

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

**AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS
ACTINOMICETOS CONTRA COCOS GRAM POSITIVOS DE ORIGEM
CLÍNICA.**

THEMIS COLLARES ANTUNES

BIÓLOGA - UFRGS

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abril 2013.

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

**AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS
DE ACTINOMICETOS CONTRA COCOS GRAM POSITIVOS DE ORIGEM
CLÍNICA.**

THEMIS COLLARES ANTUNES

BIÓLOGA-UFRGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abril 2013.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sueli T. Vand Der Sand pela orientação, pela paciência, pelos conselhos e pelo carinho.

À Sabrina Pinto Salamoni, pelos ensinamentos e pela motivação desde a Iniciação Científica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pelos ensinamentos, em especial aos professores Dr. José Carlos Germani e Dra. Ana Paula Guedes Frazzon.

À Marcela Proença Borba, pela dedicação e ajuda indispensável.

Aos laboratórios 209 e 164, em especial as Ms. Elisandra Minotto e Ms. Francielle Bucker pela ajuda e sugestões.

Aos amigos, por compreenderem os momentos de ausência e pelo carinho indispensável.

À Cristina de Castro Spadari, diplococcus, pela grande amizade, pelo carinho e pela força desde a graduação.

Aos meus pais, minha irmã e minha avó, pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS DE ACTINOMICETOS CONTRA COCOS GRAM POSITIVOS DE ORIGEM CLÍNICA.¹

Autor: Themis Collares Antunes

Orientadora: Dr.^a Sueli T. Van Der Sand

RESUMO

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas caracterizadas por sua habilidade em formar hifas, são amplamente distribuídos no ambiente e conhecidos pela diversidade na produção de moléculas biologicamente ativas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de compostos produzidos por quarenta isolados de actinomicetos contra isolados clínicos de *Enterococcus* sp, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O perfil de suscetibilidade das amostras clínicas foi avaliado empregando a técnica de disco difusão em ágar. A atividade antimicrobiana dos actinomicetos foi avaliada pela técnica da dupla camada. Os isolados que apresentaram atividade foram cultivados em caldo amido caseína à temperatura de 30°C por sete dias, com agitação constante. Após o crescimento, a cultura foi filtrada para obtenção do extrato bruto. A atividade antibiótica do extrato foi avaliada através da técnica de difusão em poço. O isolado que apresentou maior espectro de ação foi selecionado para otimização dos compostos. A otimização da produção dos compostos com atividade antibiótica foi realizada através da avaliação de curva de produção, variação da fonte de carbono, tempo de incubação, pH tamponado e pH não tamponado. No ensaio de sobrecamada os isolados 50 e 8S apresentaram atividade contra a 90% das amostras de microrganismos clínicos de *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. No ensaio de difusão em poço o isolado 50 apresentou maior atividade antibiótica que o isolado 8S. Na otimização do extrato as melhores condições de produção foram: 72 h de crescimento, fonte de carbono amido e sem tamponamento de pH. Não foi observada influência de biomassa na produção dos compostos. A cromatografia em camada delgada revelou a presença de duas bandas com fator de retenção de 0,28 (Rf1) e 0,57 (Rf2).

Palavras chaves: Actinomicetos, antibióticos, *Enterococcus*, *Staphylococcus*.

¹ Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brasil.

CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE MOLECULES PRODUCED BY ACTINOMYCETES ISOLATED AGAINST CLINICAL COCOS GRAM POSITIVE.¹

Author: Themis Collares Antunes
Supervisor: Dr. Sueli T. Van Der Sand

ABSTRACT

Actinomycetes are Gram positive bacteria, characterized by their ability to form hyphae. They are widely distributed in the environment and known for their diversity in producing biological active molecules. This study aimed to evaluate the activity of compounds produced by forty isolates of Actinomycetes against clinical isolates of *Enterococcus* sp, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The susceptibility profile of the samples was evaluated using the disk diffusion technique in agar. The antimicrobial activity of actinomycetes was assessed by means of the double layer. Isolates that showed activity were grown in starch casein broth at a temperature of 30 °C for seven days, with constant agitation. After growth the culture was filtered to obtain a crude extract. The antimicrobial activity of the extract was evaluated by the well diffusion technique. The actinomycete that showed activity against most of the test samples was selected for optimization(s) of the compound(s) production. The optimization of the production was performed by evaluating: growth curve, the use of different carbon source, changes in the incubation time, and culture media with buffered and unbuffered pH. In the overlay assay isolates 50 and 8S presented activity against most of *Staphylococcus* sp. and *Enterococcus* sp samples. In diffusion assay isolate 50 showed higher antibiotic activity than the isolated 8S. Compiling the results the best production conditions were: 72 h of growth, carbon source starch without pH buffering at 30°C. There was no effect of biomass (s) compound (s) activity. The thin layer chromatography revealed the presence of two bands with a retention factor of 0.28 (Rf1) and 0.57 (Rf2).

Key words: actinomycetes, antibiotics, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp.

