

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**Avaliação da Atividade Antibacteriana do Actinomiceto Endofítico R18(6)
Contra Bactérias Gram-Negativas Multirresistentes.**

TIELE DA SILVA CARVALHO
Farmacêutica - UFRGS

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**Avaliação da Atividade Antibacteriana do Actinomiceto Endofítico R18(6)
Contra Bactérias Gram-Negativas Multirresistentes.**

TIELE DA SILVA CARVALHO
Farmacêutica-UFRGS

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre na Área de Microbiologia Ambiental.

Orientador(a): Dr^a. Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho ao longo destes anos, por me dar sabedoria e entendimento.

À minha família, por todo amor, carinho e paciência, por sempre estarem presentes me apoiando e incentivando. Ao meu pai e à minha mãe, por sempre estarem dispostos a me levar no laboratório nos finais-de-semana e feriados. À minha irmã Patrícia, pela ajuda nos experimentos. Ao meu irmão Diego, pelas conversas e incentivo.

À minha orientadora, Dr^a Sueli Van Der Sand, por acreditar no meu potencial, pela paciência, carinho e dedicação ao longo do trabalho.

Aos colegas do laboratório 164 e 209, pelas risadas, conversas, dicas e auxílio nos experimentos. À Daniele, pela amizade e por todos os ensinamentos. À Marcela, pelo compartilhamento dos agitadores, estufas e materiais.

À Dr^a Ana Lúcia Souza Antunes do Laboratório de Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS, por ter cedido as amostras clínicas.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

AValiação DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ACTINOMICETO ENDOFÍTICO R18(6) CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS MULTIRRESISTENTES.¹

Autor: Tiele da Silva Carvalho

Orientador: Dr^a. Sueli Van Der Sand

RESUMO

As bactérias Gram-negativas das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae são os patógenos mais comumente isolados de infecções. Devido ao crescente aparecimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis para terapêutica, a busca de novos compostos tornou-se eminente, principalmente oriundos de fontes naturais cultiváveis. Os actinomicetos são uma das principais fontes de metabólitos secundários com atividade antibacteriana. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do actinomiceto endofítico R18(6) em produzir metabólitos ativos contra bactérias Gram-negativas multirresistentes. Para isto, utilizou-se o teste de dupla camada para avaliar a capacidade de produção de metabólitos ativos pelo actinomiceto. As condições de cultivo, como fontes de carbono, temperatura, pH, modo de incubação e tempo de incubação do isolado, sob cultura submersa, foram otimizadas. A atividade antimicrobiana do isolado foi avaliada a cada 24 horas durante 10 dias utilizando a técnica de difusão em poço, na qual foram medidos os halos de inibição. O actinomiceto mostrou melhor atividade contra as bactérias Gram-negativas testadas quando cultivado em meio base contendo glicose como fonte de carbono, pH ajustado para 6.5, incubação a 30°C sob agitação constante durante 96 horas. No ensaio de concentração inibitória mínima do extrato bruto, esta variou entre 1/32 e 1/256, e mostrou atividade bactericida ou bacteriostática de acordo com o isolado Gram-negativo. O extrato ativo foi avaliado quando à sua estabilidade térmica e enzimática, o qual se apresentou estável a altas temperaturas e instável às enzimas proteolíticas. O extrato bruto foi submetido à extração com solventes e a acetona mostrou-se eficiente como solvente extrator. A micromorfologia do isolado foi observada em microscopia óptica e de varredura, nos quais apresentou características semelhantes ao gênero *Streptomyces*. O actinomiceto endofítico R18(6) mostrou ser uma nova fonte promissora para a produção de compostos ativos contra bactérias Gram-negativas multirresistentes.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2014.

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC ACTINOMYCETE R18(6) AGAINST GRAM-NEGATIVE BACTERIA MULTI-DRUG RESISTANT.¹

Author: Tiele da Silva Carvalho

Supervisor: Dr. Sueli Van Der Sand

ABSTRACT

Gram-negative bacteria of the Enterobacteriaceae and Pseudomonadacea family are the most common pathogens isolated from infections. Due to the increase of microorganisms resistant to antimicrobial agents available for treatment, the search for new compounds, mainly from natural and culturable sources, has become an important issue. The actinomycetes are a major source of secondary metabolites with antibacterial activity. The aim of this work was to evaluate the potential production of active metabolites by the endophytic actinomycete R18(6) against Gram-negative bacteria multiresistant. For this, the double layer method was used to assess the ability of production of active metabolites by the isolate. Based on this assay the culture condition growth of the isolate in submerged culture was optimized. For that as carbon source, temperature, pH, incubation way and incubation time were tested looking for a better metabolite production. The antimicrobial activity of the isolate was evaluated every 24 hours for 10 days by the well diffusion assay, where the inhibition halo was measured. The actinomycete showed the best activity against Gram-negative bacteria when cultured in base medium supplemented with glucose, adjusted in pH 6,5, incubation temperature of 30°C for 96 hours with agitation. In the microdilution assay the concentration of crude extract varied from 1/32 to 1/256, and it showed bactericidal or bacteriostatic activity according to Gram-negative tested isolate. The thermal and enzymatic stability of crude extract were evaluated, where it exhibited thermal stability in high temperature and it was unstable to proteolytic enzymes. The crude extract was subjected to solvent extraction and acetone was efficient as extractor solvent. The isolate showed similar characteristics of the genus *Streptomyces* when evaluated by optical and scanning microscopy. The endophytic actinomycete R18(6) showed to be a new and a promising source of active metabolites production against Gram-negative bacteria multidrug resistant.

¹Master Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, March, 2014.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	VIII
RELAÇÃO DE FIGURAS	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Actinomicetos.....	4
2.2 Actinomicetos endofíticos.....	5
2.3 Gênero <i>Streptomyces</i>	7
2.4 Metabolismo secundário	9
2.5 Antimicrobianos.....	10
2.6 Mecanismos de Resistência Bacteriana	12
2.7 Família Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Amostras	21
3.1.1 Actinomiceto endofítico	21
3.1.2 Isolados Gram-negativos de origem ambiental e clínica.....	21
3.2 Perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos a antimicrobianos	22
3.3 Avaliação da atividade do actinomiceto R18(6) pelo ensaio de dupla camada	23
3.4 Produção do extrato bruto.....	24
3.5 Teste de antibiose por difusão em poço	24
3.6 Otimização das condições de cultivo do extrato bruto para a produção de metabólito(s) ativo(s).....	25
3.6.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono	25
3.6.2 Avaliação de diferentes temperaturas e métodos de incubação	26
3.6.3 Avaliação do pH do meio de cultivo e do tempo de incubação	26
3.7 Análise Estatística.....	27
3.8 Curva de crescimento do actinomiceto endofítico	27
3.9 Curva de variação do pH no meio de cultivo	28
3.10 Concentração inibitória mínima (CIM)	28
3.11 Caracterização parcial do(s) metabólito(s) ativo(s)	29
3.11.1 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas	29
3.11.2 Termoestabilidade.....	30
3.12 Extração de metabólitos ativos	31
3.13 Microcultivo do actinomiceto	32
3.14 Microscopia eletrônica de varredura	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos a antimicrobianos	34

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do actinomiceto R18(6) no ensaio de dupla camada.....	37
4.3 Otimização das condições de cultivo do isolado R18(6) para a produção do(s) metabólito(s) ativo(s).....	39
4.3.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono	39
4.3.2 Avaliação de diferentes temperaturas e métodos de incubação	41
4.3.3 Avaliação do pH do meio de cultivo e do tempo de incubação	43
4.4 Curva de crescimento do actinomiceto endofítico	48
4.5 Curva de variação do pH no meio de cultivo	49
4.6 Concentração inibitória mínima (CIM)	50
4.7 Caracterização parcial do(s) metabólito(s) ativo(s)	53
4.7.1 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas	53
4.7.2 Termoestabilidade	54
4.8 Extração de metabólitos ativos	56
4.9 Microcultivo do actinomiceto	58
4.10 Microscopia eletrônica de varredura	58
5. CONCLUSÃO	60
6. PERSPECTIVAS	61
7. REFERÊNCIAS	62
8. APÊNDICES	79

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Isolados Gram-negativos ambientais e clínicos utilizados neste trabalho	22
Tabela 2. Isolados Gram-negativos utilizados para avaliação da concentração inibitória mínima do extrato bruto	29
Tabela 3. Solventes utilizados para o processo de purificação parcial do(s) composto(s) ativo(s)	31
Tabela 4. Perfil de susceptibilidade dos isolados Gram-negativos aos antimicrobianos	35
Tabela 5. Isolados Gram-negativos multirresistentes selecionados para os ensaios de otimização das condições de cultivo para produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6)	37
Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação da atividade do actinomiceto R18(6) através do ensaio da dupla camada	38
Tabela 7. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) após adição de diferentes fontes de carbono ao meio base	40
Tabela 8. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes temperaturas de incubação	42
Tabela 9. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes modos de incubação	43
Tabela 10. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes faixas de pH.....	44
Tabela 11. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes tempos de incubação	45
Tabela 12. Avaliação da atividade do extrato bruto otimizado frente a todos os isolados Gram-negativos selecionados	47
Tabela 13. Resultados da concentração inibitória mínima em 24 horas de crescimento	52

Tabela 14. Avaliação da atividade do precipitado formado a partir da extração com acetona	57
---	----

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1. Curva de crescimento do actinomiceto R18(6) durante 240 horas em meio base contendo 1% de glicose, ajustado ao pH 6.5 e incubado a 30°C com agitação de 100 r.p.m. 48
- Figura 2. Curva de variação do pH no meio de cultivo durante 10 dias de incubação em meio base contendo 1% de glicose, a 30°C e com agitação de 100 r.p.m. 49
- Figura 3. Curva de atividade residual obtida no teste de termoestabilidade do extrato bruto do actinomiceto R18(6) no intervalo de temperatura entre 30°C e 90°C com avaliação sendo realizada nos intervalos de tempo de 15 e 30 minutos. 55
- Figura 4. Visualização do microcultivo do actinomiceto R18(6) em microscópio óptico (40x). 58
- Figura 5. Visualização do microcultivo do actinomiceto R18(6) em microscópio eletrônico de varredura. 59

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, diversos tipos de compostos antimicrobianos têm surgido no mercado mundial. Apesar de terem sido descobertos com o intuito de curar patologias, o uso incorreto desses medicamentos tem selecionado cepas resistentes de micro-organismos dificultando, assim, o tratamento. Com isso, a busca de novas moléculas ativas contra micro-organismos multirresistentes tornou-se importante.

Durante a década de 1930, a primeira classe de antimicrobianos sintéticos, as sulfas, foi introduzida no mercado para o tratamento de infecções sistêmicas. Com a descoberta da penicilina, observou-se que fontes naturais têm grande potencial para a produção de compostos ativos. Com isso, um novo nicho de pesquisa surgiu: a busca de novos metabólitos provenientes de fontes naturais. Até a década de 1970, diversas classes de antimicrobianos foram isoladas de micro-organismos, porém, após este período, a descoberta de novos compostos ativos foi reduzindo gradualmente.

Devido ao grande uso de antimicrobianos, diversos casos sobre a resistência de micro-organismos aos compostos atualmente utilizados na clínica têm sido reportados. As principais causas de resistência são o uso indevido e extenso dos antimicrobianos, aumento do número de pacientes

imunocomprometidos e a administração de antimicrobianos de amplo espectro para patologias, muitas vezes, não diagnosticadas corretamente. Até o século XX, a resistência bacteriana era restrita a ambientes hospitalares. Nos dias atuais, a resistência bacteriana está presente em diversos ambientes, inclusive em indivíduos saudáveis. Os antimicrobianos não afetam apenas os micro-organismos patogênicos, mas também a microbiota normal do organismo humano. Dentre muitas razões que justificam a necessidade de novas pesquisas e a descoberta de novos antimicrobianos, está o fato de que as infecções bacterianas são a segunda maior causa de mortalidade mundial.

Atualmente, a descoberta de novos antimicrobianos não se restringe apenas a novas moléculas, mas também a novos mecanismos de ação e a novas fontes de compostos. A principal e mais reconhecida fonte natural de antimicrobianos são os actinomicetos. Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas que habitam principalmente o solo, mas podem também ser isolados de tecido vegetais, os quais são denominados endofíticos. Desde 1940, quando o primeiro antimicrobiano produzido por actinomicetos foi descoberto, estima-se que mais de 3.000, dos compostos conhecidos, sejam provenientes desse grupo e que 90% destes sejam derivados do gênero *Streptomyces*. Os *Streptomyces* são bactérias mundialmente conhecidas pela capacidade de produção de diversos compostos ativos, oriundos do metabolismo secundário.

Devido ao desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos frente aos compostos antimicrobianos disponíveis para terapêutica, a importância da descoberta de novos compostos ativos é eminente. Compostos ativos provenientes de fontes naturais cultiváveis e viáveis economicamente

são de grande importância para a indústria farmacêutica. A descoberta de compostos com novo mecanismo de ação ou cuja ação está voltada para grupos específicos de bactérias, como, por exemplo, bactérias Gram-negativas, também é relevante.

Com isso, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial do actinomiceto endofítico R18(6) de produzir metabólitos ativos contra bactérias Gram-negativas de origem clínica e ambiental.

Como objetivos específicos têm-se: i) avaliar o perfil de resistência dos isolados clínicos e ambientais; ii) otimizar as condições de cultivo (fonte de carbono, temperatura, pH, modo de cultivo e tempo de incubação) do actinomiceto para produção de metabólito(s) ativo(s); iii) caracterizar, parcialmente, os metabólitos ativos com relação à estabilidade frente a enzimas proteolíticas e variações de temperatura; iv) purificar o extrato bruto; e v) caracterizar micromorfologicamente o actinomiceto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Actinomicetos

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, filamentosas, com elevado conteúdo de bases guanina e citosina em seu DNA (Lechevalier & Lechevalier, 1967). Estes estão presentes em diversos habitats, como, por exemplo, aquático, vegetal e solo (Williams et al., 1989; Selvakumar, 2010; Li et al., 2011)

Estes micro-organismos exibem uma ampla variedade morfológica e metabólica e são uma das principais fontes naturais de antibióticos (Nett et al., 2009). Sua versatilidade morfológica é representada pelas estratégias reprodutivas que englobam diferentes estruturas de formação de esporos (artrosporos, endosporos, zoosporos e aleuriosporos), e pelas características coloniais e miceliais (Ensign, 1978; Williams et al., 1989). Já a sua versatilidade metabólica é representada pela produção de diversos compostos a partir do metabolismo secundário e pela habilidade de utilizar diferentes fontes de carbono e de energia (Kennedy, 1999).

Os actinomicetos são responsáveis pela produção de mais de 60% dos metabólitos microbianos conhecidos até 2000 (Sosio et al., 2000) e uma fração significativa (de 5 a 10%) de seu genoma é utilizado para a produção destes metabólitos (Baltz, 2008). Dentre os compostos ativos produzidos, destacam-se os antimicrobianos. Desde 1940, quando o primeiro

antimicrobiano foi isolado do gênero *Streptomyces*, os actinomicetos tornaram-se os principais produtores de compostos ativos. Esta classe de microorganismos também se destaca na produção de antifúngicos (Xiong et al., 2013; Wu et al., 2014), antitumorais (Zabala et al., 2013; Wang et al., 2014) e enzimas extracelulares (Sharma et al., 2012; Brito-Cunha et al., 2013; Su et al., 2014).

2.2 Actinomicetos endofíticos

Os actinomicetos são importantes membros da rizosfera possuindo grande influência no crescimento de vegetais, protegendo as raízes de microorganismos patogênicos e de fatores ambientais (Hasegawa et al., 2006). Algumas espécies são conhecidas por manterem uma associação com tecidos vegetais, sendo denominadas como actinomicetos endofíticos (Crawford et al. 1993). Hallmann et al. (1997) definem como endofítico qualquer microorganismo que pode ser isolado da superfície desinfectada de tecidos vegetais ou do interior da planta. Os actinomicetos podem ser isolados de diversas partes do vegetal, mas sua maior concentração encontra-se nas raízes (Tian et al., 2004; Hasegawa et al., 2006).

O micro-organismo endofítico recebe nutrientes e protege a planta hospedeira, estabelecendo uma relação simbiótica (Tan & Zou, 2001). Essa associação e o conseqüente benefício à planta podem ser resultados da produção, pelo actinomiceto endofítico, de compostos secundários (fitohormônios, antibióticos e sideróforos) que agem diretamente no metabolismo do vegetal ou afetam os organismos patogênicos por antibiose ou competição (Hasegawa et al., 2006). Cheplick et al. (1989) relataram que

plantas infectadas por endofíticos possuem um crescimento mais rápido do que as plantas não infectadas, devido à produção, por estes, de fitohormônios como o ácido 3-indol-acético, citoquinas e outros promotores de crescimento. Essa melhoria do crescimento pode ocorrer, também, em consequência do aumento de absorção de nutrientes como nitrogênio e fósforo, por exemplo. Devido ao fato de esses micro-organismos estarem associados a plantas, Castillo et al. (2007) estimaram que os compostos produzidos sejam atóxicos para as células eucarióticas.

