de citotoxicidade alcançados revela que no caso da utilização do corante de inclusão VN apenas a morte celular por necrose estaria sendo observada ao microscópio e, daí o menor valor obtido para o  $CC_{50}$  (136  $\mu\text{g/mL}$ ) quando utilizada a **TS-6** frente a células Vero nas condições indicadas. No caso da utilização da técnica do MTT estaria sendo revelada a concentração de **TS-6** que pode levar a morte celular tanto por necrose como por apoptose sendo necessários para 50% da soma desses eventos 344  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 10).

**Tabela 10.** Determinação de valores de MCNC e  $CC_{50}$  da substância **TS-6** por captação do VN e redução do MTT em células Vero.

Substância	Método de quantificação de dano celular		
	MCNC	$CC_{50}$ por VN	$CC_{50}$ por MTT
<b>TS-6</b>	75 $\mu\text{g/mL}$	136 $\mu\text{g/mL}$	344 $\mu\text{g/mL}$

Finalmente, na observação das Figuras 21 e 22 podemos concluir que foi demonstrada uma relação dose-resposta, já que em nenhum caso as mesmas foram lineares, por nenhum dos dois métodos colorimétricos desenvolvidos. Isto justificou a apresentação e análise dos dados como curva de tipo sigmóide e com a necessidade da análise do valor de regressão linear  $R^2$  o que, como indicado, ao valor  $>0,90$  validou todos os ensaios.

Os ensaios de citotoxicidade efetuados com **TS-6** revelaram que este composto apresenta informação muito valiosa em relação a sua futura aplicabilidade. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo contribuem para ampliar as informações sobre as atividades biológicas da substância química da classe tiossemicarbazona **TS-6**. Esta substância exerce uma ação antifúngica aceitável convertendo-a em uma candidata potencial para inibir o desenvolvimento de fungos produtores de micotoxinas que comprometem negativamente a qualidade de grãos de cereais armazenados, já que comprometem seriamente a produtividade agropecuária. Em particular está comprovado que as micotoxinas, a partir dos grãos contaminados, podem ingressar na cadeia alimentar de homens e animais.

## 5. CONCLUSÕES

Foram investigadas as atividades antifúngicas de 76 substâncias sintéticas das classes semicarbazonas, tiosemicarbazonas monossubstituídas, tiosemicarbazonas dissubstituídas, bases de Schiff e compostos mesoiônicos. Foram usados fungos micotoxigênicos de interesse agropecuário no Brasil e na Argentina, pelas perdas ocasionadas pela contaminação de alimentos. Com base nos resultados obtidos, algumas conclusões são apresentadas abaixo.

Quanto à atividade frente aos fungos micotoxigênicos:

- As semicarbazonas tiveram baixa eficácia na inibição do crescimento dos fungos micotoxigênicos avaliados;
- As tiosemicarbazonas monossubstituídas tiveram efeito fungistático sobre as espécies do gênero *Aspergillus* e uma substância teve efeito fungicida frente *F. verticillioides* sendo a **TS-6** a mais ativa;
- As substâncias tiosemicarbazonas dissubstituídas foram capazes de inibir o crescimento de *A. parasiticus* e de *C. albicans*;
- *Aspergillus parasiticus* foi a espécie mais sensível a ação de substâncias da classe tiosemicarbazonas monossubstituídas;
- As bases de Schiff tiveram atividade fungistática e uma substância teve atividade fungicida;
- As amostras fúngicas de *A. flavus*, *A. nomius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, e *F. verticillioides* foram sensíveis à classe de substância tiosemicarbazonas monossubstituídas e bases de Schiff;
- Dentre as classes de substâncias avaliadas, os mesoiônicos foram os compostos mais ativos e tiveram melhor atividade antifúngica;
- *Fusarium verticillioides* foi a espécie mais sensível frente à ação dos compostos mesoiônicos;

Quanto ao possível mecanismo de ação:

- A tiosemicarbazona monossubstituída (**TS-6**) foi capaz de inibir a biossíntese do ergosterol de *A. parasiticus*;
- Os compostos mesoiônicos (**MI-2**, **MI-11** e **MI-16**) inibiram a biossíntese do ergosterol de *F. verticillioides*;
- As substâncias tiosemicarbazonas monossubstituídas (**TS-3** e **TS-6**) inibiram o desenvolvimento do sistema vegetativo de *A. parasiticus*;
- A tiosemicarbazona **TS-6** teve efeito quelante a íons de  $Fe^{2+}$  sugerindo, indiretamente a possível interação com a enzima ribonucleotídeo redutase;
- Células Vero tiveram boa tolerância a baixas concentrações da substância **TS-6**;
- A base de Schiff **BS-7** teve atividade fungistática e fungicida, e a presença do grupo substituinte nitro no anel aromático ligado ao carbono azometínico pode ter contribuído para a atividade antifúngica;
- Os compostos mesoiônicos com os grupos fenila substituídos com substituintes doadores de elétrons, seja ligado ao átomo de carbono-2 do anel heterocíclico ou ao nitrogênio exocíclico tiveram maior atividade antifúngica;
- Os compostos mesoiônicos com o grupo estirila, os derivados substituídos no átomo de carbono-2 tiveram boa atividade antifúngica;
- Os compostos mesoiônicos com o substituinte na posição 2 do anel estirila, bem como aqueles substituídos no anel exocíclico não tiveram atividade antifúngica.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As micotoxinas vêm despertando atenção mundial devido aos efeitos adversos para a saúde e comprometimento da economia de países como o Brasil e a Argentina. Pode-se destacar a relevância do estudo do gênero *Aspergillus*, *F. verticillioides* e *P. citrinum* tendo em vista os fatores de risco na exposição do homem através de ingestão de alimentos contaminados, incluindo as vias de exposição inalatória e dérmica, que podem ocorrer na fase de colheita e outras etapas de manuseio durante a produção de alimentos. A contaminação de grãos por fungos produtores de toxinas causa um impacto negativo à economia dos países onde as práticas agropecuárias são relevantes, como no Brasil e na Argentina. As toxinas contaminantes dos grãos podem entrar na cadeia alimentar gerando sérios problemas na saúde humana e animal. Uma alternativa ao controle do desenvolvimento de fungos micotoxigênicos em grãos de cereais utilizados na alimentação poderia ser abordada em função do emprego de substâncias sintéticas da classe semicarbazonas, tiosemicarbazonas, bases de Schiff ou compostos mesoiônicos em concentrações de toxidez toleráveis.

Substâncias sintéticas são alvos de pesquisas quanto a sua ação antimicrobiana, englobando os estudos dos seus possíveis mecanismos de ação. As pesquisas direcionadas ao estudo de relações entre a estrutura molecular desses compostos e atividade biológica permitem que novas moléculas sejam sintetizadas, possibilitando a obtenção de substâncias com menor citotoxicidade. Na atualidade, a avaliação de substâncias com capacidade antifúngica frente a fungos micotoxigênicos representa uma área de grande interesse no Brasil e na Argentina. A possibilidade de pesquisar substâncias obtidas por síntese química, que possam exercer controle sobre fungos micotoxigênicos, que impactam a produção agropecuária e a saúde humana e animal, incentivam as investigações com essas classes de substâncias sintéticas.

Assim, esses resultados podem levar a uma alternativa para o controle do desenvolvimento de fungos micotoxigênicos, por exemplo, na estocagem em grãos de cereais utilizados na alimentação humana e animal, após o aprofundamento do estudo dos mecanismos de ação e, especialmente da toxidez dessas substâncias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, T. H.; YU, J. H. Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 674-677, 1998.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI, J.R. M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RESOLUÇÃO - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Disponível em: <<http://www.anvisa.com.br>>. Acesso em: 23 dez. 2011.