¹Master of Science degree dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Actinomicetos.....	3
2.2 O gênero <i>Streptomyces</i>	4
2.2.1. Características do gênero <i>Streptomyces</i>	4
2.2.2. <i>Streptomyces</i> e a produção de metabólitos secundários.....	5
2.3. Metabólitos secundários.....	8
2.4. Antibióticos.....	9
2.5. Resistência microbiana.....	13
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.7. <i>Staphylococcus epidemidis</i>	17
2.8. <i>Enterococcus</i>	18
3- MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Isolados de actinomicetos.....	20
3.2. Isolados de coco Gram positivos.....	22
3.2.1. Perfil de suscetibilidade das amostras de <i>Enterococcus</i> sp e <i>Staphylococcus</i> sp.....	24
3.3. Avaliação da atividade antibiótica de isolados de actinomiceto.....	24
3.3.1. Técnica de dupla camada.....	25
3.3.2. Estudo de produção – condições de crescimento.....	25
3.3.2.1. Ensaio de atividade antimicrobiana empregando o sobrenadante – Difusão em poço.	26
3.4. Otimização da produção dos compostos.....	27
3.4.1. Curva de crescimento e produção de metabólitos ativos.....	27
3.4.2. Influência da fonte de carbono sobre a atividade antimicrobiana.....	27
3.4.3. Influência da temperatura sobre a atividade antimicrobiana.....	28
3.4.4. Influência do pH não tamponado sobre a atividade antimicrobiana.....	29
3.4.5. Influência do pH tamponado sobre a atividade antimicrobiana.....	29
3.5. Análise estatística.....	29
3.6. Concentração Mínima Inibitória.....	30
3.7. Estabilidade dos compostos frente a diferentes temperaturas.....	30
3.8. Estabilidade dos compostos frente a diferentes enzimas proteolíticas.....	31
3.9. Cromatografia em Camada Delgada.....	32
3.9.1. Separação dos compostos por cromatografia líquida em camada delgada.....	32
3.9.2. Autobiografia.....	33
3.9.3. Coloração CCD.....	34

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1.Perfil de suscetibilidade das amostras de <i>Enterococcus</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp.	36
4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	41
4.2.1.Técnica da sobrecamada.....	41
4.2.2.Estudo da difusão em poço.....	42
4.3.Otimização da produção dos compostos bioativos.....	47
4.3.1.Curva de crescimento para a produção de metabólito ativo.....	47
4.3.2. Avaliação da produção de metabólito(s) ativo(s) em diferentes fontes de carbono.....	50
4.3.3.Influência da temperatura sobre a atividade antimicrobiana.....	53
4.3.4.Influência do pH sobre a atividade antimicrobiana.....	59
4.4.Concentração mínima inibitória.....	63
4.5.Estabilidade do compostos frente a diferentes temperaturas.....	64
4.6.Estabilidade do compostos frente a diferentes enzimas proteolíticas.....	66
4.7.Cromatografia em Camada Delgada.....	67
4.7.1.Separação do compostos e autobiografia.....	67
4.7.2.Coloração CCD.....	69
5- CONCLUSÕES	75
6- PERSPECTIVAS	77
7- REFERÊNCIAS	78
8- APÊNDICES	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.Origem dos isolados de actinomicetos empregados no estudo.....	21
TABELA 2.Origem dos isolados de <i>Enterococcus sp.</i> e <i>Staphylococcus sp.</i> empregados no estudo.....	23
TABELA 3.Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de <i>Enterococcus sp.</i>	37
TABELA 4.Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus sp.</i>	39
TABELA 5.Atividade antibiótica de actinometos contra microrganismos Gram positivos clínicos no ensaio da sobrecamada.....	43
Tabela 6.Perfis de atividade antibiótica dos isolados de actinomiceto 8S e 50 contra cocos Gram positivos de origem clínica (análise estatística).....	46
TABELA 7.Valores dos índices de antibiose produzidos contra bactérias Gram positivas de origem clínica empregando-se o extrato bruto do isolado 50.....	49
TABELA 8.Valores dos índices de antibiose formados contra os cocos Gram positivos empregando extrato bruto do isolado de actinomiceto 50 crescido em diferentes fontes de carbono.....	52
TABELA 9.Otimização da produção de compostos produzidos pelo isolado 50 de actinomiceto submetido a diferentes temperaturas de incubação.....	57
TABELA 10.Índice de antibiose e valores finais de pH formados pelo extrato do isolado 50	60
TABELA 11.Índice de antibiose formado pelo extrato do isolado 50 crescido em meio AC em pH tamponado.....	61
TABELA 12.Concentração mínima inibitória do extrato bruto produzido pelo isolado 50.....	64
TABELA 13.Resultados dos testes de coloração de CCD.....	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Histórico concomitante da descoberta de antibióticos e desenvolvimento da resistência aos antibióticos.....	12
FIGURA 2 - Curva de crescimento do Actinomiceto 50.....	49
FIGURA 3 - Atividade residual do extrato bruto produzido pelo actinomiceto 50 após incubação em diferentes temperaturas.....	65
FIGURA 4 - Atividade residual do extrato bruto produzido pelo actinomiceto 50 após o tratamento com enzimas proteolíticas.....	67
FIGURA 5 - Cromatografia em camada delgada do extrato bruto do isolado 50.....	68
FIGURA 6 - Autobiografia do extrato bruto do isolado 50.....	69
FIGURA 7- Cromatografia em camada delgada utilizando o reagente anisaldeído.....	71
FIGURA 8 - Cromatografia em camada delgada utilizando o reagente cloreto férrico.....	72
FIGURA 9 - Cromatografia em camada delgada utilizando o reagente ninhidrina.....	73

1. INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas conhecidas pela sua capacidade de produzir antibióticos e outros metabólitos secundários importantes como antitumorais, anti-inflamatório, agentes antifúngicos, agentes anti-helmínticos e herbicidas. Dentre esses compostos, os antibióticos são os mais importantes do ponto de vista terapêutico e comercial. Aproximadamente dois terços dos antibióticos são isolados dos actinomicetos.

O gênero *Streptomyces* é representado na natureza por uma grande variedade e número de espécies produtoras da maioria dos antibióticos conhecidos na família *Actinomycetaceae*. Os principais tipos de antibióticos produzidos, por espécies de *Streptomyces*, são os aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, polienos, poliésteres e tetraciclinas.

Apesar da pesquisa constante em busca de novos compostos, existe urgência na clínica médica em relação ao desenvolvimento de novos antibióticos e, produtos naturais ainda são vistos como a fonte mais promissora para o desenvolvimento de novas drogas.

Devido ao indiscriminado uso de antimicrobianos na medicina, somado a outros fatores ambientais, muitos grupos de microrganismos patogênicos estão adquirindo resistência aos antimicrobianos atualmente empregados no tratamento clínico, em contrapartida, a descoberta de novos agentes antibióticos é cada vez menor.