Os actinomicetos endofíticos são considerados importantes produtores de metabólitos secundários com aplicações úteis na medicina humana e animal, e na agricultura (Tian et al., 2004; Janso & Carter, 2010). A produção de novos compostos antimicrobianos destacou-se nos últimos anos. Diversos *Streptomyces* endofíticos foram isolados de vegetais os quais apresentaram produção de novos antimicrobianos como coronamicina, cacadumicina e munumbicinas (Castillo et al., 2002). As munumbicinas, antimicrobianos peptídicos produzidos por *Streptomyces* sp. NRRL 30562, obtido da planta medicinal *Kennedia nigriscans*, possui um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, tais como *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente. A munumbicina B mostrou-se ativa também contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA – “Methicillin-resistant” *Staphylococcus aureus*), mas a atividade mais expressiva foi contra *Plasmodium falciparum* (Castillo et al., 2002). A coronamicina, obtida de *Streptomyces* sp. MSU-2110, isolados de *Monstera* sp., é ativa contra *Cryptococcus neoformans* e *Plasmodium falciparum* (Ezra et al., 2004). Tian et

al. (2004) isolaram actinomicetos endofíticos do gênero *Streptomyces* sp. das raízes de plantas de arroz os quais apresentaram atividade contra fitopatógenos comuns desta gramínea. Actinomicetos do gênero *Streptomyces*, isolados das raízes de *Azadirachta indica* A. Juss., apresentaram atividade contra *Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli* (Verma et al., 2009). Estes relatos evidenciam o potencial dos actinomicetos endofíticos como fontes promissoras para o isolamento de compostos ativos.

2.3 Gênero *Streptomyces*

Os estreptomicetos são bactérias Gram-positivas, aeróbias e catalase positiva. Estes organismos são quimio-organotróficos podendo utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fontes de carbono para seu metabolismo (Williams et al., 1989).

O gênero *Streptomyces* destaca-se dentre os representantes dos actinomicetos devido à sua ampla produção de compostos oriundos de seu metabolismo secundário com amplas atividades biológicas (Bérdy, 2005; Bibb, 2005). É um gênero considerado economicamente importante devido à alta produção de metabólitos ativos (cerca de 80% dos antimicrobianos conhecidos atualmente são originados de espécies de *Streptomyces*) (Prabavathy et al., 2006). A maioria dos estreptomicetos produz diversos antimicrobianos incluindo os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, macrolídeos, poliênicos, nucleosídeos e tetraciclina (Bérdy, 2005).

Os estreptomicetos são amplamente distribuídos em ambientes aquáticos e terrestres (Williams et al., 1989; Selvakumar, 2010; Li et al., 2011).

Estes micro-organismos são importantes membros do ecossistema do solo, seu principal habitat, e evoluíram adaptando-se morfológica e fisiologicamente a este ambiente. Eles colonizam o solo por meio de hifas multinucleadas que formam uma rede micelial (Claessen et al., 2006). As hifas aéreas desenvolvem-se progredindo para a septação e formação de cadeias de esporos (Chater, 1998). Estas bactérias são saprofíticas e correspondem a mais de 30% da população presente no solo, sendo responsáveis pela degradação e reciclagem da matéria orgânica (Kennedy, 1999).

Devido à ampla produção de compostos ativos, principalmente os antimicrobianos, o gênero *Streptomyces*, até a década de 1960, tinha mais de 3.000 espécies descritas. Com o intuito de organizar a descrição das espécies, em 1966 foi criado o “International *Streptomyces* Project” (ISP) com o objetivo de padronizar a descrição de 450 espécies deste gênero. Os critérios adotados incluíam a morfologia da cadeia de esporos, a cor dos micélios, a utilização ou não de fontes de carbono, a microscopia eletrônica, a micromorfologia, a produção de metabólitos secundários e a homologia do DNA (Williams et al., 1983).

Os *Streptomyces* apresentam um complexo ciclo de vida (Chen, 2002). O cromossomo presente nestes micro-organismos pode chegar até 9 Mb possuindo cerca de 72% de bases guanina e citosina (Bentley et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Esse gênero apresenta cromossomo linear muito instável que, frequentemente, é acompanhado por plasmídeo também linear (Chen, 2002). O seu cromossoma é caracterizado pela presença de clusters gênicos

que codificam enzimas responsáveis pela produção de metabólitos secundários (Hwang et al., 2013).

A produção dos metabólitos secundários, em bactérias do gênero *Streptomyces*, coincide com o desenvolvimento de hifas aéreas em culturas sólidas. Já no caso de culturas líquidas, os metabólitos são produzidos durante a fase estacionária resultantes da limitação de nutrientes do meio de cultivo (Bibb, 2005).

2.4 Metabolismo secundário

Os micro-organismos são importantes fontes de produtos naturais com grande valor comercial incluindo antibióticos, antitumorais, antivirais, compostos utilizados na agricultura, veterinária e indústria alimentícia (Chen, 2010). Os produtos naturais são definidos como compostos químicos isolados de um ser vivo e que derivam do seu metabolismo primário ou secundário.

Os metabólitos secundários são compostos não essenciais para processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução do organismo. Estes compostos são produzidos com o objetivo de sobrevivência no meio ambiente, sendo utilizados como mecanismos de defesa (Vaishnav & Demain, 2010). A maioria dos metabólitos secundários em actinomicetos é produzida durante a fase intermediária entre a produção de micélio e a esporulação, acompanhando a diferenciação morfológica (Hwang et al., 2013).

A diversidade de metabólitos secundários é representada por modificações genéticas (transferência horizontal de genes, mutações pontuais, duplicação genética, deleções parciais ou totais de genes, recombinação homóloga e transposições) e por modificações ambientais (temperatura, pH,

fonte de nutrientes, etc.) (Baltz, 2008). Isto caracteriza a produção de mais de 10.000 compostos bioativos por espécies de actinomicetos (Bérdy, 2005). Logo, isto evidencia a importância da adequação das condições de cultivo quando se pretende identificar a formação de compostos ativos a partir de micro-organismos.

2.5 Antimicrobianos

Os compostos antibióticos podem ser isolados de diversas fontes: bactérias, plantas, insetos, anfíbios, vertebrados, etc. (Bérdy, 2005). Atualmente, a maioria dos antimicrobianos usados clinicamente tem sua origem em produtos naturais microbianos, principalmente os metabólitos secundários (Peláez, 2006).

Em 1928, com a descoberta da penicilina, derivada de *Penicillium notatum*, novas fontes de antibióticos motivaram as pesquisas de novos compostos (Guimarães et al., 2010). Durante a década de 1940, Waksman utilizou o termo antibiótico pela primeira vez, caracterizando-o como uma molécula produzida naturalmente por um micro-organismo cuja ação era antagonista no crescimento de outro micro-organismo (Clardy et al., 2009). Em 1940, o primeiro antibiótico originado a partir de actinomicetos, a actinomicina, foi isolado (Waksman, 1953). Durante a “Década de Ouro” de descoberta dos antibióticos, entre 1950 e 1960, foram descobertos compostos importantes como eritromicina, tetraciclina, canamicina, nistatina e adriamicina (Challis, 2003). Devido ao alto custo das pesquisas, após a década de 1970 a descoberta de novas substâncias foi reduzindo gradativamente (Bérdy, 2005).

O mecanismo de ação dos antibióticos é um processo complexo que envolve desde a interação da molécula com seu alvo celular até o desencadeamento de mudanças bioquímicas, moleculares e estruturais. As principais ações dos antibióticos incluem alteração da síntese de ácidos nucleicos, inibição da síntese da parede celular e inibição da síntese de proteínas (Kohanski et al., 2007).

Os análogos semissintéticos dos compostos naturais existentes foram introduzidos no mercado entre os anos de 1960 e 1980, como estratégia contra a resistência bacteriana (Fernandes, 2006). Entre os anos de 1980 e 2000, moléculas sintéticas, os antimicrobianos, foram incorporadas ao mercado devido à redução de identificação de novos compostos naturais (Guimarães et al., 2010).

Os principais antimicrobianos utilizados na clínica são classificados em beta-lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, entre outros (Guimarães et al., 2010).

Os beta-lactâmicos, compreendendo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, oxapenêmicos e monobactâmicos, foram a primeira classe de antibiótico utilizados para o tratamento de infecções bacterianas (Guimarães et al., 2010). Eles atuam em nível de síntese de parede celular, inibindo irreversivelmente a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicano na formação da parede celular (Madigan et al., 2010). Os carbapenêmicos são os mais utilizados clinicamente devido ao seu amplo espectro de ação frente a bactérias Gram-

negativas, incluindo a ação contra micro-organismos produtores de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (Suárez & Gudiol, 2009).

As tetraciclinas são compostos bacteriostáticos de amplo espectro que inibem a síntese protéica ligando-se à subunidade 30S ribossomal impedindo a ligação do RNA transportador (Schnappinger & Hillen, 1996). O uso de tetraciclinas como antibiótico de primeira escolha está diminuindo devido ao aumento de resistência a esta classe (Guimarães et al., 2010).

Os aminoglicosídeos (estreptomicina, por exemplo) são compostos bactericidas que inibem a síntese protéica irreversivelmente por meio da ligação à subunidade 30S ribossomal impedindo a translocação (Davis, 1987). Seu uso deve ser controlado devido aos riscos de ototoxicidade e nefrotoxicidade (Avent et al., 2011).

2.6 Mecanismos de Resistência Bacteriana

Embora haja uma ampla variedade de compostos antimicrobianos disponíveis, o uso indiscriminado destes acarreta o crescente aparecimento de micro-organismos resistentes. A resistência aos antimicrobianos é um problema complexo que envolve inúmeros fatores relacionados ao organismo, ao medicamento utilizado e ao ambiente (Monroe & Polk, 2000).

A resistência é, na maioria das vezes, adquirida por bactérias previamente susceptíveis a determinado agente antimicrobiano. A principal forma de aquisição de resistência é a transferência de genes presentes em plasmídeos. Os genes de resistência presentes no cromossomo ou no plasmídeo podem ser transferidos para a próxima geração de células

(transferência vertical) ou para micro-organismos de outras espécies (transferência horizontal) (Schwartz et al., 2003). Além disso, muitas bactérias apresentam resistência intrínseca à determinada classe de antimicrobiano, independente da transferência de genes (Cox & Wright, 2013).

As principais estratégias de resistência desenvolvidas por micro-organismos são: inativação enzimática, alteração do sítio de ação, alteração da permeabilidade da membrana celular externa e bombas de efluxo (Sundsfjord et al., 2004). A combinação de mais de uma estratégia de resistência caracteriza, muitas vezes, a resistência a diferentes classes de antimicrobianos, conhecida como multirresistência (Tenover, 2006).

A inativação enzimática é caracterizada pela produção de enzimas que degradam o agente antimicrobiano. As beta-lactamases, produzidas por *Escherichia coli*, por exemplo, são enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico, estrutura fundamental para a ação de moléculas que o possui (Tenover, 2006). As beta-lactamases podem ser codificadas por genes presentes no cromossoma ou nos plasmídeos dos micro-organismos, e muitas estão em transposons facilitando a disseminação entre diferentes organismos (Livermore, 1995). As beta-lactamases de espectro estendido (“Extended-Spectrum Beta-Lactamases” - ESBLs) são enzimas mediadas por plasmídeos e conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações, e aztreonam, sendo o mecanismo de resistência mais comum em bactérias Gram-negativas (Oliveira, 2011).

A interação entre a molécula do antimicrobiano e o seu sítio de ação é o passo principal para desencadear a morte ou inibição do crescimento

celular. Os principais sítios de ação dos antimicrobianos são estruturas importantes para o desenvolvimento celular, portanto o micro-organismo não pode excluí-los como mecanismo de defesa, mas apenas alterá-los impedindo a ligação do agente. A alteração da enzima transpeptidase, por exemplo, torna o micro-organismo resistente à maioria dos beta-lactâmicos e com isso não há alteração da síntese da parede celular (Lambert, 2005).

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa que serve de primeira defesa contra agentes nocivos (Poole, 2001). O influxo de moléculas hidrofílicas é controlado por porinas, canais protéicos inespecíficos presentes na membrana (Pagès et al., 2008), e muitos antimicrobianos como beta-lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol e fluorquinolonas são transportados por estes canais para o interior celular (Nikaido, 2003). Algumas espécies de bactérias Gram-negativas possuem uma baixa sensibilidade inata aos beta-lactâmicos devido à alteração de permeabilidade da membrana celular externa, relacionada com a perda ou diminuição da quantidade das porinas (Nikaido, 2003). Por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa* a permeabilidade está reduzida devido à baixa concentração de porinas na membrana externa (Hancock & Brinkman, 2002; Nikaido, 2003). Em outros casos, como nos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, a baixa sensibilidade aos beta-lactâmicos está relacionada à presença de porinas inespecíficas, impedindo a entrada do antimicrobiano na célula (Nikaido, 2003).

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras responsáveis pela remoção de substâncias nocivas, como os antimicrobianos, de dentro da célula bacteriana, estando presentes tanto em bactérias Gram-negativas

quanto em Gram-positivas (Webber & Piddock, 2003). As bombas de efluxo são características de espécies resistentes a múltiplos antimicrobianos (Piddock, 2006).

A resistência a múltiplos antimicrobianos é um fator que contribui para o aumento da mortalidade em casos de infecções nosocomiais (Rice, 2007). As bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Campylobacter* sp., *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp, principalmente) são frequentemente reportadas como espécies multirresistentes (Pagès et al., 2008).

2.7 Família Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae

As espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae são bacilos Gram-negativos, fermentadores de glicose, anaeróbios facultativos ou aeróbios, são catalase positiva, oxidase positiva e redutores de nitratos a nitritos (Murray et al, 2007). As bactérias desta família são os patógenos com maior prevalência em diversas infecções (Gaynes et al., 2005) podendo ser isolados dos tratos intestinal, urinário e respiratório, da corrente circulatória e do sistema nervoso (Koneman et al., 2008).

Escherichia coli é a espécie mais comumente relacionada a infecções intestinais, embora esteja presente na microbiota normal intestinal (Chaudhuri & Henderson, 2012), e também de diversas patologias extra-intestinais: infecções do trato urinário, bacteremia, osteomielite, meningite neonatal, entre outras (Hamzaoui et al., 2009; Rath et al., 2014). Esta espécie é relatada como um dos principais patógenos em infecções hospitalares,

principalmente em pessoas imunocomprometidas (Brasil, 2004; Nogueira et al., 2009; Breathnach, 2013; Tuon et al., 2014). A produção de beta-lactamases de espectro estendido é um mecanismo de resistência frequentemente associado a este micro-organismo (Rath et al., 2014).

Klebsiella oxytoca é uma espécie usualmente relacionada a infecções nosocomias, dos tratos urinário e respiratório, infecções em feridas cirúrgicas e associadas à diarreia e à colite após o uso de antibióticos (Ménard et al., 2010). Os mecanismos de resistência apresentados por esta espécie são redução da permeabilidade da membrana externa, produção de beta-lactamases e carbapenemases (Decré et al., 2004; Almeida et al., 2013; Lowe et al., 2012).

Klebsiella pneumoniae é a bactéria do gênero *Klebsiella* mais frequentemente isolada, estando associada à pneumonia, meningite, infecções urinárias e sepses (Oliveira, 2008). Este micro-organismo é ubíquo, presente no solo, na água, nas plantas, nos animais e constituindo a microbiota intestinal e da nasofaringe humana (Murray et al., 2007). Esta espécie é uma das principais isoladas em infecções hospitalares (Ko, 2002; Brasil, 2004; Diancourt et al., 2005; Elemam et al., 2009). Os principais mecanismos de resistência apresentados pela *K. pneumoniae* são alteração da permeabilidade da membrana externa, produção de beta-lactamases de espectro estendido, AmpC e carbapenemases (Coudron et al., 2000; Diancourt et al., 2005; Moura et al., 2007).

Proteus mirabilis é uma espécie ubíqua, estando presente no meio ambiente e constituindo a microbiota intestinal (Murray et al., 2007). Além

de estar associada a infecções do trato urinário e sepse, esta espécie é relacionada a infecções do sistema nervoso central, principalmente em neonatos e crianças, produzindo casos de meningite e abscessos cerebrais (Renier et al., 1988; Jombo et al., 2012). Sua resistência está relacionada à produção de beta-lactamases (Coker et al., 2000).

Enterobacter cloacae, constituinte normal da microbiota intestinal, tem se tornado um importante patógeno em infecções nosocomiais (Acolet et al., 1994; Songa et al., 2010; Dalben et al., 2008), causando principalmente, pneumonias, infecções do trato urinário e meningites (Songa et al., 2010). Esta espécie é intrinsecamente resistente a aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina), cefazolina e cefoxitina devido à produção de AmpC (Cascio et al., 2014), e também são produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (Songa et al., 2010).

Enterobacter intermedius, transferida para o gênero *Kluyvera* (Pavan et al., 2005) devido à sua similaridade filogenética, é geralmente isolada do meio ambiente estando presente na água e no solo. Casos clínicos relacionados a esta espécie são poucos, mas alguns estudos relatam a associação e a presença deste micro-organismo em patologias (Prats et al., 1987; Janicka et al., 1999; O'hara et al., 1998). A baixa incidência desta espécie pode ser resultado de técnicas inapropriadas para identificação (Stock, 2002).