ARANA, S., DAGLI, M. L. Z., SABINO, M., TABATA, Y. A., RIGOLINO, M. G., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 9, p. 751-755, 2011.

BAKER, S. E.; BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. (Eds). **The Aspergilli. Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods**. New York: CRC Press, 2008. v. 26, p. 3-13.

BARBERIS, C.; ASTORECA, A.; FERNÁNDEZ-JURI, M. G.; CHULZE, S.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A. Use of propyl paraben to control growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* species on peanut meal extract agar. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 133-136, 2009a.

BARBERIS, C.; ASTORECA, A.; ASILI, R.; FERNÁNDEZ-JURI, M.G.; CHULZE, S.; MAGNOLI, C.; DALCERO, A. *In vitro* control of growth and ochratoxin A production by butylatedhydroxyanisole in *Aspergillus* section *Nigri* species. **Food Control**, v. 20, n. 8, p. 709-715, 2009b.

BENNETT, J. W.; K. E. PAPA. The aflatoxigenic *Aspergillus*. In: INGRAM, D. S.; WILLIAMS, P. A. (Eds). **Genetics of plant pathology**. London: Academic Press, 1988. v. 6, p. 264-280.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini- Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31-9, 2004.



BORENFREUND, G.; PUERNEN, A. Toxicity determined in vitro by morphological alteration and RN absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, n. 2-3, p. 119-124, 1985.  
BRASIL. Legislação sobre micotoxinas. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>. Acesso em: 28 jan. 2012.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 66, n. 3, p. 447-59, 2002.

CALORI- DOMINGUES, M. A.; FONSECA, H.; RANZINI, M. R. T. C. Effect of propionic acid on fungal growth and aflatoxin production in moist in shell groundnuts. **Revista de microbiologia**, v. 27, n. 2, p. 71-77, 1996.

CASAS, J. S.; GARCÍA-TASENDE, M. S.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 209, n. 1, p. 197-261, 2000.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, v. 47, n. 15, p. 936-942, 1987.

CARVALHO, C. A.; FERNANDES, B. C. T. M., FREIRE, R. B. Supressão da resposta imunitária humoral causada pela citrinina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 171-176, 2005.

CHATTOPADHYAY, D.; MAZUMDAR, S. K.; BANERJEE, T.; SHELDRIK, W. S. Structure of 1-(3,4-dichlorophenyl)-4-methylthiosemicarbazide. **Acta Crystallographica**, Section C: Crystal Structure Communications, v. 45, n. 2, p. 314-317, 1989.

COREY, G. **Vigilancia en epidemiología ambiental**. Serie de Vigilancia n.1. México: OPS/OMS, 1988. 193 p.

CRUZ, L. H. H. **Micologia e Micotoxicologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. 230 p.

CUNHA, S.; SILVA, T. L. One-pot and catalyst-free synthesis of thiosemicarbazones via multicomponent coupling reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 18, p. 2090-2093, 2009.

DA SILVA, E. F.; ECHEVARRIA, A.; BRAZ, V. R.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; CYSNE-FINSKELSTEIN, L.; LEON, L. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 12, p. 979-984, 2002.

DA SILVA, E. F. Síntese, parâmetros físico-químicos e avaliação biológica *in vitro* e *in vivo* de compostos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas. 2007. 138 p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2007.

DEBEBE, Z.; AMMOSOVA, T.; BREUER, D.; LOVEJOY, D. B.; KALINOWSKI, D. S.; KARLA, P. K.; KUMAR, K.; JEREBSOVA, M.; RAY, P.; KASHANCHI, F. GORDEUK, V. R.; RICHARDSON, DES R.; NEKHAI, S. Iron chelators of the di-2-pyridylketone thiosemicarbazone and 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series inhibit

HIV-1 transcription: identification of novel cellular targets-iron, cyclindependent kinase (CDK) 2, and CDK9. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 185-196, 2011.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell grow and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DILKIN, P. Micotoxíose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **O Biológico**, v. 64, n. 2, p. 187-191, 2002.