Na atualidade, as bactérias Gram positivas vêm se tornando bactérias problemas na terapêutica anti-infecciosa causando grande preocupação entre

os cientistas, os microbiologistas e os médicos, isso deve-se ao fato da resistência que esses microrganismos tem apresentado contra os antimicrobianos aplicados na terapia clínica.

Considerando o potencial dos actinomicetos na produção de moléculas bioativas e a necessidade de novos compostos com ação antibiótica, este trabalho teve como objetivo: avaliar a atividade antibiótica de isolados de actinomicetos frente a cocos Gram positivos de origem clínica, selecionar o isolado com maior atividade frente às amostras clínicas, avaliar a influência de diferentes condições de cultivo para a otimização de produção dos compostos antibióticos e avaliar a estabilidade do extrato bruto frente a diferentes temperaturas e o tratamento com proteinases.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Actinobacteria

Este filo compreende bactérias Gram positivas com um elevado teor de guanina e citosina no seu DNA o qual varia de 51% em alguns *Corynebacteria*, para mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia*. Uma exceção a isto é o genoma do patógeno obrigatório *Tropheryma whipplei*, com menos de 50% de G+C (SCHREMPF, 2001).

Actinobacteria exhibe uma grande variedade de morfologias, de cocóide (*Micrococcus*) ou rodo-cocóide (por exemplo, *Arthrobacter*), a formas de hifas fragmentadas (por exemplo, *Nocardia* sp.) ou um micélio ramificado permanente e altamente diferenciado (por exemplo, *Streptomyces* sp.). Também exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários (SCHREMPF, 2001). Notadamente, muitos desses metabólitos secundários são antibióticos potentes, uma característica que tornou as espécies de *Streptomyces* sp. como organismos primários na busca de antibiótico pela indústria farmacêutica (BERDY, 2005). Além disso, diversas relações ecológicas são encontradas entre Actinobacteria, agentes patógenos (por exemplo, *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. e *Propionibacterium* spp.), habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), comensais em plantas (*Leifsonia* spp.), fixadoras de

nitrogênio simbiontes (*Frankia* spp.), habitantes do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.). Características de desenvolvimento peculiares são encontradas, tais como a formação de um micélio esporulado (*Streptomyces* sp.) ou como uma forma permanente de estado não-replicativo exibido por micobactérias (GOODFELLOW et al., 1983).

Actinobacteria são amplamente distribuídos, estando presentes em ecossistemas terrestres e aquáticos (incluindo o marinho), mas sua grande maioria é encontrada no solo, onde eles desempenham um papel fundamental na reciclagem de biomaterias pela decomposição e formação de húmus (STACH et al., 2005).

2.2. O gênero *Streptomyces*.

2.2.1. Características do gênero *Streptomyces*.

Os *Streptomyces* usam uma variedade extraordinária de mecanismos extracelulares para o seu crescimento primário e para associar-se com outros organismos, assim como para atingir seus próprios atributos de desenvolvimento complexo e produção de metabólitos secundários (KEITH et al., 2010).

O ancestral comum mais recente de *Streptomyces* sp. parece ter vivido há cerca de 440 milhões de anos atrás, quando provavelmente estava envolvido na colonização da terra por plantas verdes (CHATER & CHANDRA, 2006).

Essa visão coloca os estreptomicetos no papel formativo da evolução do ambiente terrestre. Nesse habitat, os esporos de *Streptomyces* sp., resistentes

à dissecação, são usualmente abundantes dando origem a filamentos de ramificação das hifas sob condições adequadas. Essa adaptação do crescimento consiste em aderir e penetrar nos restos orgânicos insolúveis de fungos, plantas e outros organismos, os quais são clivados por enzimas hidrolíticas provendo nutrientes. Quando crescidos em laboratório por alguns dias, seja em nutrientes solúveis ou em material insolúveis, condições mais similares com a natural, tais colônias formam um micélio denso sob o substrato, a partir do qual emergem ramos aéreos, eventualmente formando cadeias de esporos (FLARDH & BUTTNER, 2009).

O crescimento aéreo é conseguido à custa da biomassa micelial do substrato, a qual é submetida à lise extensiva e reutilização para alimentar a fase reprodutiva (MIGUELEZ et al., 1999). Os poucos miligramas (peso úmido) de micélio sob o substrato da colônia são assim convertidos em dezenas de milhões de esporos. A produção de antibióticos e outros metabólitos secundários é em grande parte associada com o desenvolvimento do micro-organismo.

2.2.2. *Streptomyces* e a produção de metabólitos secundários

Os estreptomicetos têm sido a fonte mais abundante de importantes antibióticos clínicos desde a descoberta da actinomicina D, estreptomicina e estreptotricina ocorrida em 1940 por Waksman e colaboradores (HOPWOOD, 2007).

Verificou-se que *Streptomyces* sp. sintetiza uma grande variedade de inibidores químicos distintos em diferentes processos celulares. Eles incluem antibióticos, fungicidas, citostáticos, moduladores de resposta imune e efetores

de crescimento de plantas. Eles são a mais abundante fonte natural de antibióticos e outros metabólitos secundários bioativos e, portanto, são de grande interesse para a medicina e indústria (HOPWOOD, 2007).

A diversidade de metabólitos secundários produzidos por estreptomicetos inclui a produção de numerosas moléculas pequenas (geralmente entre 100 e 3000 Da), que são biologicamente ativas fora da célula produtora. Pelo menos 7.000 diferentes metabólitos secundários são produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. (BERDY, 2005).