Morganella morganii, presente como microbiota normal intestinal, foi primeiramente descrita, em 1930, como patógeno em infecções urinárias (Yang et al., 2006). Embora esteja presente no meio ambiente, esta espécie é

frequentemente relacionada a surtos hospitalares, principalmente em casos pós-cirúrgicos (Tucci & Isenberg, 1981). Este micro-organismo possui resistência intrínseca a beta-lactâmicos (ampicilina, amoxicilina e oxacilina) e cefalosporinas de segunda geração, podendo desenvolver resistência a múltiplos antibióticos por meio da produção de beta-lactamases de espectro estendido (Jones et al., 2004; Hakyemez et al., 2012).

Citrobacter freundii, presente na microbiota intestinal humana e no meio ambiente, é um micro-organismo oportunista em pessoas imunocomprometidas (Flegg & Mandal, 1989), podendo causar sepse, diarreia, meningite, abscessos intra-cranianos e infecções do trato urinário (Nishino et al., 1997; Chen et al., 2011; Plakkal et al., 2013). Esta espécie é considerada uma das mais importantes causas de infecções nosocomiais na China (Chen et al., 2011). Este micro-organismo é caracterizado pela produção de beta-lactamase AmpC cromossomal e alguns estudos relatam a produção de beta-lactamase de espectro estendido e carbapenemases como mecanismos de resistência (Chen et al., 2011; Gaibani et al., 2013).

Citrobacter koseri, previamente conhecido *Citrobacter diversus* (Doran, 1999), é um micro-organismo comensal da microbiota dos tratos geniturinário feminino e intestinal humano e animal (Agrawal & Mahapatra, 2005), e estão presentes no solo e na água (Dzeing-Ella et al., 2009). Esta espécie possui fatores de virulência que permitem a invasão e sobrevivência em células epiteliais, podendo causar, assim, abscessos (Doran, 1999). Estes micro-organismos podem causar infecções nos sistemas urinário, gastrointestinal e respiratório, sendo comumente reportados em neonatos e

imunocomprometidos (Dzeing-Ella et al., 2009). No período neonatal e na infância, o *Citrobacter koseri* está relacionado à sepse, meningite e abscessos cerebrais (Doran, 1999).

Pantoea agglomerans, conhecida inicialmente como *Enterobacter agglomerans* (Gavini et al., 1989), é uma bactéria ubiquitária amplamente distribuída no meio ambiente, podendo ser isolada do solo, água, plantas, animais e humanos (Delétoile et al., 2009). Esta espécie está associada a traumas causados por partes de vegetais, resultando em infecções em tecidos moles, ossos e articulações (Cruz et al., 2007), e também é oportunista em pessoas imunocomprometidas, causando infecções do trato urinário e bacteremia (Sharma et al., 2012). Este micro-organismo é reconhecido como agente de infecções nosocomiais devido à contaminação de soluções parenterais como hemoderivados, nutrição parenteral, anestésicos e hidratação venosa (Delétoile et al., 2009; Sharma et al., 2012).

Os representantes da família Pseudomonadaceae são bacilos Gram-negativos, estão presentes em diversos habitats (solo, água, plantas e animais), são aeróbios ou anaeróbios, e quimio-organotróficos (Sharma et al., 2014). *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie mais amplamente estudada desta família (Murray et al., 2007), principalmente relacionada a infecções hospitalares (Levin et al., 1999; Gibb et al., 2002; Sharma et al., 2014). Esta bactéria é considerada um patógeno oportunista e raramente causa infecções em humanos, afetando, principalmente, indivíduos imunocomprometidos (Balasubramanian et al., 2013), pessoas com queimaduras, SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e fibrose cística (Shepp et al., 1994; Delden &

Iglewski, 1998; Rumbaugh et al., 1999; Mauch & Levy, 2014). O tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* é difícil devido aos seus mecanismos de resistência – produção de beta-lactamase AmpC induzível, bombas de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana externa (Livermore, 2002; Fuentefria et al., 2008) – e, principalmente, à formação de biofilmes (Whiteley et al., 2001; Sharma et al., 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Actinomiceto endofítico

Para realização deste trabalho, foi utilizado o actinomiceto endofítico R18(6), isolado de raízes de tomateiro *Lycopersicon esculentum* (Oliveira, 2010), depositado na bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS. A amostra encontrava-se armazenada em tubos contendo meio de cultura ágar amido caseína (amido 1%; caseína 0,012% ; NaCl 0,2% ; KNO₃ 0,2%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ 0,005%; FeSO₄ 0,001%; CaCO₃ 0,002%; ágar bacteriológico 0,6%) inclinado e para recuperação desta foi realizado um repique para placas contendo o mesmo meio de cultura. As placas foram incubadas durante 10 dias a 30°C.

3.1.2 Isolados Gram-negativos de origem ambiental e clínica

Foram utilizadas, neste trabalho, 10 bactérias Gram-negativas, isoladas do Arroio Dilúvio (Oliveira, 2011), depositadas na bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS e 12 bactérias Gram-negativas de origem clínica fornecidas pela Dra. Ana Lúcia Souza Antunes do Laboratório de Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS (Tabela 1). Os isolados encontravam-se armazenados em glicerol 20%. Para recuperação destes, 10

µL do material foi passado para caldo tripticaseína de soja (TSB – *Tryptic Soy Broth*) e incubado durante 24 horas a 35°C.

Tabela 1. Isolados Gram-negativos ambientais e clínicos utilizados neste trabalho.

Isolados Ambientais	Isolados Clínicos
<i>Citrobacter koseri</i> 3CC04	<i>Citrobacter freundii</i> 17
<i>Citrobacter koseri</i> 3EC04	<i>Enterobacter cloacae</i> 49
<i>Citrobacter freundii</i> 1CC09	<i>Enterobacter cloacae</i> 62
<i>Pantoea agglomerans</i> 3AE03	<i>Escherichia coli</i> 70
<i>Enterobacter intermedius</i> 1CC07	<i>Klebsiella oxytoca</i> 90
<i>Escherichia coli</i> 1DE14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 15
<i>Escherichia coli</i> 4EC05	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 222
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1CE02	<i>Morganella morganii</i> 162
<i>Klebsiella oxytoca</i> 2BS08	<i>Proteus mirabilis</i> 102
<i>Proteus mirabilis</i> 3DC01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 54
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 59
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 230

3.2 Perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos a antimicrobianos

Para avaliação dos perfis de susceptibilidade dos isolados Gram-negativos, foi realizado o teste de antibiograma pelo método de Kirby-Bauer (CLSI, 2009). Os isolados foram inoculados em caldo TSB e incubados a 37°C por 24 horas. Após, as suspensões foram ajustadas, utilizando-se solução salina estéril, até a turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland (equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL). As suspensões foram inoculadas, com suabe estéril, em placa contendo ágar Müller-Hinton. Em seguida, os discos contendo os antimicrobianos foram dispostos equidistantes na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35°C por 18 horas. Os halos de inibição foram interpretados conforme a norma M100-S22 (CLSI, 2012). Foram utilizados 20 antimicrobianos compreendendo as classes

de agentes utilizadas com maior frequência na terapêutica contra bactérias Gram-negativas: amoxicilina/clavulanato (AMC 10 µg), ampicilina (AMP 30 µg), aztreonam (ATM 30 µg), ceftazidima (CAZ 30 µg), cefalotina (CFL 30 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloranfenicol (CLO 30 µg), cefpodoxima (CPD 10 µg), ceftriaxona (CRO 30 µg), cefotaxima (CTX 30 µg), ertapenem (ETP 10 µg), estreptomicina (EST 10 µg), gentamicina (GEN 10 µg), imipenem (IMP 10 µg), meropenem (MER 10 µg), nitrofurantoína (NIT 300 µg), norfloxacin (NOR 10 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (SUT 25 µg), tetraciclina (TET 30µg).

3.3 Avaliação da atividade do actinomiceto R18(6) pelo ensaio de dupla camada

Para avaliação do potencial de produção de composto(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) contra os 22 isolados Gram-negativos, foi realizado o teste de dupla camada. Inoculou-se, pelo método de picada, o actinomiceto em placa de Petri contendo ágar amido caseína e incubou-se por 14 dias a 30°C. Após esse período, foram vertidas, sobre os crescimentos, suspensões bacterianas contendo 1 mL de uma suspensão com concentração de 10⁸ UFC/mL (correspondente a uma solução padrão de 0,5 na escala McFarland) e 9 mL de ágar Müller-Hinton fundido. As placas foram incubadas no período de 24 e 48 horas a 37°C. Ao final da incubação, foram medidos os halos de inibição determinando-se a atividade antimicrobiana. Os testes foram realizados em duplicata.

3.4 Produção do extrato bruto

A avaliação da atividade antimicrobiana do actinomiceto contra as bactérias Gram-negativas foi realizada utilizando-se o extrato bruto livre de células. Para tanto, foi preparado um pré-inóculo onde uma alíquota do actinomiceto, crescido previamente em placa de ágar amido caseína, foi transferida para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio base (caseína 0,03%; NaCl 0,2%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ 0,005%; CaCO₃ 0,002%; KNO₃ 0,2%) suplementado com 1% de glicose. Estes frascos foram incubados por 48 horas a 30°C sob agitação constante de 100 r.p.m. Após este período, 3 mL do pré-inóculo foram transferidos para novos frascos. As mesmas condições de cultivo utilizadas para preparação do pré-inóculo foram aplicadas para produção do inóculo. O extrato foi produzido durante 10 dias de incubação e a cada 24 horas uma alíquota de 100 µL foi retirada para realização do teste de difusão em poço. Para obtenção de um extrato bruto livre de células, a alíquota foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 r.p.m.

3.5 Teste de antibiose por difusão em poço

Para avaliação da atividade dos extratos produzidos pelo actinomiceto R18(6), realizou-se o teste de antibiose por difusão em poço (adaptado de Devillers et al., 1989). O ensaio de difusão em poço consistiu em inocular, utilizando um suabe estéril, uma suspensão bacteriana, ajustada a 0,5 na escala de McFarland (o que corresponde a 10⁸ UFC/mL), em placas contendo ágar Müller-Hinton. Após a semeadura, foram realizados poços de 9 mm no ágar. Em cada poço, adicionou-se 100 µL do extrato bruto livre de células (previamente centrifugado por 10 minutos a 13.000 r.p.m.).

Primeiramente, as placas foram incubadas por 16 horas sob refrigeração (4°C), para difusão do extrato no meio de cultura, e posteriormente, por 24 horas a 35°C, para crescimento microbiano. Os testes foram realizados em duplicata e a atividade antimicrobiana foi obtida a partir das médias dos halos de inibição.

3.6 Otimização das condições de cultivo do extrato bruto para a produção de metabólito(s) ativo(s)

Com o objetivo de aprimorar a produção de metabólito(s) ativo(s) a partir do actinomiceto R18(6), foram avaliados diferentes condições (fonte de carbono, temperatura, modo de incubação, pH e tempo) separadamente. Ao passo que uma condição era determinada como ótima para a produção de metabólito(s) ativo(s), uma nova condição passou a ser testada.

3.6.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono

Inicialmente, para a otimização das condições de produção do metabólito de interesse foi avaliada a influência da fonte de carbono na produção do composto ativo. Para tanto, quatro fontes de carbono (amido, sacarose, glicerol e glicose) foram avaliadas. Estas foram adicionadas em meio base na concentração de 1%. O extrato foi produzido durante 10 dias, sob agitação constante de 100 r.p.m. e na temperatura de 30°C. Para avaliação da atividade dos extratos brutos formados com diferentes fontes de carbono, realizou-se o teste de difusão em poço nos intervalos de 24 horas. Os testes foram realizados em duplicata e a atividade antimicrobiana foi obtida a partir das médias dos halos de inibição.

3.6.2 Avaliação de diferentes temperaturas e métodos de incubação

Após avaliação das fontes de carbono como constituintes do meio de cultivo e a determinação de qual delas proporcionou a produção de um extrato bruto mais ativo, avaliou-se a influência de diferentes temperaturas de incubação na produção do composto ativo. A faixa de temperatura testada foi de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C. O extrato foi produzido durante 10 dias, sob agitação constante de 100 r.p.m., e nos intervalos de 24 horas realizou-se o teste de difusão em poço. Os testes foram realizados em duplicata e a atividade antimicrobiana foi obtida a partir das médias dos halos de inibição.

Em seguida à definição da temperatura, avaliou-se qual modo de incubação (agitação ou estático) influencia na produção de metabólito(s) ativo(s). Foram avaliadas a agitação em 100 r.p.m e a incubação em modo estático utilizando-se estufa.

3.6.3 Avaliação do pH do meio de cultivo e do tempo de incubação

Após determinados a fonte de carbono, a temperatura e o método de incubação, avaliou-se a influência do pH na produção de metabólito(s) ativo(s). Para isto, o extrato foi produzido utilizando-se meio base contendo 1% de fonte de carbono, tamponado em pH 4, 4.5, 5, 6, 6.5, 7, 8 (Apêndice 1). As condições (fonte de carbono, temperatura e modo de cultivo) que se apresentaram ideais para a produção de metabólito(s) ativo(s) foram utilizadas neste ensaio.

Também se avaliou a influência do tempo de incubação na produção de composto(s) ativo(s). Para isto, foram realizados testes de antibiose por

difusão em poço no intervalo de 24 horas durante 10 dias de incubação. Para estes testes, utilizou-se as condições de cultivo (fonte de carbono, temperatura, modo de incubação e pH) que proporcionaram um extrato bruto com melhor atividade contra os isolados Gram-negativos.

3.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos com o teste de antibiose por difusão em poço foram avaliados estatisticamente utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de múltiplas médias (teste de Tukey), considerando 95% de significância.

3.8 Curva de crescimento do actinomiceto endofítico

A curva de crescimento teve como objetivo avaliar o tempo de geração do actinomiceto e correlacionar com a fase de produção do composto ativo. Primeiramente, um pré-inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.4. Em seguida, 3 mL foram transferidos para 10 frascos contendo 50 mL de meio base suplementado com 1% de glicose. Estes foram incubados durante 10 dias, nas mesmas condições do pré-inóculo. A cada 24 horas, um frasco foi retirado da incubação e a massa celular foi determinada por meio do peso seco. Para isto, o meio de cultivo foi filtrado utilizando-se membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 μm . Previamente à filtração, as membranas foram dessecadas por 24 horas e, após, foram pesadas em balança analítica. Posteriormente à filtração, as membranas foram acondicionadas em placas de vidro e secas por dois dias em dessecador e por

dois dias em estufa de 35°C. A seguir, as membranas foram pesadas em balança analítica. O peso seco foi determinado pela diferença entre o peso final da membrana, após filtração, e o peso inicial da membrana.

3.9 Curva de variação do pH no meio de cultivo

Com o objetivo de verificar se o actinomiceto R18(6) tem a capacidade de modificar o pH do meio de cultivo durante seu crescimento, foi realizada a curva de variação de pH. Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo conforme descrito no item 3.4. Os frascos foram incubados durante 10 dias. A cada 24 horas, um frasco foi retirado da incubação e o pH foi medido em pHmetro.

3.10 Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada utilizando-se o método de microdiluição em caldo de acordo com a norma M7-A7 (CLSI, 2006). Para este ensaio, foram utilizados 17 isolados Gram-negativos multirresistentes (Tabela 2). Para preparação dos inóculos, as suspensões dos isolados, crescidos previamente em caldo TSB durante 24 horas a 37°C, foram ajustadas, com solução salina estéril, a 0,5 na escala de McFarland (correspondendo a 10^8 UFC/mL). Estas suspensões foram diluídas na proporção de 1:10 para obtenção de uma concentração de 10^7 UFC/mL. A viabilidade dos inóculos foi testada, paralelamente, inoculando uma alíquota em placas contendo ágar tripticaseína de soja (TSA – *Tryptic Soy Agar*). As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. Para o controle negativo, foi utilizado 100 µL de caldo Müller-Hinton. Para controle positivo, utilizou-se 95 µL de caldo Müller-Hinton e 5 µL do inóculo. Nos poços onde foram feitas as diluições, adicionou-se, inicialmente, 95 µL de caldo Müller-Hinton. Logo após, acrescentou-se 100 µL de extrato e procedeu-se a diluição seriada até a concentração de 1/1024. Ao final, 5 µL do inóculo foram pipetados em cada poço.