DU, X.; GOU, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002.

ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; SHIZATO, T. O.; GOMES, M. R. Síntese e atividade anti-tumoral de novos compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-triazólio-5-tiolato. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 33, n. 3, p. 274-275, 1987.

ECHEVARRIA, A.; CHUNG, K. K.; GALLEMBECK, S.; MACIEL, M. A.; MILLER, J.; RUMJANEK, V.; SIMAS, A. Mesoionic compound.3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylaminide. **Acta Crystallographica**, v. 48, n. 8, p. 1471-1474, 1992.

ECHEVARRIA, A.; NASCIMENTO, M. G.; GERÔNIMO, V.; MILLER, J.; GIESBRECHT. NMR spectroscopy, hammett correlations and biological activity of some Schiff bases derived from piperonal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 1, p. 60-64, 1999.

EHRlich, K. C.; KOBEMAN, K. B. G.; MONTALBANO, P. J., COTTY, A. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 153-159, 2007.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS.; M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, J. C.; LHUGUENOT, R.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

EL-SAYED, Y. S.; KHALIL, R. H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 7, p. 1606-1609, 2009.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determinate the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

EPAMIG. Boletim técnico: 86. 2008. Disponível em: <<http://universoagricula.com.br/index.php/cultivo-de-tilapias-em-tanquesrede-html.html>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

ESTEVES, A. S.; ECHEVARRIA, A.; SANT'ANNA, C. M. R. Estudo experimental e teórico da redução de bases de Schiff derivadas da 3,3-difenilpropilamina. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 72-75, 2004.

ESPINEL-INGROFF, A. In Vitro Fungicidal Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against Opportunistic Moniliaceous and Dematiaceous Fungi. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 32, p. 954-958, 2001.

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1997. **World regulations for mycotoxins. A compendium**. Rome: FAO Food and Nutrition Paper, 1995. n. 64, 43p.

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. "The State of World Fisheries and Aquaculture", 2006. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699e00.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2012.

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Fisheries and Aquaculture Department Statistics, 2008. Disponível em: < <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>>. Acesso em: 28 jan. 2012.

FARIAS, R. F. Química de Coordenação - Fundamentos e Atualidades. Campinas: Ed. Átomo, 2009. cap. 8, p. 353-392.

FARABI, S. M. V.; YOUSEFIA, M.; HAJIMORADLOO, A. Aflatoxicosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, sup.10, p. 234-237, 2006.

FENTEM, J. H. The use of human tissues in vitro toxicology, Summary of general discussions. **Human Experimental Toxicology**, v. 13, n. 2, p. 445-449, 1994.

FERREIRA, W. S.; LIMA, L. F.; SARAIVA, V. B.; SILVA, F. A.; PREVIATO, L. M.; PREVIATO, J. O.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, M. E. F. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: **Chemical and biological studies, Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 2707-3462, 2008.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H. F.; MONTEIRO, M. C. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. *Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 2, n. 1, p. 113-127, 2006.

FOLCH, A. J.; M. LEES.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONSECA, H. Micotoxinas. Perspectiva Latinoamericana. In: CRUZ, L. C. H. (Ed) **Investigação na prevenção e no controle fúngico**. Seropédica: EDUR. 1996. 261 p.

FONSECA, H. Os fungos e a deterioração de alimentos, 2000. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Embrapa Agroindústria Tropical. EMBRAPA: Fortaleza, 2007. [Boletim Técnico]

GALVANO, F.; RITIENE, A.; PIVA, G.; PIETRE, A. Mycotoxins in the Human Food Chain. In: DIAZ, D. E. (Ed). **The Mycotoxin Blue Book**. 1 ed. Nottingham: University Press, 2005. p. 187-224.