Historicamente os compostos antibacterianos produzidos por Actinomicetos incluem (DTZ, 2010):

1. Tetraciclina - antibiótico de largo espectro mais antigo produzido por *Streptomyces rimosus* e *Streptomyces aureofaciens*;
2. Cloranfenicol - produzido por *Streptomyces venezuelae*, é utilizado no tratamento de tifoide e infecções oculares;
3. Eritromicina - produzido por *Saccharopolyspora erythraea*, freqüentemente utilizado como um substituto da penicilina quando as pessoas são alérgicas a mesma, e no tratamento da Doença do Legionário;
4. Vancomicina - produzida por *Amycolatopsis orientalis*, é o último tratamento utilizado na defesa contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA);
5. Rifamicina - produzido por *Amycolatopsis mediterranei* e utilizado como primeiro tratamento para tuberculose e lepra;

6. Gentamicina - produzido por *Micromonospora purpurea*, utilizado em infecções causadas por microrganismos multiresistentes;
7. Imipenem - um derivado de tienamicina, produzido por *Streptomyces cattleya* e utilizado no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes à penicilina;
8. Ácido Clavulânico - produzido por *Streptomyces clavuligerus* e utilizado em combinação com derivados de penicilina;
9. Daptomicina - produzido por *Streptomyces roseosporus*, utilizado no tratamento de MRSA e infecções causadas por *Enterococcus* sp. Uma das três novas classes de antibióticos introduzida na prática clínica nos últimos 40 anos.

Entre 75 a 80% dos antibióticos comerciais e de uso médico são derivados do gênero *Streptomyces* (MIYADOH, 1993). A classificação do gênero *Streptomyces* sp. segundo *Bergey's: Manual of Systematic Bacteriology* (WILLIAMS et al., 1989) não é baseada na combinação de características genotípicas e fenotípicas, mas na extensiva pesquisa taxonômica de Williams et al. (1983).

Devido à presença de um padrão filogenético de ramificações, da combinação de propriedades como tipo químico de parede, tipo de peptidoglicana, açúcares da parede celular, ácidos graxos e perfis fosfolipídicos, a delimitação deste gênero é facilitada dentro dos Actinomicetos (KROPPESTEDT et al., 1990).

Streptomyces sp. tem sido, dentre os microrganismos, a fonte de maior rendimento na descoberta de todos os tipos de metabólitos bioativos que tem

importância na medicina humana e na agricultura. (CHATTERJEE et al. 1995; GEBHARDT et al., 2002).

Mesmo diante deste potencial, é importante observar que a habilidade das culturas de *Streptomyces* para a produção de antibióticos não é uma propriedade fixa, mas pode ser aumentada ou completamente perdida sobre diferentes condições de nutrição e cultivo (WAKSMAN, 1961). Portanto, a constituição do meio de cultura juntamente com a capacidade metabólica do organismo produtor afeta a biossíntese do antibiótico (HASSAN et al. 2001). Fontes nutricionais como carbono, nitrogênio e minerais e fatores ambientais como tempo, temperatura e pH têm uma profunda influência na produção de antibióticos pelos actinomicetos (NARAYANA & VIJAVAKSHMI, 2008).

2.3. Metabólitos secundários

O metabolismo primário refere-se à atividade metabólica associada ao crescimento, sendo os produtos desta atividade referidos como metabólitos primários, dos quais são exemplos as enzimas, os ácidos orgânicos, o etanol, entre outros (INOUE, 2006).

Em muitos organismos verifica-se a síntese de compostos não essenciais ao crescimento, frequentemente ao final da fase de crescimento ou durante a fase estacionária. Tais compostos são denominados metabólitos secundários (INOUE, 2006).

O metabolismo secundário pode ser observado em plantas, em microrganismos, tanto procariotos quanto eucariotos e, até mesmo, em alguns animais, como artrópodes e insetos (VINING, 1986).

O interesse pelos metabólitos secundários justifica-se pela grande variedade de atividade biológica destes compostos, que vêm sendo empregados de diversas maneiras (VINING, 1986).

A função de muitos produtos do metabolismo secundário dentro da célula ainda é desconhecida. Além disso, cada organismo responde de uma maneira diferente à depleção de um ou de outro nutriente. Portanto, quando há interesse em produzir algum metabólito secundário, é necessário estudar cada espécie em particular, pois uma mudança nas condições de cultivo pode inibir a produção ou ainda levar a produção de outros compostos que não o esperado (HECK, 2007).

2.4. Antibióticos

Em 1940, Waksman e H. Boyd Woodruff desenvolveram uma técnica para identificação de substâncias com propriedades antibacterianas. O *screening* era realizado observando o crescimento de zonas de inibição ao redor de uma colônia de microrganismos isolados do solo crescidos sob uma variedade de condições de cultivo, e então testados para inibição de uma bactéria patogênica específica. O primeiro antibiótico verdadeiro que Waksman identificou foi de *Actinomyces antibioticus*, um membro da família *Actinomycetes*. O microrganismo produzia uma substância, actinomicetina, que era tanto bacteriostática quanto bactericida. Ao longo de sua trajetória, Waksman descobriu mais de vinte novas substâncias naturais, incluindo

estreptomicina e neomicina, e propôs o termo “antibiótico” para essa classe de inibidores de crescimento naturais (KRESGE et al., 2004).

Antibióticos são compostos naturais produzidos por um organismo capaz de inibir o crescimento, classificados como bacteriostáticos, ou causar a morte de outro organismo, bactericida (WALSH, 2003).

A observação das bactérias ocorreu pela primeira vez por volta de 1670 por Van Leeuwenhoek, logo após a invenção do microscópio. A hipótese de que esses microrganismos pudessem ser causadores de doenças começou a ser levantada somente no século XIX quando cientistas como Robert Koch identificaram microrganismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifóide (GUIMARÃES et al., 2010).

Na última década de 30, Gerhard Domagk demonstrou as utilidades terapêuticas das sulfonamidas, derivadas de corantes, contra infecções bacterianas sistêmicas. Ainda hoje, as sulfas têm grande emprego no tratamento de doenças infecciosas, destacando-se a sulfadiazina, o sulfatiazol e a sulfamerazina (DIXON, 2006).