As placas foram incubadas no período de 24 e 48 horas a 35°C. Para verificar se o extrato possuía atividade bacteriostática ou bactericida, após os tempos de incubação, uma alíquota dos poços que não apresentavam crescimento visível foram plaqueadas em meio TSA. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração de extrato bruto capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Tabela 2. Isolados Gram-negativos utilizados para avaliação da concentração inibitória mínima do extrato bruto.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> 222	<i>Proteus mirabilis</i> 3DC01
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 15	<i>Proteus mirabilis</i> 102
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1CE02	<i>Citrobacter freundii</i> 1CC09
<i>Klebsiella oxytoca</i> 90	<i>Citrobacter freundii</i> 17
<i>Escherichia coli</i> 70	<i>Enterobacter cloacae</i> 62
<i>Escherichia coli</i> 1DE14	<i>Enterobacter cloacae</i> 49
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 59	<i>Citrobacter koseri</i> 3CC04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 230	<i>Morganella morganii</i> 162

3.11 Caracterização parcial do(s) metabólito(s) ativo(s)

3.11.1 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

Para analisar a estabilidade do(s) metabólito(s) ativo(s) frente a enzimas proteolíticas, utilizou-se cinco enzimas: tripsina (25 mg/mL), papaína (100 mg/mL), proteinase K (50 mg/mL), lisozima (50 mg/mL) e pepsina (100

mg/mL). Para o ensaio, foi preparada uma solução, com concentração final de 2%, contendo 400 µL do extrato bruto e a enzima. A solução foi acondicionada em microtubo e incubada a 37°C, em estufa, durante 1 hora. A atividade antimicrobiana do composto(s) ativo(s), após o tratamento com as enzimas, foi avaliada pelo teste de antibiose por difusão em poço, utilizando-se a bactéria *Klebsiella pneumoniae* 222. O extrato bruto foi utilizado como controle positivo e os testes foram realizados em duplicata. A atividade residual do composto foi calculada após medição dos halos de inibição, utilizando a equação (adaptada de Oliveira, 2004):

$$\text{A.R.(\%)} = \frac{H_T - 9}{H_C - 9} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

A.R.: atividade residual

H_T: média do halo de inibição do extrato bruto após tratamento (mm)

H_C: média do halo de inibição do controle (mm)

9: diâmetro do poço

3.11.2 Termoestabilidade

A termoestabilidade do(s) composto(s) ativo(s) foi avaliada nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C utilizando-se banho de água. Para cada ensaio, 400 µL de extrato bruto foram utilizados. Para as temperaturas de 30°C a 90°C, os tempos de incubação foram de 15 e 30 minutos. Para a temperatura de 100°C, avaliou-se os tempos de incubação de

3, 5, 10, 15 e 30 minutos (Oliveira, 2004). A atividade antimicrobiana do composto(s) ativo(s) contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* 222 foi avaliada, após cada tratamento, pela técnica de difusão em poço. Os halos de inibição foram medidos e a atividade residual do composto foi calculada (equação 1). Os testes foram realizados em duplicata.

3.12 Extração de metabólitos ativos

A purificação parcial do(s) composto(s) ativo(s) foi realizada através do método de extração líquido-líquido descontínua (Vogel, 1980), utilizando-se a proporção de 1:1 de extrato bruto e solvente (Tabela 3). Após a extração, a fração orgânica foi submetida à evaporação do solvente por rota-evaporação (Vogel, 1980). Após completa eliminação do solvente, o extrato purificado foi ressuspenso com 3 mL de solvente (o mesmo utilizado na extração), 3 mL de água destilada ou 3 mL de tampão fosfato salino (PBS – *Phosphate Buffered Saline*). O extrato ressuspenso e a fração aquosa foram avaliados quanto à atividade pelo teste de difusão em poço. No caso de formação de precipitado durante o processo de extração, este foi analisado quanto à atividade pelo mesmo método, antes e após secagem por chapa de aquecimento.

Tabela 3. Solventes utilizados para o processo de purificação parcial do(s) composto(s) ativo(s).

Diclorometano	Etanol
Acetona	Isopropanol
Hexano	Isobutanol
Acetato de etila	Ácido acético

3.13 Microcultivo do actinomiceto

A técnica de microcultivo foi realizada para visualização da morfologia microscópica do actinomiceto (Williams et al., 1989). Para isto, em placas de vidro, foram dispostas lâmina de microscopia, apoiadas sobre dois palitos de madeira, lamínula e algodão. Após a esterilização, em autoclave, sobre a lâmina foi adicionado um cubo de ágar amido caseína. O actinomiceto foi inoculado nas bordas e no centro do ágar e, sobre a sementeira, foi adicionada uma lamínula. Para manter a umidade, foi adicionada água estéril no algodão. As placas foram incubadas a 30°C e a morfologia do isolado foi avaliada em 10-14 dias. Por meio desta técnica podem ser identificadas diversas características que possibilitam a classificação do actinomiceto em nível de gênero: produção e fragmentação de esporos, formação de micélio aéreo e ramificação do micélio sobre o substrato (Williams et al., 1989).

3.14 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura teve como objetivo avaliar as características das hifas e a superfície dos esporos do actinomiceto, sendo necessárias para a sua classificação em nível de gênero (Williams et al., 1989). Para isto, primeiramente, foi realizada a técnica de microcultivo adaptada: 1 mL de ágar amido caseína foi adicionado sobre lamínulas com 13 mm de diâmetro. Após a solidificação do ágar, o actinomiceto foi semeado nas bordas e no centro. Após o cultivo de quatro dias, as lamínulas foram submetidas ao protocolo de preparo da amostra fornecido pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, com adaptações. As amostras foram fixadas com

glutaraldeído 25% durante dois dias. Após este período, foram realizadas três lavagens (com duração de 30 min cada) com solução tampão fosfato 0,2 M e água destilada. Em seguida, a amostra foi submetida à desidratação com diferentes concentrações de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). O ponto crítico (retirada da água do sistema) foi realizado utilizando-se o equipamento BAL-TEC CPD 030 *Critical Point Dryer*. A visualização da amostra foi realizada no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6060.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos a antimicrobianos

Os isolados Gram-negativos, de origem ambiental e clínica utilizados no presente trabalho, foram avaliados quanto aos seus perfis de susceptibilidade por meio do teste de antibiograma utilizando o método de Kirby-Bauer (Tabela 4). Definiu-se como multirresistente aquele isolado que apresentasse resistência a mais de duas classe de antimicrobiano. Deste modo, observou-se que 92% dos isolados são multirresistentes. A multirresistência apresentada pelos isolados testados pode ser associada à presença de um conjunto de mecanismo de resistências (Sundsfjord et al., 2004; Webber & Piddock, 2003).

No presente estudo, observou-se que as três espécies de *Pseudomonas aeruginosa* selecionadas foram resistentes a 95% dos compostos testados. A resistência desta espécie aos antimicrobianos tem aumentando mundialmente, a qual pode estar associada a mecanismos intrínsecos de defesa como a presença de bombas de efluxo (Livermore, 2002; Japoni et al., 2006; Cox & Wright, 2013). Todos os isolados Gram-negativos testados apresentaram resistência a mais de uma classe de antimicrobianos o que contrasta com os trabalhos desenvolvidos por Japoni et al. (2006) e Ullah et al. (2009) nos quais 73% e 29%, respectivamente,

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade dos isolados Gram-negativos aos antimicrobianos

Isolados Gram-negativos		Antimicrobianos ^{1,2}																			
		AMC	AMP	ATM	CAZ	CFL	CFO	CIP	CLO	CPD	CRO	CTX	ETP	EST	GEN	IMP	MER	NIT	NOR	SUT	TET
Ambientais	<i>E. coli</i> 1DE14	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R	S	S	R	R	R	R
	<i>E. coli</i> 4EC05	R	R	I	S	R	R	S	R	S	S	I	S	R	S	S	S	I	S	R	R
	<i>K. pneumoniae</i> 1CE02	S	R	S	I	S	S	I	S	S	I	I	S	S	S	S	S	R	S	S	R
	<i>K. oxytoca</i> 2BS08	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
	<i>C. freundii</i> 1CC09	R	R	R	R	R	I	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R
	<i>C. koseri</i> 3EC04	S	R	S	S	I	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
	<i>C. koseri</i> 3CC04	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
	<i>E. intermedius</i> 1CC07	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	I	S	S	S	R	R	R	S
	<i>P. agglomerans</i> 3AE03	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	<i>P. mirabilis</i> 3DC01	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clínicos	<i>E. coli</i> 70	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R
	<i>K. pneumoniae</i> 15	R	R	R	I	R	R	I	S	R	R	R	R	I	R	R	R	I	I	S	S
	<i>K. pneumoniae</i> 222	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
	<i>K. oxytoca</i> 90	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	S	I	R	R	R	R
	<i>C. freundii</i> 17	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	R
	<i>E. cloacae</i> 62	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
	<i>E. cloacae</i> 49	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	I	I	R	R	R	S
	<i>P. aeruginosa</i> 54	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	<i>P. aeruginosa</i> 59	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
	<i>P. aeruginosa</i> 230	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	<i>P. mirabilis</i> 102	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	R
	<i>M. morgani</i> 162	R	R	S	S	R	I	R	R	R	I	I	I	S	R	I	S	R	R	R	R

¹AMC (amoxicilina+clavulanato), AMP (ampicilina), ATM (aztreonam), CAZ (ceftazidima), CFL (cefalotina), CFO (cefotaxima), CIP (ciprofloxacina), CLO (cloranfenicol), CPD (cefepodoxima), CRO (ceftriaxona), CTX (cefotaxima), ETP (ertapenem), EST (estreptomicina), GEN (gentamicina), IMP (imipenem), MER (meropenem), NIT (nitrofurantoína), SUT (sulfazotrim), TET (tetraciclina).

²R = Resistente; I = Intermediário; S = Sensível.

das cepas de *P. aeruginosa* apresentaram-se multirresistentes. Observou-se também que apenas a ceftazidima foi eficiente para a inibição do crescimento desta espécie, onde um isolado mostrou-se sensível e dois apresentaram resistência intermediária. Um estudo realizado por Neu & Labthavikul (1982) mostrou que a ceftazidima é mais ativa contra *P. aeruginosa* do que a cefotaxima, evidenciando a sua estabilidade frente a enzimas beta-lactamases.

Neste estudo, observou-se que os carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem) apresentaram uma maior atividade contra os isolados Gram-negativos testados (59%). Segundo Martínez et al. (2010), os carbapenêmicos são os antibióticos com maior espectro de ação, atividade e resistência a enzimas beta-lactamases. Alguns estudos contrastam com este resultado obtido, mostrando um aumento da resistência de bactérias da família Enterobacteriaceae a esta classe de antibióticos (Little et al., 2012; Drew et al., 2013; Duin et al., 2013).

A partir dos resultados de susceptibilidade foi selecionado um isolado multirresistente representante de cada espécie para ser utilizado no ensaio de otimização das condições de cultivo para produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) (Tabela 5).

Tabela 5. Isolados Gram-negativos multirresistentes selecionados para os ensaios de otimização das condições de cultivo para produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6).

<i>Enterobacter intermedius</i>	1CC07
<i>Proteus mirabilis</i>	3DC01
<i>Pantoea agglomerans</i>	3AE03
<i>Citrobacter koseri</i>	3CC04
<i>Klebsiella oxytoca</i>	90
<i>Escherichia coli</i>	70
<i>Enterobacter cloacae</i>	62
<i>Morganella morganii</i>	162
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
<i>Citrobacter freundii</i>	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	222

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do actinomiceto R18(6) no ensaio de dupla camada

O ensaio de dupla camada foi realizado para avaliar o potencial do isolado R18(6) em produzir metabólito(s) ativo(s) contra os isolados Gram-negativos resistentes a antimicrobianos comumente utilizados na clínica. O actinomiceto apresentou atividade contra 20 dos 22 isolados testados (Tabela 6). O actinomiceto R18(6) somente não inibiu o crescimento de dois isolados da espécie *P. aeruginosa*.

Atualmente, a maioria dos antimicrobianos usados clinicamente tem sua origem em produtos naturais microbianos (Pidot et al., 2014). O desenvolvimento de resistência para muitos destes compostos explica a importância da busca de novas drogas e de novas fontes. Os actinomicetos, tanto os isolados do solo quanto os endofíticos, são conhecidas e importantes fontes para estas finalidades (Gupte & Kulkarni, 2002; Castillo et al. 2003; Tian et al., 2004; Mehdi et al., 2006; Nimnoi et al., 2010; Elleuch et al., 2010; Sheeja et al., 2011; El-Shatoury et al., 2013).

Tabela 6. Resultados obtidos na avaliação da atividade do actinomiceto R18(6) através do ensaio da dupla camada.

Isolados Gram-negativos	Médias dos halos de inibição (mm)
<i>E. coli</i> 1DE14	48
<i>E. coli</i> 4EC05	56
<i>E. coli</i> 70	26
<i>K. pneumoniae</i> 1CE02	60
<i>K. pneumoniae</i> 222	47
<i>K. pneumoniae</i> 15	58
<i>K. oxytoca</i> 90	41
<i>K. oxytoca</i> 2BS08	54
<i>P. aeruginosa</i> 54	0
<i>P. aeruginosa</i> 59	21
<i>P. aeruginosa</i> 230	0
<i>C. freundii</i> 17	33
<i>C. freundii</i> 1CC09	35
<i>C. koseri</i> 3EC04	38
<i>C. koseri</i> 3CC04	47
<i>E. intermedius</i> 1CC07	55
<i>P. agglomerans</i> 3AE03	22
<i>E. cloacae</i> 62	62
<i>E. cloacae</i> 49	60
<i>M. morgani</i> 162	40
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	33
<i>P. mirabilis</i> 102	30

A ação contra bactérias Gram-negativas multirresistentes apresentada pelo isolado R18(6) evidencia o seu potencial como fonte de novos compostos antibióticos. Resultado semelhante foi exposto por Tanvir et al. (2013) os quais testaram a atividade de 42 actinomicetos endofíticos do gênero *Streptomyces* e constataram a atividade de 12 isolados contra patógenos nosocomiais multirresistentes dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e a espécie *Escherichia coli*.

4.3 Otimização das condições de cultivo do isolado R18(6) para a produção do(s) metabólito(s) ativo(s)

Inicialmente, para otimização das condições de cultivo, o extrato foi produzido utilizando-se 50 mL de meio base suplementado com 1% de glicose durante 10 dias a 30°C sob agitação constante de 100 r.p.m. Para melhorar a produção de metabólito(s) ativo(s) avaliou-se cinco parâmetros: fonte de carbono, temperatura, modo de incubação, pH e tempo de incubação. À medida que uma condição fosse sendo determinada como ótima para a produção de metabólito(s) ativo(s), uma nova condição passava a ser testada.

4.3.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono

Para otimização do meio de cultivo, foram avaliados, primeiramente, quatro fontes de carbono: amido, sacarose, glicerol e glicose. Por meio da técnica de difusão em poço, foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos produzidos nas condições de crescimento com diferentes fontes de carbono (Tabela 7). O extrato foi produzido durante 10 dias de incubação e a cada 24 horas foram realizados os ensaios de antibiose em duplicata. A atividade antimicrobiana foi obtida a partir das médias dos halos de inibição.

O extrato produzido com o crescimento do actinomiceto na presença da glicose destacou-se dos demais devido ao maior número de bactérias inibidas (82%) (Tabela 7). Somente as cepas *Pantoea agglomerans* 3AE03 e *Pseudomonas aeruginosa* 54 não foram inibidas pelo extrato produzido pelo isolado R18(6). Os extratos produzidos na presença de glicerol, sacarose e amido como fontes de carbono apresentaram resultados insatisfatórios, pois apenas quatro isolados foram inibidos utilizando-se glicerol como fonte de

carbono e para as demais o resultado foi inferior (Tabela 7). Este resultado demonstra que a síntese de compostos ativos a partir de micro-organismos não é fixa, podendo ser regulada por meio de modificações nas condições de cultivo (Al-Zahrani, 2007). Fguira et al. (2005) avaliaram cinco fontes de carbono (glicose, amido, glicerol, sacarose e frutose) e obtiveram maior atividade antimicrobiana do isolado *Streptomyces* US80 contra *Escherichia coli* utilizando glicose. Outros estudos também avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono e constataram que o meio suplementado com glicose favorece a produção de metabólitos ativos (Raytapadar & Paul, 2001; Gupte & Kulkarni, 2002; Sujatha et al., 2005; Al-Zahrani, 2007).

Tabela 7. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) após adição de diferentes fontes de carbono ao meio base.

Isolados Gram-negativos	Fontes de carbono / Médias dos halos de inibição (mm)			
	Glicose ^a	Glicerol ^b	Sacarose ^b	Amido ^b
<i>E. intermedius</i> 1CC07	16,0	15,0	0,0	0,0
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	15,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. agglomerans</i> 3AE03	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. koseri</i> 3CC04	16,5	0,0	0,0	0,0
<i>K. oxytoca</i> 90	17,5	16,0	0,0	15,0
<i>E.coli</i> 70	16,0	0,0	0,0	0,0
<i>E. cloacae</i> 62	16,0	0,0	0,0	0,0
<i>M. morgani</i> 162	15,0	0,0	0,0	0,0
<i>P.aeruginosa</i> 54	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. freundii</i> 17	17,3	18,0	13,0	0,0
<i>K. pneumoniae</i> 222	19,2	16,1	12,2	0,0

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.3.2 Avaliação de diferentes temperaturas e métodos de incubação

Para aperfeiçoar a condição de crescimento dos micro-organismos e a produção de um extrato bruto ativo, a temperatura de incubação foi avaliada na faixa de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C (Tabela 8). Os extratos foram produzidos durante 10 dias, sob agitação constante de 100 r.p.m. e utilizando-se 50 mL de meio base contendo 1% de glicose. A cada 24 horas, foi realizado o ensaio de atividade utilizando o método de difusão em poço. A atividade foi avaliada a partir das médias dos halos de inibição.

O extrato produzido na temperatura de 30°C apresentou um maior espectro de atividade, pois foi ativo contra um maior número de isolados (82%) (Tabela 8). De acordo com a avaliação estatística, a temperatura de 30°C diferiu significativamente ($p < 0,05$) das demais temperaturas. Assim, definiu-se esta temperatura como ideal para produção de metabólito(s) ativo(s) e para o crescimento do micro-organismo.