GÁMEZ, R.; MÁZ, R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. **Ciencias Biológicas**, v. 38, n. 3, p. 204-208, 2007.

GIMENO, A. Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en al alimentacion animal, 2000. Disponível em: <[http:// www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm](http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm)>. Acesso em: 11 dez. 2011.

GIMENO, A. Aflatoxina M1 no Leite; Riscos para a Saúde Pública, Prevenção e Controle, 2005. Disponível em: <[http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/saude/artigos/aflatoxina-leite-riscos-saude\\_3.htm](http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/saude/artigos/aflatoxina-leite-riscos-saude_3.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2011.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. 3 ed. Buenos Aires: Special Nutrients, 2011. 127 p.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana Editores. 1996. 1435 p.

GOULART, C. M. Síntese de (tio)semicarbazonas e avaliação experimental e teórica da atividade anti-corrosão. 2010. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. RJ, Seropédica. 2010.

GRYNBERG, N., GOMES, R., SHINZATO, T., ECHEVARRIA, A. MILLER, J. Some new aril-sydnonones: effects on murine tumours. **Anticancer Research**, v. 12, n. 3, p. 1025-1028, 1992.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E. Y.; MURK, A. J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, n. 3-4, p. 309-320, 2002.

GURAN, C.; BARBOIU, M.; DIACONESCU, P.; ILUC, V.; BOJIN, M.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T. Synthesis and antifungal activity of metal complexes containing dichloro-tetramorpholino-cyclophosphazatriene. **Metal-Based Drugs**, v. 5, n. 5, p. 287-294, 1998.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. WHO. World Health Organization. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, n. 56, p. 19-23, 1993.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. OCHRATOXIN A. 2005. Disponível em <<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol56/13-ochra.htm>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

INAGAKI, S.; MORIMURA, S.; GANDO, K.; TANG, Y.; AKUTAGAWA, H.; KIDO, K. Isolation of tryptophol as an apoptosis-inducing component of vinegar produced from boiled extract of black soybean in human monoblastic leukaemia U937 cells. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 371-379, 2007.

JUNIOR, J. D. I.; CROUCH, S. R. **Spectrochemical Analysis**. New Jersey: Prentice-Hall Inc, 1988. 590 p.

KARTHIKEYAN, M. S.; PRASAD, D. J.; POOJARY, B.; BHAT, K. S.; HOLLA, B.S.; KUMARI, N. S. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, n. 22, p. 7482-7489, 2006.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOITHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, n. 19, p. 5678-5698. 2012.

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

KIER, L.B.; ROCHE, E.B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **Journal Pharmacological Sciences**, v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.

KLASSEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. **The Basic Science of Poison**. Cassarett & Doull's Toxicology. New York: McGraw Hill, 5 ed. 1996. 1111p.

KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. 1 ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures Publication, 2002. 116 p.

KOIZUMI, T.; SHIRAKURA, H.; KUMAGAI, H.; TATSUMOTO, H.; SUZUKI, K. T. Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane. **Toxicology**, v. 114, n. 2, p. 125-134, 1996.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; M., COSTA, J. E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9 ed. São Paulo: Sarvier Editora, 2002. 1120 p.

LASS-FLÖRL, C.; PERKHOFER, S.; MAYER, A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. **Mycosis**, v. 53, n. 1, p. 1-11, 2008.

LASS-FLÖRL, C. *In vitro* susceptibility testing in *Aspergillus* species: an update. *Future MicroBiological*, v. 5, n. 5, p. 789-799, 2010.

LARSEN, T.; AXELSEN, J.; RAVN, H. W. Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, n. 1-2, p. 301-304, 2004.

LENNETTE, E. D.; SCHMIDT N. J. Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and chlamydial infections. 5 ed. Washington DC: American Public Health Association, 1979. cap. 3, p. 79-178.