A segunda Guerra Mundial foi um forte propulsor da indústria química e farmacêutica. Neste período, surgiram novas sulfas de ação mais prolongada, como o sulfametoxazol e as primeiras penicilinas de uso clínico (DIXON, 2006).

Alexander Fleming descobriu a penicilina em 1928, mas somente em 1940 Chain Florey e colaboradores conseguiram obter culturas isoladas do *Penicillium* sp., purificar o composto, e realizar os primeiros ensaios clínicos com a droga. A demonstração do efeito terapêutico da penicilina G estimulou a busca por novas substâncias anti-infecciosas originadas do metabolismo de microrganismos (FERNANDES, 2006).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivas: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclinas (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetopim e metronidazol. (FERNANDES, 2006).

Entre os anos 1960-1980 foram introduzidos no mercado antibióticos semissintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram positivos e Gram negativos, análogos aos antibióticos naturais já existentes. Temos como os derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, ampicacina) (FERNANDES, 2006).

A partir de 1980 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos em detrimento às de produtos naturais microbianos. A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipodepsipeptídeo natural daptomicina pelo FDA em 2003 (GUIMARÃES et al., 2010).

Os anos de 1940 a 1970 foi o “período de ouro” do descobrimento de novos antibióticos, tanto naturais quanto sintéticos. A desaceleração observada

desde então se deve a diversos fatores, sendo o mais importante dentre eles a falta de investimento da indústria farmacêutica; em contrapartida os antibióticos perdem sua eficácia de forma muito rápida (RIVAS, 2006). A figura 1, adaptada de Davies & Davies (2010), mostra a sequência da descoberta e do desenvolvimento de resistência da grande parte dos antibióticos.

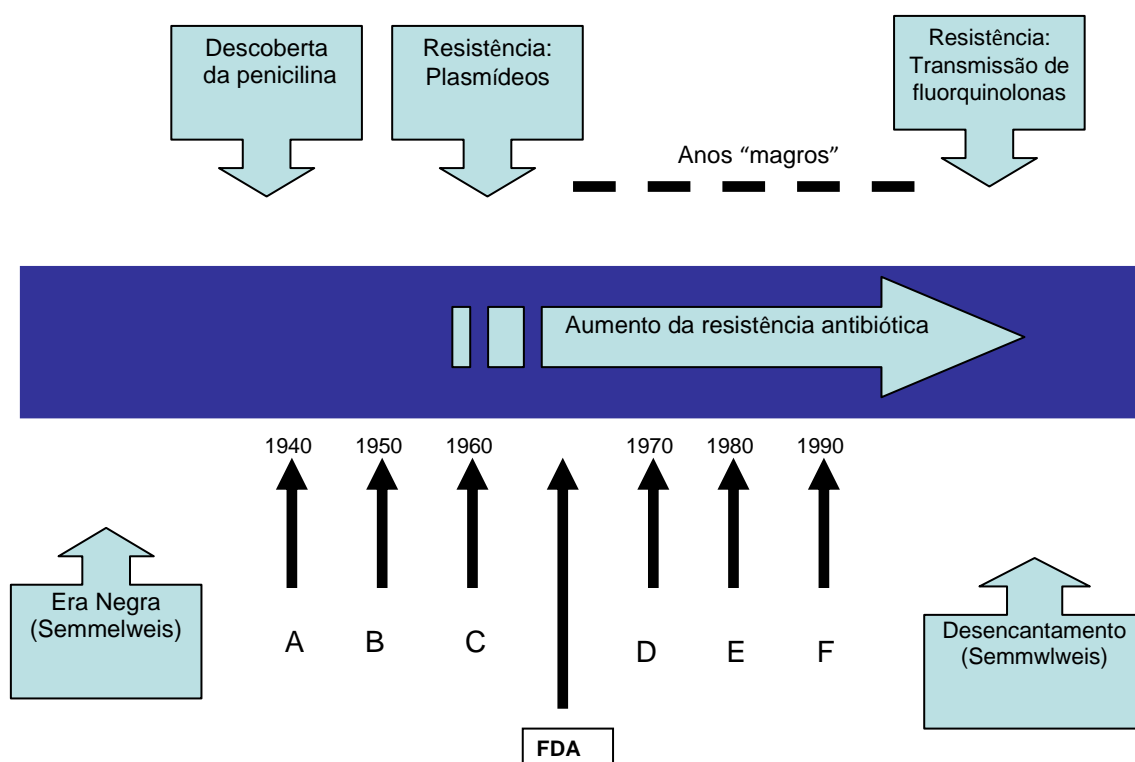


Figura 1. Histórico concomitante da descoberta de antibióticos e desenvolvimento da resistência aos antibióticos. **(A) Era pré-antibiótica**, o advento da quimioterapia, via as sulfonamidas, **(B) Dourado**, descoberta da maioria dos antibióticos, **Os anos "magros"**, o ponto mais baixo de descoberta; **(C) Farmacológico**; **(D) Bioquímica**, modificação química para evitar a resistência; **(E) Alvo**, estudos genéticos; **(F) Genômica / HTS**. **Desencanto**, com o fracasso do enorme investimento nos métodos baseados no genoma, muitas empresas interromperam programas de descoberta de novos antibióticos. Outro marco da história inclui a criação do escritório do FDA de Novos Fármacos (adaptada de DAVIES et al., 2010).

2.5. Resistência microbiana

O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes físicos e químicos entre os microrganismos data do início da era dos antimicrobianos. Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica, Ehrlich et al. descobriram, em 1905, o fenômeno da resistência aos fármacos ao observarem que em culturas de tripanossomas africanos, quando tratados com arsênico ou determinados corantes, alguns exemplares sobreviveram ao tratamento (TAVARES, 2001).