No ensaio com as temperaturas de 40°C e 45°C, não houve atividade antimicrobiana contra os isolados. Durante esses testes, observou-se também que não houve crescimento de massa celular indicando que as mesmas não são temperaturas ideais para o crescimento do actinomiceto em estudo. No entanto, quando a temperatura foi de 25°C houve crescimento, mas o extrato produzido nesta temperatura foi ativo contra apenas dois isolados (Tabela 8).

Um estudo realizado por Elleuch et al. (2010) avaliou a influência da temperatura (25, 30, 35 e 40°C) na produção de metabólitos ativos do isolado *Streptomyces* sp. TN262, no qual verificaram que a temperatura de 30°C

favoreceu a produção e o crescimento do micro-organismo. Outros estudos avaliando este parâmetro verificaram que a temperatura de 30°C é ideal para a produção de antibióticos ativos (Hassan et al., 2001; Gupte & Kulkarni, 2002; Sujatha et al., 2005; Selvin et al., 2009).

Tabela 8. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes temperaturas de incubação.

Isolados Gram-negativos	Temperatura / Médias dos halos de inibição (mm)		
	25°C ^b	30°C ^a	35°C ^b
<i>E. intermedius</i> 1CC07	0,0	16,0	13,0
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	13,2	14,5	12,5
<i>P. agglomerans</i> 3AE03	0,0	0,0	0,0
<i>C. koseri</i> 3CC04	0,0	17,0	12,0
<i>K. oxytoca</i> 90	0,0	17,4	13,0
<i>E. coli</i> 70	0,0	16,0	0,0
<i>E. cloacae</i> 62	12,5	16,0	0,0
<i>M. morgani</i> 162	0,0	14,0	0,0
<i>P. aeruginosa</i> 54	0,0	0,0	0,0
<i>C. freundii</i> 17	0,0	17,3	0,0
<i>K. pneumoniae</i> 222	0,0	19,1	14,0

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Em seguida à determinação da temperatura, foi realizado ensaio para verificar a influência dos métodos de incubação, agitação e estático, na produção do(s) metabólito(s) ativo(s). Para este ensaio, o extrato bruto foi produzido em 50 mL de meio base contendo 1% de glicose, sob agitação constante de 100 r.p.m. e sob modo estático (em estufa) durante 10 dias. A cada 24 horas, foi realizado o teste de difusão em poço com o extrato produzido. A atividade foi avaliada a partir das médias dos halos de inibição. A partir dos resultados obtidos, constatou-se que utilizando a agitação o extrato

produzido apresentou atividade contra um maior número de isolados (82%) (Tabela 9). Segundo Moore & Bushell (1997) a agitação é um fator importante para produção de antibiótico, pois culturas estáticas não recebem suprimento de oxigênio necessário para o metabolismo celular.

Tabela 9. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes modos de incubação.

Isolados Gram-negativos	Modo de incubação / Médias dos halos de inibição (mm)	
	Agitação	Estático
<i>E. intermedius</i> 1CC07	16,5	0,0
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	15,0	0,0
<i>P. agglomerans</i> 3AE03	0,0	0,0
<i>C. koseri</i> 3CC04	16,0	15,0
<i>K. oxytoca</i> 90	17,0	13,0
<i>E. coli</i> 70	16,0	0,0
<i>E. cloacae</i> 62	16,5	0,0
<i>M. morgani</i> 162	13,4	13,0
<i>P. aeruginosa</i> 54	0,0	0,0
<i>C. freundii</i> 17	17,0	13,0
<i>K. pneumoniae</i> 222	19,0	14,0

4.3.3 Avaliação do pH do meio de cultivo e do tempo de incubação

A fim de avaliar a influência do pH na produção de extrato ativo, foi utilizado 50 mL de meio base suplementado com 1% de glicose tamponado em pH 4, 4.5, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0. O extrato foi produzido durante 10 dias, a 30°C sob agitação constante de 100 r.p.m. No intervalo de 24 horas, foi realizado o ensaio de difusão em poço. A atividade do extrato foi avaliada a partir das médias dos halos de inibição. A partir da análise estatística, obteve-se que a atividade do extrato bruto das culturas com pH de 6.5 e 8.0 não diferiram entre

si, mas diferiram significativamente dos demais. O meio tamponado com pH 6.5 foi escolhido para ser utilizado nos demais ensaios, pois o extrato produzido neste pH apresentou atividade contra 100% dos isolados testados (Tabela 10).

Na avaliação do extrato produzido nos cultivos com valores de pH de 4.0, 4.5 e 5.0 não houve crescimento do actinomiceto.

Tabela 10. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes faixas de pH.

Isolados Gram-negativos		Valores de pH / Médias dos halos de inibição (mm)			
		pH 6,0 ^b	pH 6,5 ^a	pH 7 ^b	pH 8 ^a
<i>E. intermedius</i>	1CC07	13,0	17,0	16,9	14,1
<i>P. mirabilis</i>	3DC01	0,0	13,2	0,0	0,0
<i>P. agglomerans</i>	3AE03	0,0	13,0	0,0	14,0
<i>C. koseri</i>	3CC04	0,0	13,2	0,0	14,1
<i>K. oxytoca</i>	90	0,0	13,3	0,0	16,5
<i>E. coli</i>	70	0,0	14,7	0,0	0,0
<i>E. cloacae</i>	62	0,0	13,4	0,0	14,6
<i>M. morgani</i>	162	0,0	13,6	0,0	0,0
<i>P. aeruginosa</i>	54	0,0	13,9	0,0	15,0
<i>C. freundii</i>	17	11,8	13,7	15,6	0,0
<i>K. pneumoniae</i>	222	0,0	15,6	15,7	16,0

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

O pH é um dos parâmetros mais importantes no meio de cultura, pois exerce efeito direto sobre a atividade de muitas enzimas essenciais para o metabolismo do micro-organismo (Guimarães et al., 2004). Trenzchnikova et al. (2012) utilizou meio de cultivo em pH 6.5 no processo de fermentação da cepa *Streptomyces* spp. IMV-70 para a produção, isolamento e caracterização do composto antibiótico número 70. Outros autores relatam a importância da

avaliação do pH do meio de cultivo (Gupte & Kulkarni, 2002; Elleuch et al., 2010; El-Gendy & EL-Bondkly, 2010).

Logo após a determinação do pH, foi avaliado o tempo para otimização das condições de cultivo com objetivo de produzir metabólito(s) ativo(s) (Tabela 11). O extrato bruto foi produzido inoculando-se o actinomiceto R18(6) em 50 mL de meio base contendo 1% de glicose, ajustado em pH 6,5. A atividade foi avaliada a partir dos testes de difusão em poço realizados nos intervalos de 24 horas durante 10 dias de incubação a 30°C sob agitação constante de 100 r.p.m. O resultado foi obtido a partir das médias dos halos de inibição.

Tabela 11. Resultados obtidos na otimização da produção do(s) metabólito(s) ativo(s) pelo actinomiceto R18(6) em meio base com 1% de glicose submetido a diferentes tempos de incubação.

Isolados Gram-negativos	Tempo de incubação / Médias dos halos de inibição (mm)					
	72h ^{a,c}	96h ^a	120h ^{a,b}	168h ^{a,c}	216h ^b	240h ^c
<i>E. intermedius</i> 1CC07	0,0	0,0	0,0	12,8	0,0	14,8
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	14,8	13,0	11,8	13,0	0,0	13,5
<i>P. agglomerans</i> 3AE03	0,0	0,0	0,0	13,0	0,0	0,0
<i>C. koseri</i> 3CC04	12,3	13,5	0,0	14,5	0,0	0,0
<i>K. oxytoca</i> 90	12,8	14,0	13,3	0,0	0,0	0,0
<i>E. coli</i> 70	15,5	15,3	0,0	13,5	0,0	0,0
<i>E. cloacae</i> 62	12,3	14,5	13,3	13,5	0,0	0,0
<i>M. morgani</i> 162	13,8	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. aeruginosa</i> 54	0,0	13,8	12,0	17,0	0,0	13,0
<i>C. freundii</i> 17	0,0	17,5	13,5	0,0	12,5	0,0
<i>K. pneumoniae</i> 222	15,8	21,0	15,0	16,5	0,0	13,3

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

No pré-inóculo e nos tempos de 24, 48, 144 e 192 horas de incubação não houve inibição das bactérias Gram-negativas testadas, porém houve crescimento de massa celular evidenciando que estes tempos não são favoráveis para a produção de metabólitos ativos.

A partir da análise estatística, observou-se que há uma diferença significativa entre os tempos de incubação avaliados. A aplicação do teste de Tukey mostrou que os extratos produzidos nos tempos de 72, 96, 120 e 168 horas não diferem significativamente entre suas atividades. Dessa forma optou-se como tempo de incubação ideal o de 96 horas, pois o extrato produzido neste período foi ativo contra um maior número de isolados. O extrato somente não foi ativo contra *E. intermedius* 1CC07 e *P. agglomerans* 3AE03. Banga et al. (2008) e Sujatha et al. (2004) avaliaram a produção de metabólitos ativos a partir de isolados do gênero *Streptomyces* sp. e constataram que máxima concentração de antibióticos também ocorreu com 96 horas de incubação.

Após determinadas as condições de cultivo ótimas de crescimento do actinomiceto R18(6), para a produção do(s) metabólito(s) ativo(s), o extrato produzido nestas condições foi testado contra os 22 isolados selecionados para este trabalho (Tabela 12). O actinomiceto foi incubado em 50 mL de meio base suplementado com 1% de glicose, ajustado ao pH 6.5 e incubado a 30°C sob agitação constante de 100 r.p.m. Após preparação do pré-inóculo durante 48 horas, 3 mL do extrato foram transferidos para novos frascos contendo o mesmo volume de meio de cultura e incubados nas mesmas condições citadas acima. O ensaio de difusão em poço foi realizado após incubação de 96h. O

extrato bruto apresentou atividade contra 16 dos 22 isolados testados. As médias dos halos de inibição variaram entre 13 e 23 mm.

Tabela 12. Avaliação da atividade do extrato bruto otimizado frente a todos os isolados Gram-negativos selecionados.

Isolados Gram-negativos	Médias dos halos de inibição (mm)
<i>K. pneumoniae</i> 15	21,0
<i>K. pneumoniae</i> 222	17,5
<i>K. pneumoniae</i> 1CE02	15,0
<i>K. oxytoca</i> 90	15,0
<i>K. oxytoca</i> 2BS08	0,0
<i>C. koseri</i> 3CC04	13,0
<i>C. koseri</i> 3EC04	0,0
<i>E. coli</i> 70	15,5
<i>E. coli</i> 1DE14	13,0
<i>E. coli</i> 4EC05	0,0
<i>E. cloacae</i> 62	15,0
<i>E. cloacae</i> 49	18,5
<i>C. freundii</i> 17	18,0
<i>C. freundii</i> 1CC09	15,0
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	13,5
<i>P. mirabilis</i> 102	14,0
<i>M. morgani</i> 162	13,0
<i>E. intermedium</i> 1CC07	0,0
<i>P. agglomerans</i> 3AE03	0,0
<i>P.aeruginosa</i> 54	14,0
<i>P.aeruginosa</i> 59	23,0
<i>P.aeruginosa</i> 230	0,0

Um estudo realizado por Oliveira et al. (2010) avaliou a atividade do extrato produzido pelo isolado *Streptomyces* sp. R18(6) frente a fitopatógenos e constatou que as condições ideais de incubação para produção de extrato bruto ativo foram meio amido-caseína ajustado em pH 7.0 e temperatura de 30°C. Outro trabalho realizado por Spadari (2013) analisou a atividade do mesmo isolado contra fungos dermatófitos e leveduras do gênero *Candida*, no

qual se constatou a atividade apenas contra as leveduras utilizando o extrato bruto produzido em meio amido-caseína, sem ajuste do pH, com incubação a 30°C em um período de 72 horas. Estes estudos evidenciam o potencial e a diversidade de produção de compostos ativos pelo actinomiceto R18(6).

4.4 Curva de crescimento do actinomiceto endofítico

Com o objetivo de avaliar o tempo de geração do actinomiceto e correlacionar com a fase de produção do composto ativo, foi realizada uma curva de crescimento. A partir da análise da curva (Figura 1), observou-se que em 72 horas de crescimento o actinomiceto entra em fase estacionária.

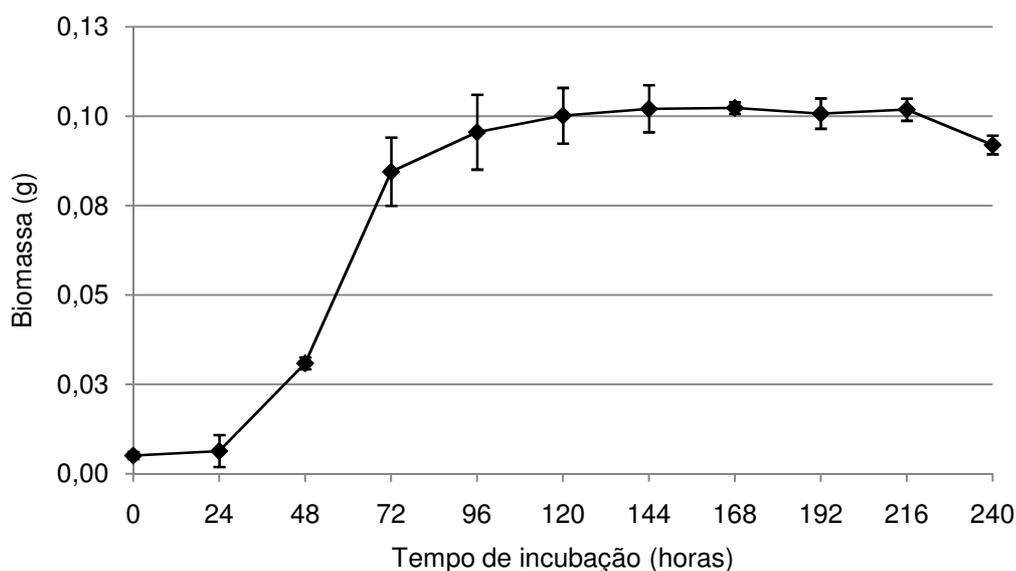


Figura 1 – Curva de crescimento do actinomiceto R18(6) durante 240 horas em meio base contendo 1% de glicose, ajustado ao pH 6.5 e incubado a 30°C com agitação de 100 r.p.m.

Analisando-se que, com 96 horas obteve-se o extrato ativo contra um maior número de isolados, pode-se afirmar que o metabólito ativo origina-se do metabolismo secundário. Segundo Bibb (2005), durante a fase

estacionária a limitação de nutrientes no meio proporciona a formação de metabólitos secundários.

4.5 Curva de variação do pH no meio de cultivo

A curva de variação do pH no meio de cultura foi realizada com objetivo de verificar se o actinomiceto R18(6) tinha capacidade de modificá-lo durante seu crescimento. Comparando-se os resultados obtidos com o valor inicial de pH 7.0, observou-se que o crescimento do actinomiceto diminui o pH do meio de cultura (Figura 2). Durante a fase estacionária, no período de 72 a 192 horas, o pH teve pouca variação, mantendo-se entre 6,0 e 6,5. Com 240 horas de incubação, o crescimento do isolado tornou o pH do meio mais ácido. Esta variação de pH pode ter ocorrido devido à utilização da glicose e a consequente formação de ácidos orgânicos pela via Embden-Meyerhof (glicólise) (Madigan et al., 2010).

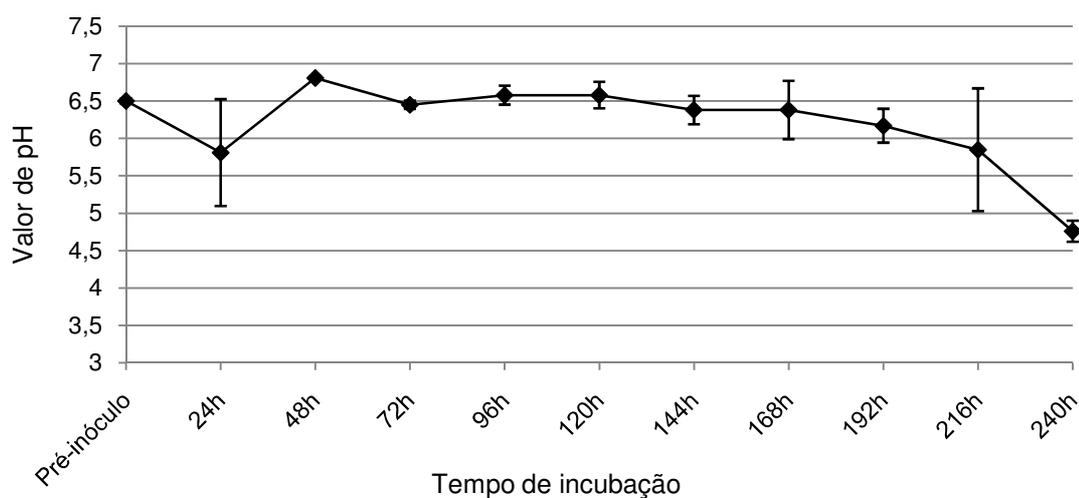


Figura 2. Curva de variação do pH no meio de cultivo durante 10 dias de incubação em meio base contendo 1% de glicose, a 30°C e com agitação de 100 r.p.m.