LI, Y.; YANG, Z.; BI, Y.; ZHANG, J.; WANG, D. Antifungal effect of borates against *Fusarium sulphureum* on potato tubers and its possible mechanisms of action. **Postharvest Biology and Technology**, v. 74, p. 55-61, 2012.

LIM, T. Y.; LIM, Y. Y.; YULE, C. M. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 594-599, 2009.

LOPES, P. R. S.; RADÜNZ, N. J.; MALLMANN, C. A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F. A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 1029-1034, 2005.

LOPES, P. R. S.; POUHEY, J. L. O. F.; ENKE, D. B. S.; MALLMANN, C. A.; KICH, H. A.; SOQUETTA, M. B. Utilização de adsorvente em rações contendo aflatoxina para alevinos de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 589-595, 2009.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. **Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas**. Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. p. 213-224.

MANNING, B. Mycotoxins in Aquaculture. In: DIAZ, D. E. (Ed). **The Mycotoxin Blue Book**. 1 ed. Nottingham: University Press, 2005. p. 139-156.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>> Acesso: 20 jan. 2012.

MARGNI, R. A. Imunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5 ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 1996. 976 p.

MYCOLOGY ON LINE. Disponível em: <[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Fusarium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/)>. Acesso em: 18 fev. 2012.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

NCCLS. **Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. approved standard**. NCCLS document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002a.

NCCLS. **Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard**. NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002b.

NCCLS. **Reference Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved Standard NCCLS document M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2003.

NEWTON, C. G.; RAMSDEN, C. A. Mesoionic heterocycles. **Tetrahedron**. n. 38, p. 2965-3011, 1982.

NIERMAN, W. C.; PAIN, A.; ANDERSON, M. J.; WORTMAN, J. R.; KIM, H. S.; ARROYO, J.; BERRIMAN, M.; ABE, K.; ARCHER, D. B.; BERMEJO, C.; BENNETT, J.; BOWYER, P.; CHEN, D.; COLLINS, M.; COULSEN, R.; DAVIES, R.; DYER, P. S.; FARMAN, M.; FEDOROVA, N.; FEDOROVA, N.; FELDBLYUM, T. V.; FISCHER, R.; FOSKER, N.; FRASER, A.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, M. J.; GOBLE, A.; GOLDMAN, G. H.; GOMI, K.; GRIFFITH-JONES, S.; RYAN GWILLIAM, R.; HAAS, B.; HAAS, H.; HARRIS, D.; HORIUCHI, H.; HUANG, J.; HUMPHRAY, S.; JIMÉNEZ, J.; KELLER, N.; KHOURI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; KONZACK, S.; KULKARNI, R.; KUMAGAI, T.; LAFTON, A.; LATGE, J.-P.; LI, W.; LORD, A.; LU, C.; MAJOROS, W. H.; MAY, G. S.; MILLER, B. L.; MOHAMOUD, Y.; MOLINA, M.; MONOD, M.; MOUYNA, I.; MULLIGAN, S.; MURPHY, L.; O'NEIL, S.; PAULSEN, I.; PENALVA, M. A.; PERTEA, M.; PRICE, C.; PRITCHARD, B. L.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAWLINS, N.; RAJANDREAM, M.-A.; REICHARD, U.; RENAULD, H.; ROBSON, G. D.; CO'RDOBA, S. R.; RODRÍGUEZ-PENˆA, J. M.; RONNING, C. M.; RUTTER, S.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, M.; SANCHEZ-FERRERO, J. C.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAKEUCHI, M.; TEKAIA, F.; TURNER, G.; ALDANA, C. R. V.; WEIDMAN, J.; WHITE, O.; WOODWARD, J.; YU, J.-H.; FRASER, C.; GALAGAN, J. E.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; HALL†, N.; BARREL, B.; DENNING, D. W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1151–1156, 2005.

NOTÍCIAS AGRÍCOLAS DA REDAÇÃO. Disponível em: <<http://www.noticiasagricolas.com.br/videos/entrevistas/95522-entrevista-confira-a-entrevista-com-jose-mauricio-fernandes---pesquisador-da-embrapa-trigo.html>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 675 p.