A resistência aos antibióticos pode surgir como consequência de alterações genéticas (mutações) (MARTINEZ & BAQUERO, 2000) ou pela aquisição dos genes de resistência a antibióticos (DAVIES, 1997) através de transferência genética horizontal (HGT). Alguns organismos têm um fenótipo característico de baixa suscetibilidade a antibióticos (FAJARDO & MARTINES, 2008), adquiridas antes do uso de antibióticos na medicina.

Segundo Sanchez (2006), os principais mecanismos de resistência podem ser baseados em quatro causas principais:

1. Modificação do antibiótico: podendo esta ser química (acetilação, fosforilação e adenilação) ou por hidrólise (β -lactamases);
2. Local-alvo através de mutações espontâneas em genes que codificam para polimerase RNA, mutações na região 23S do RNA ribossômico;

3. Alteração na permeabilidade da membrana das bactérias Gram negativas devido a mudanças nas proteínas da membrana externa porinas (OmpF e OmpC);
4. A remoção do antibiótico por *overproducing*- bombas de efluxo (Mex AB, OprD) que impede o acesso do antibiótico ao local alvo nas bactérias.

Em geral, os genes que conferem resistência aos antibióticos podem ser localizados no cromossomo bacteriano e em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons ou integrons. A transferência destes genes pode ser por transdução, transformação ou conjugação bacteriana (SANCHEZ, 2006).

Nos últimos 20 anos, a resistência aos antimicrobianos em nível mundial tem aumentado de maneira significativa ao ponto que a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1999, catalogou o fenômeno como um problema de saúde pública. Desde então, tem iniciado um grande número de medidas para seu controle as quais incluem gerar informações sobre os perfis de resistência para cada uma das regiões e países (ESPINOSA et. al., 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2011 aprovou uma nova norma que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isolado ou em associação. A resolução RDC nº20 (disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=39&data=09/05/2011>) tem por objetivo minimizar a elevação da resistência bacteriana no país. A partir de sua publicação a venda de antibiótico é permitida apenas com prescrição médica e retenção da receita.

2.6. *Staphylococcus aureus*

Na década de 1940, a grande maioria dos *S. aureus* era sensível à penicilina. No fim dos anos 50, a espécie *S. aureus* tinha adquirido resistência à praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina (CHAMBERS, 1988). Na década de 1960, com a introdução das penicilinas resistentes as penicilinases, houve um avanço na terapêutica antiestafilocócica. Com o uso das penicilinas semissintéticas, como a meticilina, empregadas no tratamento de infecções estafilocócicas, surgiram cepas resistentes à meticilina denominadas MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), cujo padrão de resistência se estende a outros antibióticos β -lactâmicos (VOSS et al., 1994).

S. aureus é um importante patógeno que pode causar infecções graves, tanto em pessoas saudáveis quanto em pessoas imunocomprometidas. Os antibióticos oxacilina e a meticilina foram utilizados pela primeira vez na clínica no início dos anos de 1960, no entanto alguns anos depois apareceram os primeiros isolados de *S. aureus* resistentes a estes agentes, coletivamente denominados meticilina-resistentes (MRSA) (AYLIFFE, 1997).

Segundo Arias et al. (2009) a resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídios. Os mecanismos mais comuns de resistência à meticilina são:

a) hiperprodução de β -lactamases (penicilases);

b) baixa afinidade na proteína ligadora de penicilina, PBP2a (*PBP protein binding penicilin*);

O mecanismo de resistência a meticilina está relacionado ao desenvolvimento de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) adicional, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas não tem afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos. A codificação dessas novas PBPs, que torna esses patógenos resistentes à oxacilina, está relacionada à aquisição do gene *mecA*, o qual faz parte de um elemento genético móvel detectado em isolados de MRSA. Esse gene é parte integrante de um elemento genômico denominado “cassete cromossômico estafilocócico *mec*” (SCC*mec*). (CHAMBERS, 1997).

Outro aspecto relevante na epidemiologia é sua capacidade em se aderir às superfícies sólidas produzindo biofilmes compostos por multicamadas de células embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos (CUCARELLA et al., 2001; FLACH et al., 2005). Esta organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de microrganismos, pois fornece proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003).

2.7. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis é a espécie mais comumente isolada de peles humanas saudáveis e geralmente apresenta uma relação benigna com o seu hospedeiro (EVANS et al., 1950; MARPLES, 1969; OTTO, 2004).

O papel benéfico de *S. epidermidis* é demonstrado pela sua capacidade em inibir a colonização do patógeno *S. aureus* (IWASE et al., 2010). *S. epidermidis* é um comensal na pele, mas se houver rompimento da superfície da mesma e este microrganismo entrar na corrente sanguínea, ele passa a ser considerado um patógeno. *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo, incluindo *S. epidermidis*, compreendem 30% das infecções hospitalares (HIDRON, 2008), associado a uma estimativa de US \$ 2 bilhões por ano em custos de tratamento (OTTO, 2009).

S. epidermidis forma biofilmes em dispositivos médicos, tais como lentes de contato, cateteres e próteses valvares. O desprendimento de células bacterianas de biofilmes sobre estes dispositivos pode levar a bacteremia, com aumento da morbidade e mortalidade potencial (WISPLINGHOFF, 2004).

S. epidermidis tornou-se a principal causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea; infecções de olho, orelha, nariz, garganta e infecções cardiovasculares (*Hospital Infections Program, National Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention, Public Health Service, US Department of Health and Human Services, 1998*).

Diferentemente de *S. aureus*, *S. epidermidis* tem um número limitado de exotoxinas e exoenzimas degradativas. Portanto, infecções por *S. epidermidis* são menos agudas e mais duradouras (VOUNG et al., 2003).

2.8. *Enterococcus* sp.

O gênero *Enterococcus* sp. é formado por microrganismos Gram positivos, catalase negativa, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos que podem ocorrer nas formas de coco ou em cadeias. Esse gênero pertence ao grupo de bactérias conhecidas como ácido láctico que produzem bacteriocinas (Health Protection Agency, 2005). O gênero foi descrito em 1899 por Thiercelin que identificou *Enterococcus* sp. como microrganismos pertencentes ao trato gastrointestinal (STILES & HOLZAPFEL, 1997).