4.6 Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada por meio do teste de microdiluição conforme descrito na norma M7-A7 do CLSI (2006). Para este teste, o extrato foi produzido em 50 mL de meio base contendo 1% de glicose, ajustado ao pH 6.5, e incubado a 30°C sob agitação constante de 100 r.p.m. por 96 horas. O pré-inóculo foi preparado incubando-se o isolado durante 48 horas nas condições descritas acima. Após, alíquotas de 3 mL foram transferidas para novos frascos os quais foram incubados por 96 horas nas mesmas condições.

A viabilidade dos inóculos dos isolados Gram-negativos utilizados foi confirmada com o crescimento de colônias em placas contendo meio TSA. A CIM variou entre 1/32 e 1/128 com 24 horas de crescimento para três dos isolados testados: *E. cloacae* 49, *C. freundii* 17 e *K. pneumoniae* 15 (Tabela 13).

Durante 48 horas, houve crescimento do isolado *E. cloacae* 49 em todas as diluições. Com isso, pode-se afirmar que, para este isolado, o extrato produzido pelo isolado de actinomiceto é bacteriostático na concentração entre 1/128 e 1/256. Contudo, no mesmo período, não houve crescimento dos isolados *C. freundii* 17 e *K. pneumoniae* 15 até a concentração de 1/32, e, portanto, podemos considerar que o extrato é bactericida na concentração entre 1/32 e 1/64 para estes isolados.

Comparando-se os resultados da CIM para os dois isolados da espécie *E. cloacae*, observou-se que a cepa *E. cloacae* 49 foi inibida pelo extrato enquanto que *E. cloacae* 62 não. Isto pode ter ocorrido devido ao perfil de susceptibilidade e a mecanismos de resistências diferenciados dos isolados,

pois a *E. cloacae* 62 apresenta resistência a um maior número de antimicrobianos comparada com a outra cepa da mesma espécie (Tabela 4). Este mesmo resultado ocorreu com os isolados das espécies *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*. No caso da espécie *K. pneumoniae*, a cepa *K. pneumoniae* 222, sensível a 2 dos 20 antimicrobianos testados (Tabela 4), não foi inibida pelo extrato bruto diluído, porém, a cepa *K. pneumoniae* 15, sensível a 3 antimicrobianos (Tabela 4), foi inibida pela extrato diluído até 1/32. A espécie *C. freundii* 17, apesar de ser resistente a um maior número de antimicrobianos testados (Tabela 4) em relação à *C. freundii* 1CC09, foi inibida pelo extrato bruto ativo até a diluição de 1/64. Estes resultados evidenciam o potencial de produção de um novo composto a partir do actinomiceto R18(6), o qual se mostra ativo contra bactérias multirresistentes.

Para os isolados das espécies *K. oxytoca*, *C. koseri*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* não houve inibição do crescimento nas concentrações testadas. Isso pode ter ocorrido devido à diluição do metabólito ativo com a adição de meio de cultura líquido no ensaio, pois no teste de dupla camada (Tabela 6) e no teste de difusão em poço (Tabela 12) o extrato apresentou atividade contra todos estes isolados. Alguns trabalhos relatam uma maior atividade quando o micro-organismo é cultivado em meio sólido em relação ao cultivo em meio líquido, (Badji et al, 2005; Thakur et al, 2007; Anibou et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Salamoni et al., 2010). A diminuição ou perda de atividade do actinomiceto quando cultivado em meio líquido pode ser resultado de danos celulares durante o processo de agitação, da degradação do metabólito ativo (Iwai & Omura, 1982) e da necessidade de interação entre os

micro-organismos para indução da produção de composto ativo (Spadari, 2013).

Tabela 13. Resultados da concentração inibitória mínima em 24 horas de crescimento.

Isolados Gram-negativos	Concentrações testadas										
	Extrato	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
<i>K. pneumoniae</i> 15	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 222	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 1CE02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. oxytoca</i> 90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. koseri</i> 3CC04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 1DE14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i> 62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i> 49	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. freundii</i> 1CC09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i> i17	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. mirabilis</i> 102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. morgani</i> 162	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 230	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ com crescimento celular, - sem crescimento celular

A CIM para os isolados *P. agglomerans* 3AE03, *E. intermedius* 1CC07, *P. aeruginosa* 230, *E. coli* 4EC05, *C. koseri* 3EC04, *K. oxytoca* 2BS08 não foi determinada, pois o extrato não apresentou atividade contra estes isolados no teste de difusão em poço (Tabela 12).

4.7 Caracterização parcial do(s) metabólito(s) ativo(s)

4.7.1 Estabilidade frente a enzimas proteolíticas

A estabilidade do(s) composto(s) ativo(s) presente(s) no extrato bruto foi avaliada após tratamento do extrato com diferentes enzimas proteolíticas capazes de hidrolisar porções distintas de uma estrutura protéica. Para este ensaio, utilizou-se o extrato produzido pelo micro-organismo crescido em 50 mL de meio base contendo 1% de glicose, ajustado ao pH 6.5, incubado na temperatura de 30°C e sob agitação constante de 100 r.p.m. O extrato foi produzido durante 96 horas de incubação. Para este ensaio, uma solução contendo 400 µL do extrato bruto e a enzima, com concentração final de 2mg/mL, foi acondicionada em microtubo e incubada a 37°C durante 1 hora. A avaliação da estabilidade do composto frente à enzima foi avaliada por meio do teste de difusão em poço. O resultado foi obtido por meio do cálculo da atividade residual enzimática. Após análise estatística, foi observado que houve diferença significativa entre os tratamentos com as diferentes enzimas testadas. O extrato manteve 94%, 82% e 77% da sua atividade após o tratamento com as enzimas tripsina, papaína e lisozima, e proteinase K, respectivamente. Com a enzima pepsina, a atividade do extrato foi completamente inibida.

As enzimas, utilizadas no presente trabalho, são classificadas como endopeptidases por clivarem ligações peptídicas distantes dos grupos carboxila e amino terminais (Bender & Kézdy, 1965; Chipman & Sharon, 1969; Ebeling et al., 1974). A pepsina é uma proteinase responsável pela clivagem de ligações peptídicas formadas pelos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina (Fruton et al., 1961; Knowles, 1970). A avaliação da estabilidade frente a enzimas proteolíticas permitiu identificar que o metabólito ativo possui ligações peptídicas que, quando hidrolisadas, promovem a perda de atividade. Pei et al. (2013) avaliaram a estabilidade da bacteriocina produzida por *Lactobacillus paracasei* CICC 20241 frente a diversas enzimas (proteinase K, pepsina, papaína, tripsina e quimiotripsina). A atividade do metabólito foi completamente inibida pelas cinco enzimas evidenciando que uma porção peptídica é responsável pela sua atividade.

4.7.2 Termoestabilidade

O extrato bruto foi submetido a banho de água com diferentes temperaturas para avaliação da termoestabilidade do(s) composto(s) ativo(s). Para este teste, foi utilizada uma solução contendo 400 µL de extrato bruto.

Primeiramente, o extrato passou por um processo de aquecimento de 30°C a 90°C, com variações de 15 e 30 minutos nos tempos de incubação (Figura 3). A avaliação da atividade do extrato após o tratamento térmico foi realizada por meio do teste de difusão em poço. Os resultados foram obtidos a partir das médias dos halos de inibição.

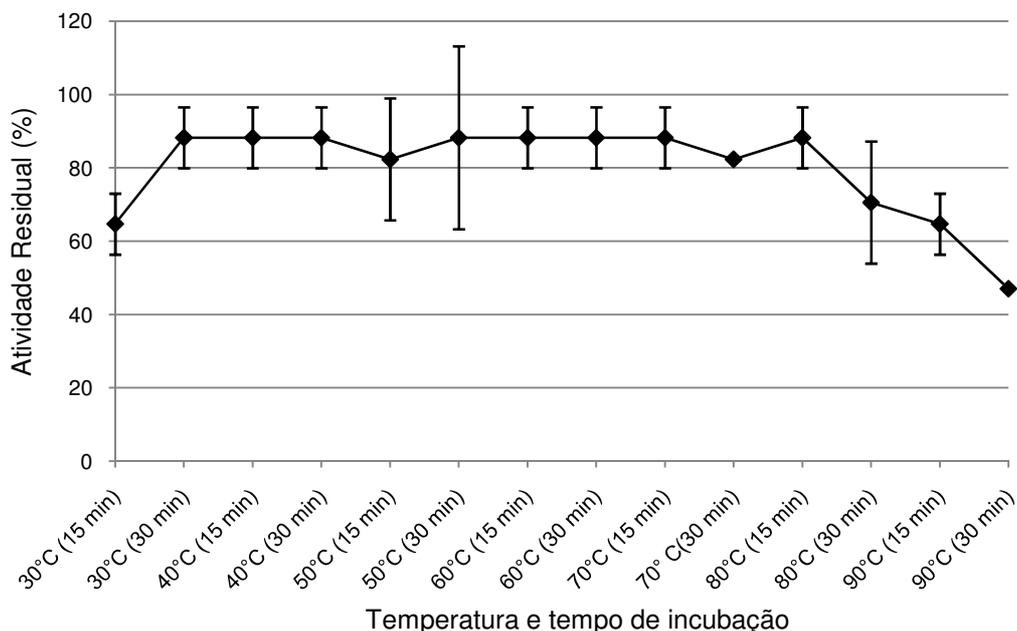


Figura 3. Curva de atividade residual obtida no teste de termoestabilidade do extrato bruto do actinomiceto R18(6) no intervalo de temperatura entre 30°C e 90°C com avaliação sendo realizada nos intervalos de tempo de 15 e 30 minutos.

Neste ensaio, a atividade residual variou entre 47% e 88% tendo como média 80%. O tratamento de 90°C por 30min apresentou uma redução de 42% na atividade do extrato. Entretanto, após análise estatística, constatou-se que os tratamentos não diferiram significativamente entre si. Esses resultados sugerem, então, que o extrato ativo pode ser submetido a temperaturas de até 80°C, na qual mantém 70% de sua atividade.

A estabilidade do extrato ativo foi também avaliada frente à temperatura de ebulição em diferentes tempos de incubação (3, 5, 10, 15 e 30 minutos). Após o extrato ser submetido à fervura durante 3 minutos, observou-se que a atividade residual diminuiu progressivamente até cessar aos 30 minutos de incubação. Com isso, pode-se afirmar que o(s) composto(s) ativo(s)

presente(s) no extrato bruto apresenta(m) uma estrutura química incapaz de tolerar temperaturas elevadas por longos períodos de tempo.

Kawamoto et al. (2002) avaliaram a estabilidade térmica da mundticina KS, uma bactericina produzida por *Enterococcus mundtii* NFR1 7393, e constataram que este peptídeo manteve 100% e 60% de sua atividade residual após o tratamento com temperaturas de 90°C e 100°C, respectivamente, durante 60 minutos. Outros autores também relatam a estabilidade de metabólitos ativos frente a amplas faixas de temperatura (Fontoura et al., 2009; Xie et al., 2009; Pei et al., 2013; Sabia et al., 2014). A estabilidade térmica de moléculas protéicas pode estar relacionada a fatores intrínsecos associados às estruturas primária e secundária como, por exemplo, a presença de ligações dissulfeto, que favorecem a estabilização da molécula (Gomes et al., 2007; Pei et al., 2013).

4.8 Extração de metabólitos ativos

A extração de compostos ativos do extrato bruto foi realizada pelo método líquido-líquido no qual, após a separação, as frações orgânicas e aquosas foram recolhidas. Posteriormente, as frações foram processadas para que as atividades pudessem ser avaliadas.

Para este ensaio, foram utilizados oito solventes: diclorometano, acetona, hexano, acetato de etila, etanol, isopropanol, isobutanol e ácido acético. Após a evaporação do solvente das frações orgânicas, os extratos foram ressuspensos com o mesmo solvente usado no processo de extração, água destilada e tampão fosfato salino e a atividade antibiótica foi avaliada por

meio do ensaio de difusão em poço. Observou-se que as frações orgânicas não apresentaram atividade contra os isolados Gram-negativos testados.

Na avaliação das frações aquosas coletadas no processo de extração, apenas a fração oriunda da extração com acetona apresentou atividade. Durante a extração com acetona houve a formação de um precipitado branco. Este precipitado foi testado quanto à sua atividade e observou-se a formação de halos de inibição médios entre 15 e 33 mm (Tabela 14). O precipitado, após passar por processo de secagem, foi também avaliado quanto à sua atividade e observou-se que não houve alteração no tamanho dos halos de inibição. Assim, a acetona mostrou-se eficiente como solvente extrator no processo de purificação do(s) composto(s) ativo(s). Fguira et al. (2005) utilizaram acetona como solvente para extração de metabólitos ativos a partir do micélio liofilizado da cepa *Streptomyces* sp. US80.

Segundo Mehdi et al. (2006), os metabólitos secundários são, geralmente, extracelulares e seu isolamento do meio de cultura requer diversas etapas como extração, precipitação, cromatografia e purificação. A acetona é geralmente utilizada para precipitação de proteínas do meio, pois diminui a constante isoelétrica da água e favorece a atração entre as moléculas protéicas (Crowell et al, 2013).

Tabela 14. Avaliação da atividade do precipitado formado a partir da extração com acetona.

Isolados Gram-negativos	Médias dos halos de inibição (mm)
<i>E. coli</i> 70	18,0
<i>P. mirabilis</i> 3DC01	17,0
<i>P. aeruginosa</i> 59	15,0
<i>K. pneumoniae</i> 15	33,0

4.9 Microcultivo do actinomiceto

Algumas características para classificação do actinomiceto em nível de gênero são observadas na análise do microcultivo sobre microscopia óptica. Analisando o microcultivo do isolado R18(6) verificou-se a presença de micélio aéreo com cadeias de esporos espiraladas na extremidade (Figura 4) que são algumas das características do gênero *Streptomyces*.

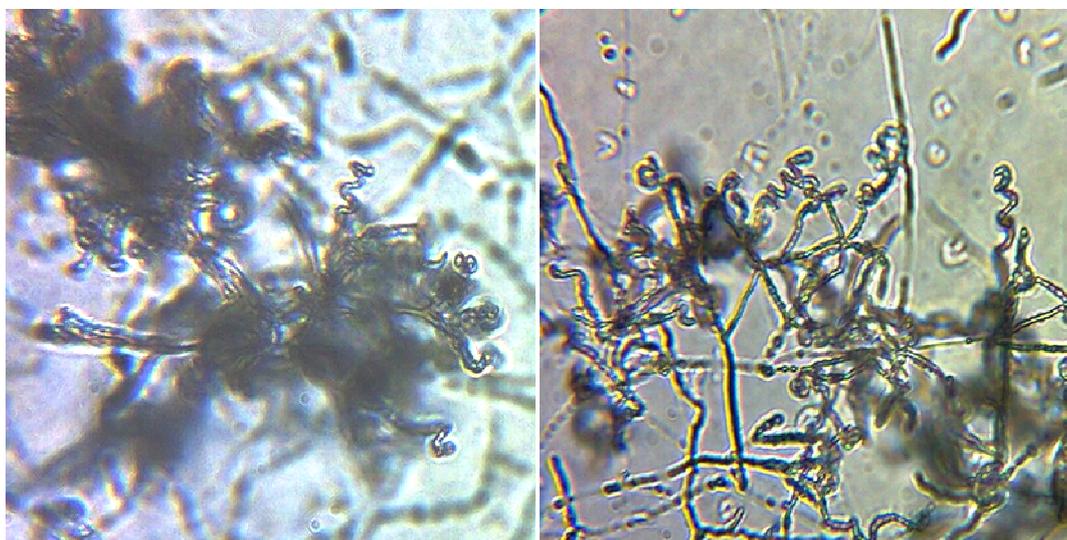


Figura 4. Visualização do microcultivo do actinomiceto R18(6) em microscópio óptico (400x).

4.10 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, verificou-se a presença de hifas septadas e de esporos com superfície lisa (Figura 5), característicos do gênero *Streptomyces*.