OLLIS, W. D.; STANFORTH, S. P.; RAMSDEN, C. A. Heterocyclic mesomeric betaines. **Tetrahedron**, v. 41, n. 12, p. 2239-2329, 1985.

OPLETALOVÁ, V.; KALINOWSKI, D. S.; VEJSOVÁ, M.; KUNES, J.; POUR, M.; JAMPÍLEK, J.; BUCHTA, V.; RICHARDSON, D. R. Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: cellular iron chelation mediating cytotoxic activity. **Chemical Research Toxicology**, v. 21, n. 9, p. 1878-1889, 2008.

PALUMBO, J.; O'KEEFFE, T.; MAHONEY, N. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. **Mycopathologia**, v. 164, n. 5, p. 241-248, 2007.

PANICO, R.; POWELL, W. H.; RICHER, J. C. IUPAC - **Nomenclature of organic compounds**. London: Blackwell Scientific Publications, 1993. 190 p.

PASSONE, M. A.; RESNIK, S.; ETCHEVERRY, M. G. Antiaflatoxic property of food grade antioxidants under different conditions of water activity in peanut grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 8-14, 2007.

POPOTA, J.; AGUILAR, A.; ALONSO, D.; VILLAREAL, M. L. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, n. 3, p. 173-177, 1998.

PUJOL, C. A. Actividad antiviral y mecanismos de acción de polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de las algas *Notogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*. 1995. 102 p. Tesis Doctoral Facultad Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Buenos Aires. Argentina. 1995.

REIB, J. Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B1 under the influence of conidiogenesis affecting compounds. **Archives of Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 236-238, 1982.

REPETTO, M. **Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad *in vitro***. 3 ed. Sevilla: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group, 2002. p. 303-305.

RIBEIRO, J. M. M.; CAVAGLIERI, L. R.; VITAL, H. C.; KRUGER, C. D.; ROSA, C. A. da R. Radiação gama sobre a microbiota de ração avícola e *Aspergillus* spp. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1452-1458, 2009.

RODRIGUES, R. F.; DA SILVA, E. F.; ECHEVARRIA, A.; FAJARDO-BONIN, R.; AMARAL, V. F.; LEON, L. L.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M. A comparative study of mesoionic compounds in *Leishmania* sp. and toxicity evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1039-1043, 2007.

RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, M. C.; TOURÓN-TOUCEDA, P.; CAO, R.; GARCÍA-DEIBE, A. M.; PELAGATTI, P.; PELIZZI, C.; ZANI, F. Complexes of 2-acetyl-c-butyrolactone and 2- furancarbaldehyde thiosemicarbazones: Antibacterial and antifungal activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 1, p. 35-42, 2009.

ROSA, C. A. da R.; RIBEIRO, J. M. M.; FRAGA, M. J.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L. R.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M.; LOPES, C. W. G. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 12, p. 85-96, 2006.

RYDER, N. S.; FRANK, I.; DUPONT, M-C. Ergosterol Biosynthesis Inhibition by the Thiocarbamate Antifungal Agents Tolnaftate and Tolciclate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 29, n. 5, p. 858-860, 1986.

SABINO, M. A micotoxicologia na américa latina: passado e presente. Disponível em: <<http://mycotoxins.com.br/micotoxicologia.htm>>. Acesso em: 02 mar. 2013.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ, D. E. (Ed). **The Mycotoxin Blue Book**. 1 ed. Nottingham: University Press, 2005. p. 225-234.



SEKIGUCHI, J.; GAUCHER, G. M. Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 147-158, 1977.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; VEIGA, S. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study. **Anti-Cancer Drugs**, v. 15, n. 3, p. 269-275, 2004.