Enterococcus sp. são bactérias Gram positivas comensais que fazem parte da microbiota gastrointestinal de humanos e diversos animais (MUNITA et al., 2012). Os *Enterococcus* sp. são capazes de sobreviver a uma grande variedade de estresse e ambientes hostis, incluindo temperaturas extremas, 5-65 °C, pH de 4,5-10,0 e altas concentrações de cloreto de sódio. Isso permite a colonização de uma gama de nichos (FISHER, 2009).

O gênero *Enterococcus* sp. tem surgido como um dos mais importantes patógenos hospitalares no mundo inteiro. A frequência de seu isolamento vem aumentando desde a última década e, paralelamente ao aumento da incidência, tem-se observado rápida elevação na frequência de cepas resistentes aos antimicrobianos de uso corrente (HÖNER et al., 2005). De

acordo com as pesquisas recentes da *National Nosocomial Infections Surveillance* os *Enterococcus* permanecem na terceira posição como o patógeno mais comum causador de infecções nosocomiais (FRASER et al., 2010).

Vários fatores determinam a virulência das espécies de *Enterococcus* sp., como por exemplo, (1) habilidade de colonizar o trato gastrintestinal, que é o seu habitat natural, (2) habilidade de adesão numa gama de proteínas da matriz extracelular, (3) habilidade de aderir ao epitélio do trato urinário, ao epitélio da cavidade oral e células do rim humano (FRANZ et al., 1999).

A maioria das infecções é endógena, por translocação da bactéria através das células epiteliais do intestino, que causam infecções via linfonodos e espalha-se para outras células no corpo (FRANZ et al., 1999).

Embora os *Enterococcus* sp. não produzam toxinas potentes como algumas outras bactérias, eles possuem fatores de virulência como: substâncias agregadoras (AS), proteínas de superfície (Esp), proteínas MSCRAMMs (componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva) presentes na matriz extracelular, gelatinase, pili e genes de resistência a antibióticos. (SAVA et al., 2010).

Além da resistência aos beta-lactâmicos e aos glicopeptídeos, os enterococos adquiriram resistência elevada a outros antimicrobianos, por mutação ou transferência de plasmídios. Estes enterococos multirresistentes são também resistentes ao cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina e rifampicina variando seu isolamento com características locais (TAVARES, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados de Actinomicetos

Os quarenta isolados de Actinomicetos utilizados neste estudo pertencem a bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. Os isolados são oriundos de processo de compostagem e *landfarming* (Tabela 1). Os microrganismos derivados do processo de compostagem foram isolados e identificados através de características morfológicas, provas bioquímicas e moleculares por Oliveira (2002) e os derivados de *landfarming* foram isolados por Duarte (2012).

TABELA 1. Origem dos actinomicetos empregados no estudo.

Actinomiceto	Origem
50	Composteira experimental da Faculdade de Agronomia – UFRGS.
1S	Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Saporanga.
8S	Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Saporanga
L1.1	<i>Landfarming</i>
L1.10 – L1.17	<i>Landfarming</i>
L1.19 – L1.22	<i>Landfarming</i>
L1.2	<i>Landfarming</i>
L1.4	<i>Landfarming</i>
L1.7	<i>Landfarming</i>
L1.9	<i>Landfarming</i>
L2.1	<i>Landfarming</i>
L2.10	<i>Landfarming</i>
L2.11	<i>Landfarming</i>
L2.13	<i>Landfarming</i>
L2.18	<i>Landfarming</i>
L2.2 – L2.4	<i>Landfarming</i>
L2.6 – L2.8	<i>Landfarming</i>
L3.2 – L3.4	<i>Landfarming</i>
L3.7	<i>Landfarming</i>
L4.1	<i>Landfarming</i>
L4.2	<i>Landfarming</i>
L4.4	<i>Landfarming</i>
L4.5	<i>Landfarming</i>

3.2. Isolados de Cocos Gram positivos

Os quinze isolados de *Enterococcus* sp. utilizados no estudo pertencem a bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. Os isolados são oriundos de amostras clínicas do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, coletados e cedidos pelo Dr. Pedro Alves d'Azevedo e Dr. Ana Paula Guedes Frazzon (Tabela 2).

Os 10 isolados de *Staphylococcus* sp. utilizados são oriundos de amostras clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pertencem a bacterioteca do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram cedidas pela Dr. Ana Lucia Antunes (Tabela 2).

TABELA 2. Origem dos isolados de *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus sp.* empregados nesse estudo.

	Isolados	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	21	IRC
	28	Infecção em outro sítio
	53	IRC, infecção em outro sítio (doença de Paget)
	103	DM/HAS/IRC/CI/ infecção em outro sítio
	209	IRC, infecção outro sítio
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSE)	51	Não especificada
	177	infecção outro sítio
	157, 221, 229	Infecção em outro sítio
<i>Enterococcus sp.</i> (VRE)	488, 1300, 1854, 1950, 1953, 2319, 2389	Urina
	1884, 1885, 2072, 2074, 2390, 2449, 2688, 2714	Sangue

IRC: infecção renal crônica, DM: diabete mellitus, HAS: hipertensão arterial, CI: insuficiência cardíaca, MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, MRSE: *Staphylococcus epidermidis* resistente a metilicina, VRE: *Enterococcus sp* vancomicina resistente. *Em negrito os isolados empregados no teste de dupla camada.