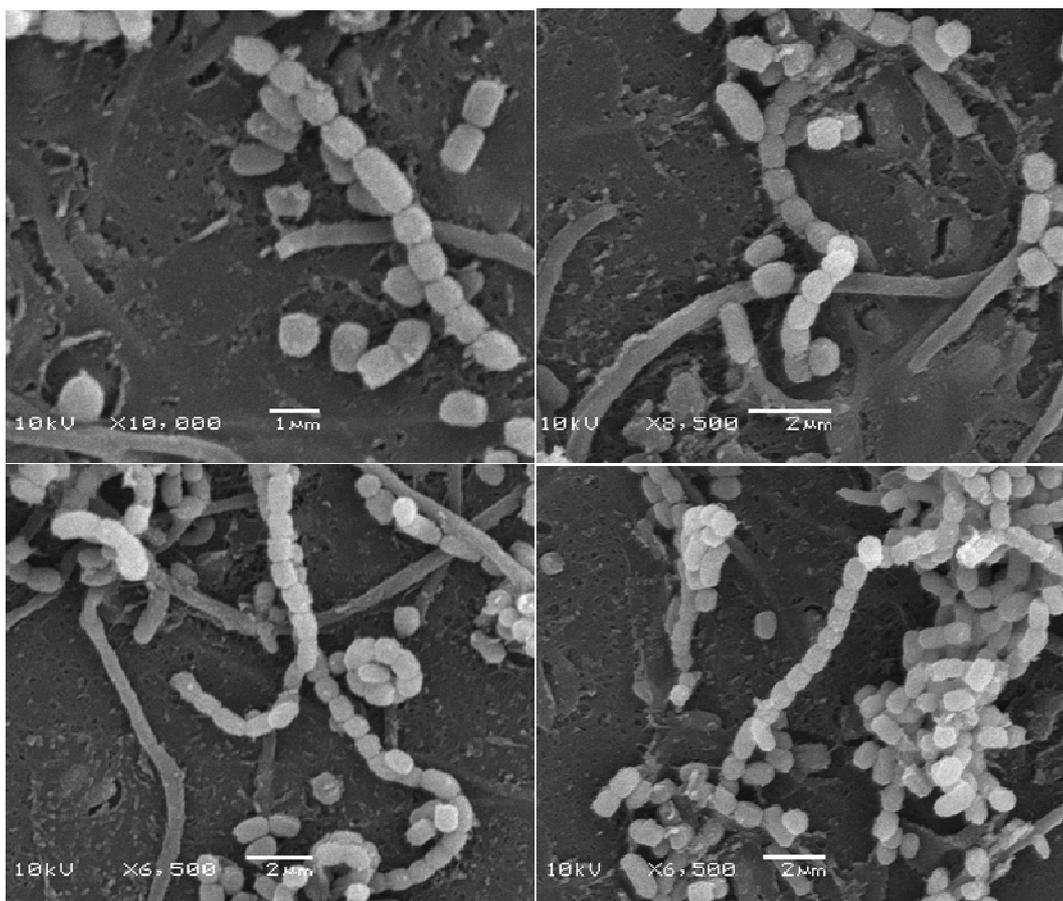


Figura 5. Visualização do microcultivo do actinomiceto R18(6) em microscópio eletrônico de varredura.

Na caracterização por microscopia eletrônica do mesmo isolado R18(6) feita por Oliveira et al. (2010) e por Spadari (2013), utilizando a mesma técnica de microscopia, foi descrita a presença de hifas aéreas contendo longas cadeias de esporos, com superfície lisa, dispostas em espiral.

5. CONCLUSÃO

Os isolados Gram-negativos de origem ambiental e clínica apresentaram-se multirresistentes às classes de antimicrobianos testadas.

O actinomiceto endofítico R18(6) mostrou potencial para a produção de metabólito(s) ativo(s) contra bactérias Gram-negativas multirresistentes. Para a produção deste(s) metabólito(s), as condições de cultivo ideais foram utilizando o meio base suplementado com 1% de glicose, pH ajustado para 6.5, com temperatura de incubação de 30°C sob agitação constante por 96 horas.

O(s) metabólito(s) ativo(s) produzido(s) pelo actinomiceto R18(6) possui(m) uma estrutura constituída por ligação peptídica e estável a temperaturas de até 80°C. Este(s) metabólito(s) pode(m) ser isolado(s) do meio de cultura utilizando-se a extração líquido-líquido com acetona como solvente extrator.

O actinomiceto endofítico R18(6) possui características micromorfológicas do gênero *Streptomyces*.

6. PERSPECTIVAS

- Purificar o(s) metabólito(s) ativo(s) por meio da técnica de cromatografia em coluna.
- Identificar o(s) metabólito(s) ativo(s) por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massa.
- Identificar a estrutura molecular do(s) metabólito(s) ativo(s) por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

7. REFERÊNCIAS

- ACOLET, D.; AHMET, Z.; HOUANGT, E.; HURLEYF, R.; KAUFMANN, M. E. *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit: account of an outbreak and its relationship to use of third generation cephalosporins. **Journal of Hospital Infection**. v.28, p. 273-286. 1994.
- AGRAWAL, D.; MAHAPATRA, A. K. Vertically acquired neonatal *Citrobacter* brain abscess – case report and review of the literature. **Journal of Clinical Neuroscience**. v.12, n.2, p.188-190. 2005.
- AL-ZAHRANI, S. H. M. Studies of the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from Jazan. **Journal of King Abdulaziz University: Science**. v.19, p. 127-138. 2007
- ALMEIDA, A.C.S.; CAVALCANTI, F.L.S.; MARTINS, W.M.B.; VILELA, M.A.; GALES, A.C.; JUNIOR, M.A.M.; MORAISA, M.M.C. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n. 8, p. 4077–4078. 2013.
- ANIBOU, M.; CHAIT, A.; ZYAD, A.; TAOURIRT, M.; OUHDOUCH, Y.; BENHERREF, A. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p. 2019–2025. 2008.
- AVENT, M. L.; ROGERS, B. A.; CHENG, A. C.; PATERSON, D. L. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal Medicine Journal**. v.41, p. 441-449. 2011.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI H.; MATHEE K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**. v. 41, n.1, p. 1-20. 2013.
- BALTZ, R.H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 8, p. 557-563. 2008.
- BADJI, B.; RIBA, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Antifungal activity of a saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 15, p. 211–219. 2005.

BANGA, J.; PRAVEEN, V.; SINGH, V.I.; TRIPATHI, C.K. M.; BIHARI, V. Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete. **Medicinal Chemistry Research**. v. 17, p. 425-436. 2008.

BENDER, M. L.; KÉZDY, F. J. Mechanism of action of proteolytic enzymes. **Annual Review of Biochemistry**. v. 34, p. 49-76. 1965.

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDEN, A. M.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K.D.; HARRIS, D.E.; QUAIL M.A.; KIESER H. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**. v. 417, p. 141-147. 2002.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**. v. 58, n. 1, p. 1-26. 2005.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, p. 208-215. 2005.

BREATHNACH, A.S. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**. v. 41, n. 11, p. 649-653. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar Salvador. 1 ed. 2004.

BRITO-CUNHA, C.C.Q.; CAMPOS I.T.N.; FARIA F.P.; BATAUS, L.A.M. Screening and xylanase production by *Streptomyces* sp. grown on lignocellulosic wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 170, p. 598-608. 2013.

CASCIO, A.; MEZZATESTA, M.L.; ODIERNA, A.; BERNARDO, F. D.; BARBERI, G.; IARIA, C.; STEFANI, S.; GIORDANO, S. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* ventriculitis successfully treated with intraventricular colistin. **International Journal of Infectious Diseases**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.11.012>

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M.A.M.; TELOW, D. B. et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**. v. 148, p. 2675-2685. 2002.

CASTILLO, U.F.; HARPER, J.K.; STROBEL, G.A.; SEARS, J.; ALES, K.; EUGENE, F.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H. et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an

endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 224, p. 183-190. 2003.

CASTILLO, U.F.; BROWNE, L.; STROBEL, G.; HESS, W.M.; EZRA, S.; PACHEDO, G.; EZRA, D. Biologically active endophytic Streptomyces from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. **Microbial Ecology**. v. 53, p. 12-19. 2007.

CHALLIS, G.; HOPWOOD, D.A. Synergic and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 2, p. 14555-14561. 2003.

CHANG, W.; TSAI, Y.; CHIEN, C.; HUANG, C.; LU, C. Frequent association with neurosurgical conditions in adult *Proteus mirabilis* meningitis: report of five cases. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 104, p. 121–124. 2002.

CHATER, K.F. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. **Microbiology**. v. 144, p. 1465-1478. 1998.

CHAUDHURI, R.R.; HENDERSON, I.R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 12, p. 214–226. 2012.

CHEN C. W.; HUANG C.; LEE H.; TSAI H.; KIRBY R. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. **Trends in Genetics**. v.18, n.10, p. 522-529. 2002.

CHEN, Y.; SMANSKI, M.J.; SHEN, B. Improvement of secondary metabolite production in *Streptomyces* by manipulating pathway regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 86, p. 19-25. 2010.

CHEN, S.; HU, F.; LIU, Y.; ZHU, D.; WANG, H.; ZHANG, Y. Detection and spread of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* in a teaching hospital in China. **American Journal of Infection Control**. v. 39, n. 9, p. e55-e60. 2011.

CHEPLICK, G.P.; CLAY, K.; MARKS, S. Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. **New Phytologist**. v. 111, p. 89-97. 1989.

CHIPMAN, D. M.; SHARON, N. Mechanism of lysozyme action. **Science**. v. 165, p. 454-465. 1969.

CLAESSEN, D.; JONG, W.; DIJKHUIZEN, L.; WÖSTE, H.A.B. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! **Trends in Microbiology**. v.14, n.7, p. 313-319. 2006.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.; CURRIE, C. The natural history of antibiotics. **Current Biology**. v. 19, n. 11, p. 437-441. 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 7th ed. v. 26, n. 2. M7-A7.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. 10th ed. v. 29, n. 1. M02-A10.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22 Information supplement. v. 32, n. 3. M100-S22.

COKER, C.; POORE, C.A.; LI, X.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and Infection**. v. 2, p. 1497-1505. 2000.

COUDRON, P.E.; MOLAND, E.S.; THOMSON, K.S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, p. 1791-1796. 2000.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 303, p. 287-292. 2013.

CRAWFORD, D. L.; LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M.; OUSLEY, M. A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, n. 11, p. 3899-3905. 1993.

CROWELL, A.M.J.; WALL, M.J.; DOUCETTE, A.A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**. v. 796, p. 48-54. 2013.

CRUZ, A.T; CAZACU, A.C.; ALLEN, C.H. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 6, p. 1989-1992. 2007.

DALBEN, M.; VARKULJA, G.; BASSO, M.; KREBS, V.L.J.; GIBELLI, M.A.; HEIJDEN, I.; ROSSI, F.; DUBOC, G.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. **Journal of Hospital Infection**. v. 70, p. 7-14. 2008.

DAVIS, B.D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. **Microbiological Reviews**. v. 51, n. 3, p. 341-350. 1987.

DECRÉ, D.; BURGHOFFER, B.; GAUTIER, V.; PETIT, J.; ARLET, G. Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum β -

lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, p. 881–888. 2004.

DELÉTOILE, A.; DECRÉ, D.; COURANT S.; PASSET, V.; AUDO, J.; GRIMONT, P.; ARLET, G.; BRISSE, S. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, p. 300-310. 2009.

DELDEN, C.V.; IGLEWSKI, B.H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerging Infectious Diseases**. v. 4, n. 4, p. 551-560. 1998.

DEVILLERS, J.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F. The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. **Chemosphere**. v. 19, n. 10/11, p. 1693-1700. 1989.

DIANCOURT, L.; PASSET, V.; VERHOEF, J.; GRIMONT, P.A.D.; BRISSE, S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 8, p. 4178-4182. 2005.

DORAN, T.I. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: Review. **Clinical Infectious Diseases**. v. 28, p. 384-94. 1999.

DREW, R.J.; TURTON, J.F.; HILL, R.L.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N.; PAULUS, S.; CUNLIFFE, N.A. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a UK pediatric hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 84, p. 300-304. 2013.

DUIN, D.; KAYE, K.S.; NEUNER, E.A.; BONOMO, R.A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 75, p. 115-120. 2013.

DZEING-ELLA, A.; SZWEBEL, T. A.; LOUBINOUX, J.; COIGNARD, S.; BOUVET, A.; JEUNNE, C.; ASLANGUL, E. Infective endocarditis due to *Citrobacter koseri* in an immunocompetent adult. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 12, p. 4185-4186. 2009.

EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H.D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **European Journal of Biochemistry**. v. 47, p. 91-97. 1974.

ELEMAM, A.; RAHIMIAN, J.; MANDELL, W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**. v. 29, p. 271-274. 2009.

EL-GENDY, M.M.A.; EL-BONDKLY, A.M.A. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes

and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya 48. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 37, p. 831-841. 2010.

ELLEUCH, L.; SHAABAN, M.; SMAOUI, S.; MELLOULI, L.; KARRAY-REBAI, I.; FGUIRA, L.F.; SHAABAN, K.A.; LAATSCH, H. Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 162, p. 579-593. 2010.

EL-SHATOURY, S.A.; EL-KRALY, O.A.; TRUJILLO, M.E.; EL-KAZZAZ, W.M.; EL-DIN, E.G.; DEWEDAR, A. Generic and functional diversity in endophytic actinomycetes from wild compositae plant species at South Sinai e Egypt. **Research in Microbiology**. v. 164, p. 761-769. 2013.

ENSIGN, J.C. Formation, properties and germination of actinomycetes spores. **Annual Review of Microbiology**. v. 32, p. 185-219. 1978.

EZRA, D.; CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; CONDRON, M.A.M.; TEPLow, D.B.; SEARS, J.; MARANTA, M. et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**. v. 150, p. 785-793. 2004.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **Nature Biotechnology**. v. 24, n. 12, p. 1497-1503. 2006.

FGUIRA, L.F.; FOTSO, S.; MEHDI, R.B.A.; MELLOULI, L.; LAATSCH, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. **Research in Microbiology**. v. 156, p. 341-347. 2005.

FLEGG, P. J.; MANDAL, B. K. *Citrobacter freundii* bacteraemia presenting as typhoid fever. **Journal of Infection**. v. 18, n. 2, . 171-173. 1989.

FRUTON, J.S.; FUJII, S.; KNAPPENBERGER, M.H. The mechanism of pepsin action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 47, p. 159-761.1961.

FONTOURA, R.; SPADA, J.C.; SILVEIRA, S.T.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 205-213. 2009.

FUENTEFRÍA, D.B.; FERREIRA, A.E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 5, p. 470-473. 2008.

GAIBANI, P.; AMBRETTI, S.; FARRUGGIA, P.; BUA, G.; BERLINGERI, A.; TAMBURINI, M. V.; CORDOVANA, M.; GUERRA, L.; MAZZETTI, M.; RONCARATI, G. et al. Outbreak of *Citrobacter freundii* carrying VIM-1 in an Italian Hospital, identified during the carbapenemases screening actions. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 17, p. 714-717. 2013.

GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEJ, A.; MIELCAREK, C.; IZARD D.; KERSTERS, K.; LEY, J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 39, n. 3, p. 337-345. 1989.

GAYNES, R; EDWARDS, J. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. **Healthcare epidemiology**. v. 41, p. 848-854. 2005.

GIBB, A.P.; TRIBUDDHARAT, C.; MOORE, R.A.; LOUIE, T.J.; KRULICKI, W.; LIVERMORE, D.M.; PALEPOU, M.I.; WOODFORD, N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*IMP allele, *bla*IMP-7. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 1, p. 255-258. 2002.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**. v. 30, n. 1, p. 136-145. 2007.

GUIMARÃES, L.M.; FURLAN, R.L.A., GARRIDO, L.M.; VENTURA, A., PADILLA, G.; FACCIOTTI, M.C.R. Effect of pH on the production of the antitumor antibiotic retamycin by *Streptomyces olindensis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 40, p. 107-111. 2004.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibiótico: importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v. 33, n. 3, p. 667-679. 2010.

GUPTE, M.D.; KULKARNI, P.R. A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35, p. 22-26. 2002.

HAKYEMEZ, I.N.; SIT, M.; AKTAS, G.; TAS, T.; MENGELOGLU, F.Z.; KUCUKBAYRAK, A. A case of giant hepatic hydatid cyst infected with *Morganella morganii* and the literature review. **Case Reports in Gastrointestinal Medicine**. 2012.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 895-914. 1997.

HAMZAOUI, A.; SALEM, R.; KOUBAAC, M.; ZRIG, M.; MNIF, H.; ABID, A.; GOLLI, M.; MAHJOUBA, S. *Escherichia coli* osteomyelitis of the ischium in an adult. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**. v. 95, p. 636-638. 2009.

HANCOCK, R.R.W.; BRINKMAN, F.S.L. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. **Annual Review of Microbiology**. v. 56, p. 17-38. 2002.

HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. **Actinomycetologica**. v. 20, n. 2, p. 72-81. 2006.

HASSAN, M.A.; EL-NAGGAR, M.Y.; SAID, W.Y. Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. **Egyptian Journal of Biology**. v. 3, p. 1-10. 2001.

HWANG, K.; KIM, H.U.; CHARUSANTI, P.; PALSSON, B.; LEE S.Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.008>

IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; SHINOSE, M.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M.; OMURA, S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature Biotechnology**. v. 21, p. 526-531. 2003.

IWAI, Y.; OMURA, S. Culture conditions for screening of new antibiotics. **The Journal of Antibiotics**. v. 35, n. 2, p. 123-141. 1982.

JANICKA, G.; KANIA I.; ULATOWSKA, B.; KRUSZYŃSKA, E.; WOJDA, M. The occurrence of the *Enterobacter* genus rods in the clinical materials and materials taken from hospital environment. **Wiadomosci Lekarskie**. v. 52, n. 11/12, p. 554-558. 1999.

JANSO, J.E.; CARTER, G.T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 13, p. 4377-4386. 2010.

JAPONI, A.; ALBORZI, A.; KALANI, M.; NASIRI, J.; HAYATI, M.; FARSHAD, S. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. **Burns**. v. 32, p. 343-347. 2006.