SPESIA, M. Aceite esencial de *Minthostachys verticillata*: Su acción sobre la replicación del virus Herpes suis tipo 1 en células Vero. 2004. 69 p. Tesis de Grado Biblioteca Central de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. 2004.

SHINZATO, T. O.; GRYNBERG, N. F.; GOMES, M. R.; ECHEVARRIA, A.; MILLER, J. Antitumour activity of new mesoionic compounds against three murine tumours. **Medical Science Research**, v. 17, n. 1, p. 865-866, 1989.

SHIM, W-B.; WOLOSHUK, C. P. Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1607-1612, 2001.

SILVA, C. M.; SILVA, D. L.; MODOLO, L. V.; ALVES, R. B.; RESENDE, M. A.; MARTINS, C. V. B.; FÁTIMA, Â. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2011.

SINGH, A.; SINGH, S.; SINGH, T. D.; SINGH, V. P.; PANDEY, V. B.; SINGH, U. P. Fungal spore germination inhibition by alkaloids dehydrocorydalmine and oxyberberine. **Journal of Plant Protection Research**, v. 49, n. 3, p. 287-289, 2009.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISITICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 107-112, 1990.

SUFFNES, M.; DOURUS, J. Current status of the NCI plant and animal product program. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 1, p. 1-14, 1982.

SUAAD, S. A.; NASSER, A. L. Microbial Contamination and Mycotoxins from Nuts in Riyadh, Saud Arabia. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 8, p. 613-630, 2011.

SOARES, R. M. A.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W.; ALVIANO, C. S. Carbohydrate and lipid components of hyphae and conidia of human pathogen *Fonsecaea pedrosoi*. **Mycopathologia**, v. 132, n. 2, p. 71-77, 1995.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. 752 p.

TAO, L.; YU, J. H. AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development". **Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 313-326, 2011.

TENÓRIO R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

TORRES, A. M.; RAMIREZ, M. L.; ARROYO, M.; CHULZE, S. N.; MAGAN, N. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 319-324, 2003.

TURNER, P. C.; FLANNERY, B.; ISITT, C.; ALI, M.; PESTKA, J. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. **Nutrition Research Reviews**, v. 25, n. 2, p. 162-179, 2012.

VANELLA, J. Cultivos de tejido en virología. Preparación de antígenos y sueros. Fijación del complemento. In: VANELLA, J. (Ed). **Procedimientos y técnicas del laboratorio de virus**. Instituto de Virología. Universidad de Cs. Médicas Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 1964. v. 2, 187 p.

VARGA J.; KOCSUBÉ, S.; PÉTERI, Z.; VÁGVÖLGYI, C.; TÓTH, B. Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1718-1750, 2010.

VIEIRA, V. L. P.; NETO, J. R.; LOPES, P. R. S.; LAZZARI, R.; FONSECA. M. B.; MENEZES, C. C. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 49-55, 2006.

WYATT, R. D. Mycotoxin Interactions. In: DIAZ, D. E. (Ed). **The Mycotoxin Blue Book**. 1 ed. Nottingham: University Press, 2005. p. 269-278.

YILDIRIM, I., YAPICI, B. M. Inhibition of conidia germination and mycelial growth of *Botrytis cinera* by some alternative chemicals. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 8, p. 1294-1300, 2007.

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, n. 4, p. 194-202, 2005.

ZACCHINO, S. A. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds). **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 435-479.

ZAREMBER, K. A.; CRUZ, A. R.; HUANG, C. Y.; GALLIN, J. I. Antifungal activities of natural and synthetic iron chelators alone and in combination with azole and polyene antibiotics against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2654-2656, 2009.

ZHU, J. Y.; LAVRIK, I. N.; MAHLKNECHT, U.; GIAISI, M.; PROKSCH, P.; KRAMMER, P. H.; LI-WEBER, M. The traditional Chinese herbal compound rocaglamide preferentially induces apoptosis in leukemia cells by modulation of mitogen-activated protein kinase activities. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1839-1846, 2007.