JOMBO, G.T.A.; EMANGHE, U.E.; AMEFULE, E.N.; DAMEN, J.G. Nosocomial and community acquired uropathogenic isolates of *Proteus mirabilis* and antimicrobial susceptibility profiles at a university hospital in Sub-Saharan Africa. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 2, p. 7-11. 2012.

JONES, M.E.; DRAGHI, D.C.; THORNSBERRY, C.; KARLOWSKY, J.A.; SAHM, D.F.; WENZEL, R.P. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North American surveillance study (2000–2002). **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 3, n. 14, p. 1-11. 2004.

KAWAMOTO, S.; SHIMA, J.; SATO, R; EGUCHI, T.; OHMOMO, S.; SHIBATO, J.; HORIKOSHI, N.; TAKESHITA, K.; SAMESHIMA, T. Biochemical and genetic characterization of mundtacin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 3830-3840. 2002.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 74, p. 65-76. 1999.

KNOWLES, J.R. On the mechanism of action of pepsin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 257, p. 135-146. 1970.

KO, W.; PATERSON, D.L.; SAGNIMENI, A.J.; HANSEN, D.S.; GOTTBORG, A.V.; MOHAPATRA, S.; CASELLAS, J.M.; GOOSSENS, H.; MULAZIMOGLU, L.; TRENHOLME, G. et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. **Emerging Infectious Diseases**. v. 8, n. 2, p. 160-166. 2002.

KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C.A.; COLLINS, J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell**. v. 130, p. 797–810. 2007.

KONEMAN, E.W. ; WILLIAM, M.J. ; SCHRECKENBERGER, P.C. ; WINN, W.C.; ALLEN, S.D. ; WOODS, G.L. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAMBERT, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, p. 1471-1485. 2005.

LECHEVALIER, H.; LECHEVALIER, M.P. Biology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**. v. 21, p. 71-100. 1967.

LEVIN, A.S.; BARONE, A.A.; PENÇO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.G.; MANRIQUE, E.I.; COSTA, S.F. Intravenous colistin as therapy for osocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 28, p.1008-1011, 1999.

LI, F.; JIANG, P.; ZHENG, H.; WANG, S.; ZHAO, G.; QIN, S.; LIU, Z. Draft genome sequence of the marine bacterium *Streptomyces griseoaurantiacus* M045, which produces novel manumycin-type antibiotics with a pABA core component. **Journal of Bacteriology**. v. 193, n. 13, p. 3417-3418. 2011.

LITTLE, M.L.; QIN, X.; ZERR, D.M.; WEISSMAN, S.J. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 39, p. 52-57. 2012.

LIVERMORE, D.M. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 8, n. 4, p. 557-588. 1995.

LIVERMORE, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Antimicrobial Resistance**. v. 34, p. 634-640. 2002.

LOWE, C.; WILLEY, B.; O'SHAUGHNESSY, A.; LEE, W.; LUM, M.; PIKE, K.; LAROCQUE, C.; DEDIER, H.; DALES, L.; MOORE, C. et al. Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* Infections Associated with Contaminated Handwashing Sink. **Emerging Infectious Diseases**. v. 18, n. 8, p. 1242-1247. 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTÍNEZ, M.J.F.; GARCÍA, M.I.G.; SÁNCHEZ, E.G.; SÁNCHEZ, J.E.G. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 28, n. 2, p. 53-64. 2010.

MAUCH, R.M.; LEVY, C.E. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis as a diagnostic tool: a systematic review. **Journal of Cystic Fibrosis**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2014.01.005>

MEHDI, R.B.A.; SIOUD, S.; FGUIRA, L.F.B.; BEJAR, S.; MELLOULI, L. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 1506-1513. 2006.

MÉNARD, A.; HARAMBAT, J.; PEREYRE, S.; PONTAILLER, J.; MÉGRAUD, F.; RICHER, O. First Report of Septic Arthritis Caused by *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 8, p. 3021-3023. 2010.

MONROE, S.; POLK, R. Antimicrobial use and bacterial resistance. **Current Opinion in Microbiology**. v. 3, p. 496-501. 2000.

MOORE, J.; BUSHELL, E. The effect of morphology and oxygen uptake on penicillin production by *Aspergillus nidulans* in submerged culture. **Mycological Research**. v. 101, n. 10, p. 1237-1241. 1997.

MOURA, M.E.B.; CAMPELO, S.M.A.; BRITO, F.C.P.; BATISTA, O.M.A.; ARAÚJO, T.M.E.; OLIVEIRA, A.D.S. Infecção hospitalar: estudo de prevalência

em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 60, n. 4, p. 416-21. 2007.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PEALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007. v.1

NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Natural Product Reports**. v. 26, n. 11, p. 1362-1384. 2009.

NEU, H.C.; LABTHAVIKUL, P. Comparative in vitro activity of N-formimidoyl thienamycin against Gram-positive and Gram-negative aerobic and anaerobic species and its β -lactamase stability. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 21, n. 1, p. 180-187. 1982.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 593-656. 2003.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by *Actinomycetes*-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 38, p. 595-601. 2010.

NISHINO, Y.; DEGUCHI, T.; YASUDA, M.; KAWAMURA, T.; NAKANO, M.; KANEMATSU, E.; OZEKI, S.; KAWADA, Y. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 154, p. 409-414. 1997.

NOGUEIRA, P.S.F.; MOURA, E.R.F.; COSTA, M.M.F.; MONTEIRO, W.M.S.; BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de Enfermagem UERJ**. v. 17, n. 1, p. 96-101. 2009.

O'HARA, C.M.; STEWARD, C.D.; WRIGHT, J.L.; TENOVER, F.C.; MILLER, J. M. Isolation of *Enterobacter intermedium* from the gallbladder of a patient with cholecystitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 10, p. 3055-3056. 1998.

OLIVEIRA, F. C. Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis* P40. 2004. 134 p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. Brasil. 2004

OLIVEIRA, K.R.P. β -lactamases na família Enterobacteriaceae: Métodos de detecção e prevalência. 2008. 89 p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação

em Medicina – Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. Brasil. 2008.

OLIVEIRA, M.F.; SILVA, M.G.; VAN DER SAND, S. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Research in Microbiology**. v. 161, p. 565-572. 2010.

OLIVEIRA, D.V. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de bactéria Gram-negativas isoladas nas águas do Arroio Dilúvio. 2011. 83 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. Brasil. 2011.

PAGÈS, J.; JAMES, C.E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**. v. 6, p. 893-903. 2008.

PAVAN, M.E.; FRANCO, R.J.; RODRIGUEZ, J.M.; GADALETA, P.; ABBOTT, S.L.; JANDA, J.M.; ZORZÓPULOS, J. Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedi*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 55, p. 437-442. 2005.

PLAKKAL, N.; SORAISHAM, A.S.; AMIN, H. *Citrobacter freundii* brain abscess in a preterm infant: a case report and literature review. **Pediatrics and Neonatology**. v. 54, p. 137-140. 2013

PEI, J.; YUAN, Y.; YUE, T. Primary characterization of bacteriocin paracin C e A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*. **Food Control**. v. 34, p. 168-176. 2013.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**. v. 71, p. 981-990. 2006.

PIDDOCK, L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**. v. 4, p. 629-636. 2006.

PIDOT, S.J.; COYNE, S.; KLOSS, F.; HERTWECK, C. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 304, p. 14-22. 2014.

POOLE, K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. v. 4, n. 5, p. 500-508. 2001.

PRABAVATHY, V.R.; MATHIVANAN, N.; MURUGESAN, K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. **Biological Control**. v. 39, p. 313-319. 2006.

PRATS, G.; RICHARD, C.; MIRELIS, B.; LOPEZ, P. Human isolates of *Enterobacter intermedium*. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**. v. 266, p. 422-424. 1987.

RATH, S.; DUBEY, D.; SAHU, M.C.; DEBATA, N.K.; PADHY, R.N Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 4, n. 2, p. 140-149. 2014.

RAYTAPADAR S.; PAUL, A.K. Production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces aburaviensis* IDA-28. **Microbiological Research**. v. 155, p. 315-323. 2001.

RENIER, D.; FLANDIN, C.; HIRSCH, E.; HIRSCH, J. Brain abscesses in neonates: A study of 30 cases. **Journal of Neurosurgery**. v. 69, p. 877-882. 1988.

RICE, L.B. Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v. 74, p. 12-20. 2007

RUMBAUGH, K.P.; GRISWOLD, J.A.; IGLEWSK, B.H.; HAMOOD, A.N. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. **Infection and Immunity**. v. 67, n. 11, p. 5854-5862, 1999.

SABIA, C.; ANACARSO, I.; BERGONZINI, A.; GARGIULO, R.; SARTI, M.; CONDÒ, C.; MESSI, P.; NIEDERHAUSERN, S.; ISEPPI, R.; BONDI, M. Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. **Anaerobe**. v. 26, p. 41-45. 2014.

SALAMONI, S.P.; MANN, M.B.; CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; GERMANI, J.C.; VAN DER SAND, S.T. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 26, p. 1847-1856. 2010.

SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. **Archives of Microbiology**. v. 165, p. 359-369. 1996.

SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in waste water, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 43, p. 325-335. 2003.

SELVAKUMAR, D.; ARUN, K.; SUGUNA, S.; KUMAR, D.; DHEVENDARAN, K. Bioactive potential of *Streptomyces* against fish and shellfish pathogens. **Iranian Journal of Microbiology**. v. 2, n. 3, p. 157-164. 2010.

SELVIN, J.; SHANMUGHAPRIYA, S.; GANDHIMATHI, R.; KIRAN, G.S.; RAVJI, T.R.; NATARAJASEENIVASAN, K.; HEMA, T.A. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 83, p. 435-445. 2009.

SHARMA, P.K.; SINGH, K.; SINGH, R.; CAPALASH, N.; ALI, A.; MOHAMMAD, O.; KAUR, J. Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. **Molecular Biology Reports**. v. 39, p. 2795-2804. 2012.

SHARMA, G.; RAO, S.; BANSAL, A.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**. v. 42, p. 1-7. 2014.

SHEEJA, M.S.; SELVAKUMAR, D.; DHEVENDARAN, K. Antagonistic potential of *Streptomyces* associated with the gut of marine ornamental fishes. **Middle-East Journal of Scientific Research**. v. 7, n. 3, p. 327-334. 2011.

SHEPP, D.H.; TANG, I.T.; RAMUNDO, M.B.; KAPLAN, M.H. Serious *Pseudomonas aeruginosa* infection in AIDS. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**. v. 7, p. 823-831. 1994.

SONGA, E.H.; PARKA, K.; JANGA, E.; LEEA, E.J.; CHONGA, Y.P.; CHOA, O.; KIMA, S.; LEEA, S.; SUNGB, H.; KIMB, M. et al. Comparison of the clinical and microbiologic characteristics of patients with *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* bacteremia: a prospective observation study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 66, p. 436-440. 2010.

SOSIO, M.; BOSSI, E.; BIANCHI, A.; DONADIO, S. Multiple peptide synthetase gene clusters in Actinomycetes. **Molecular and General Genetics**. v. 264, p. 213-221. 2000.

SPADARI, C. Bioprospecção de uma substância antifúngica potencialmente nova produzida por actinomicetos isolados no RS. 2013. 90 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. Brasil. 2013.

STOCK, I. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter* spp., with special reference to *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter intermedius* strain. **Journal of Chemotherapy**. v. 14, n. 5, p. 444-460. 2002.

SU, R.; WANG, A.; HOU, S.; GAO, P.; ZHU, G.; WANG, W. Identification of a novel fumarase C from *Streptomyces lividans* TK54 as a good candidate for L-malate production. **Molecular Biology Reports**. v. 41, p. 497-504. 2014.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos beta-lactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 27, n. 2, p. 116-129. 2009.

SUJATHA, P.; RAJU, K.V.V.S.N.B.; RAMANA, T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**. v. 160, p. 119-126. 2005.

SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G.; HALDORSEN, B.C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S.; LITTAUER, P.; DAHL, K.H. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v. 112, p. 815-37. 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**. v. 18, p. 448-459. 2001.

TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN S. Screening of endophytic streptomycetes isolated from *Parthenium hysterophorus* L. against nosocomial pathogens. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**. v. 26, n. 2, p. 277-283. 2013.

THAKUR, D.; YADAV, A.; GOGOI, B.K.; BORA, T.C. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 17, p. 242-249. 2007.

TIAN, X.L.; CAO, L.X.; TAN, H.M.; ZENG, Q.G.; JIA, Y.Y.; HAN, W.Q.; ZHOU, S.N. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 20, p. 303-309. 2004.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacterial. **The American Journal of Medicine**. v. 119, n. 6A, p. S3-S10. 2006.

TRENOZHNIKOVA, L.P.; KHASENOVA, A.K.; BALGIMBAEVA, A.S.; FEDOROVA, G.B.; KATRUKHA, G.S.; TOKAREVA, N.L.; KWA, B.H.; AZIZA, A. Characterization of the antibiotic compound n. 70 produced by *Streptomyces* sp. IMV-70. **The Scientific World Journal**. 2012.

TUCCI, V.; ISENBERG, H.D. Hospital cluster epidemic with *Morganella morganii*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 14, n. 5, p. 563-566. 1981.

TUON F.F.; ROCHA, J.L.; GUADAGNIN, F.A.; ALVES, M.S. Is nosocomial *Escherichia coli* bacteremia a predictive riskfactor for mortality? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n. 1, p. 92-94. 2014.

ULLAH, F.; MALIK, S.A.; AHMED, J. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the North West of Pakistan. **Burns**. v. 35, p. 1020-1025. 2009.

VAISHNAV, P.; DEMAINE, A.L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 223-229. 2010.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R.N.; GANGE, A.C. Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. **Microbial Ecology**. v. 57, p. 749-756. 2009.

VOGEL, A.I. **Química Orgânica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico. 1980.

WAKSMAN, S.A. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. **Science**. v. 118, p. 259-266. 1953.

WANG, X.; ELSHAHAWI, S.I.; SHAABAN, K.A.; FANG, L.; PONOMAREVA, L.V.; ZHANG, Y.; COPLEY, G.C.; HOWER, J.C.; ZHAN, C.; KHAREL, M.K. et al. Ruthmycin, a new tetracyclic polyketide from *Streptomyces* sp. RM-4-15. **American Chemical Society**. v. 16, p. 456-459. 2014.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 51, p. 9-11. 2003.

WHITELEY, M.; BANGERA, M.G.; BUMGARNER, R.E.; PARSEK, M.R.; TEITZEL, G.M.; LORY, S.; GREENBERG, E. P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**. v. 413, p. 860-864, 2001.

WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E.M H.; SNEATH, P.H.A.; SACKINS, M.J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**. v. 129, p. 1743-1813. 1983.

WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HALT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 2452-2492. 1989

WU, H.; LIU W.; DONG, D.; LI, J.; ZHANG, D.; LU, C. *SlnM* gene overexpression with different promoters on natamycin production in *Streptomyces lydicus* A02. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 41, p. 163-172. 2014.

XIE, J.; ZHANG, R.; SHANG, C.; GUO, Y. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 20, p. 5611-5619. 2009.

XIONG, Z.; TU, X.; WEI, S.; HUANG, L.; LI, X.; LU, H.; TU, G. The mechanism of antifungal action of a new polyene macrolide antibiotic antifungalmycin 702 from *Streptomyces padanus* JAU4234 on the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*. **Plos One**. v. 8, n. 8, p. 1-6. 2013.

YANG, Z.; LECUIT, M.; SUAREZ, F.; CARBONNELLE, E.; VIARD, J.; DUPONT, B.; BUZYN, A.; LORTHOLARY, O. *Morganella morganii* pericarditis 3 years after allogenic bone marrow transplantation for mantle cell lymphoma. **Journal of Infection**. v. 53, p. 223-225. 2006.

ZABALA, D.; BRAÑA, A.F.; FLÓREZ, A.B.; SALAS, J.A.; MÉNDEZ, C. Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. **Metabolic Engineering**. v. 20, p. 187-197. 2013.

8. APÊNDICES

1. Soluções utilizadas para tamponamento do meio base

1.1 Solução de Mcllvaine

1.1.1 Solução tampão pH 4,0

Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	7,71 mL
Ácido cítrico (0,1 M)	12,29 mL

1.1.2 Solução tampão pH 5,0

Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	10,30 mL
Ácido cítrico (0,1 M)	9,70 mL

1.2 Solução de ácido acético e acetato

1.2.1 Solução tampão pH 4,5

Acetato de sódio (2 M)	43 mL
Ácido acético (2 M)	57 mL

1.3 Solução de fosfato de potássio e hidróxido de sódio

1.3.1 Solução tampão pH 6,0

H ₂ KPO ₄ (0,1 M)	50 ml
NaOH (0,1 M)	5,70 mL

1.3.2 Solução tampão pH 7,0

H ₂ KPO ₄ (0,1 M)	50 ml
---	-------

NaOH (0,1 M)	29,63 mL
--------------	----------

1.3.2 Solução tampão pH 8,0

H ₂ KPO ₄ (0,1 M)	50 ml
---	-------

NaOH (0,1 M)	46,80 mL
--------------	----------

1.4 Solução de fosfato de sódio

1.4.1 Solução tampão pH 6,5

Fosfato de sódio monobásico (0,2 M)	68,5 mL
-------------------------------------	---------

Fosfato de sódio bibásico (0,2 M)	31,5 mL
-----------------------------------	---------