3.2.1. Perfil de suscetibilidade das amostras de *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus spp*

O perfil de suscetibilidade das amostras de *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus sp.* foi determinado através da técnica de disco difusão em ágar conforme as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI- 2009). Os antimicrobianos empregados no antibiograma contra *Enterococcus sp.* foram: ácido nalidíxico 30 µg (NAL), ampicilina 10 µg (AMP), ciprofloxacino 5 µg (CIP), cloranfenicol 30 µg (CLO), eritromicina 15 µg (ERI), estreptomicina 10 µg (EST), nitrofurantoína 300 µg (NIT), norfloxacino 10 µg (NOR) e vancomicina 30 µg (VAN). Para as amostras de *Staphylococcus sp.* foram utilizados os antibióticos: amoxicilina/ácido clavulônico 20/10 µg (AMX/CLA), ampicilina 10 µg (AMP), ciprofloxacino 5 µg (CIP), clindaminina 2 µg (CLI), cloranfenicol 30 µg (CLO), eritromicina 15 µg (ERI), oxacilina 1 µg (OXA), rimfampicina 5 µg (RIF).

3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de actinomicetos

3.3.1. Técnica da dupla camada

A atividade antimicrobiana dos quarenta isolados de actinomicetos foi determinada, primeiramente, através da técnica da dupla camada. Foram empregados neste ensaio quatro microrganismos-teste de *Enterococcus sp.* (488, 1300, 1950 e 2389) e seis de *Staphylococcus sp.* (21, 53, 103, 51, 157 e 221) escolhidos aleatoriamente. Os isolados de actinomicetos foram inoculados

em meio ágar amido caseína (ACA: amido 10 g; caseína, 0,12 g; NaCl, 2,0 g; KNO₃, 2,0g; K₂HPO₄, 2,0g; MgSO₄, 0,05g; FeSO₄, 0,01g, CaCO₃ 0,02 g, ágar bacteriológico 6g) pelo método da picada. Após 14 dias de crescimento a 30°C, foram vertidas sobre os crescimentos na placa de Petri uma suspensão contendo 1 mL (10⁸ células/mL de *Enterococcus* ou *Staphylococcus*) e 9 mL de ágar Müller-Hilton fundido. As placas foram incubadas a 37° C por 24-48 h. A partir deste ensaio foi determinada a atividade qualitativa, presença ou ausência de halos, dos isolados de actinomicetos sp. contra os microrganismos testados.

3.3.2. Estudo de produção - Condições de crescimento

Os isolados de actinomicetos que apresentaram atividade antimicrobiana contra as amostras de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. na técnica de dupla camada foram empregados no estudo de produção. Para a produção do extrato de interesse, os isolados foram crescidos em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL caldo amido caseína (AC: amido, 10 g; caseína, 0,12g; NaCl, 2,0 g; KNO₃, 2,0g; K₂HPO₄, 2,0g; MgSO₄, 0,05g; FeSO₄, 0,01g, CaCO₃ 0,02 g). O actinomiceto permaneceu sob agitação a 150 r.p.m. por 7 dias a 30°C. Primeiramente, foi realizado um pré-inóculo para cada isolado de actinomiceto. Cada isolado foi inoculado em caldo AC por 48h, a 30°C sob agitação de 150 r.p.m. Após esse período, 5 mL do cultivo com crescimento celular foi transferido para um novo frascos cônicos contendo 50 mL do mesmo meio de cultura. A cultura permaneceu em crescimento por 7 dias sob as mesmas condições de temperatura e agitação do pré-inóculo. No sétimo dia, foram coletados em tubos de microcentrifuga 1000µl do meio com

crescimento celular. As amostras foram submetidas ao processo de centrifugação por 10 minutos a 13.400 r.p.m para a obtenção do extrato bruto livres de células. Os ensaios de produção foram realizados em duplicata.

3.3.2.1. Ensaio de atividade antimicrobiana empregando o sobrenadante – Difusão em poço

O ensaio de difusão em poço consiste na semeadura utilizando um suabe impregnado de uma cultura da bactéria teste na concentração de 10^8 células/mL (0,5 da escala de McFarland) sobre uma placa contendo 20 mL de ágar Müeller Hinton. Após a semeadura foram realizados poços utilizando cilindros de aproximadamente 7 mm de diâmetro, distribuídos equidistantes na placa. Em cada poço, foi aplicado 100 µl do extrato bruto de cada isolado. A placa permaneceu a 4°C por 16 h para a difusão do extrato no meio de cultura e posteriormente foi incubada a 37°C por 48h. A partir desta técnica foi determinada a atividade dos extratos através da medição do índice de antibiose formados pelos extratos produzidos pelos isolados, perante o microrganismo de interesse. O índice de antibiose (IA) foi determinado pela da relação entre a média dos halos de inibição formados pelo extrato bruto e o diâmetro do poço, (adaptado de ROSATO et al., 1981).

3.4. Otimização da produção dos compostos

3.4.1. Curva de crescimento e produção de metabólitos ativos

Para determinar o melhor tempo de cultivo para a produção do metabólito de interesse foram realizadas análises de produção do antimicrobiano a cada 24h por um período de sete dias. Concomitantemente a esse ensaio foi determinada a biomassa da cultura através do peso seco. Para tanto a cultura foi filtrada usando uma membrana filtrante (0,22µm). Após a filtração a membrana foi acondicionada em estufa de 37°C por 48 a 72 h, para posterior pesagem e determinação do peso seco. O isolado foi cultivado nas mesmas condições descritas no item de produção. A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada através do ensaio de difusão em poço contra as amostras de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. escolhidas aleatoriamente.

3.4.2. Influência da fonte de carbono sobre a atividade antimicrobiana

O ensaio da produção de metabólitos do isolado de interesse sob diferentes fontes de carbono foi realizado contra os microrganismos de *Staphylococcus* sp. (221 e 53) e *Enterococcus* sp (1950 e 488). Para avaliar o efeito da fonte de carbono na produção de antibiótico, diferentes fontes de carbono - amido, sacarose, glicerol e glicose - foram adicionados individualmente ao meio basal contendo caseína, 0,3g; NaCl, 2,0 g; K₂HPO₄, 2,0g; MgSO₄, 0,05g; FeSO₄, 0,01g, CaCO₃ 0,02 g. As fontes de carbono foram adicionadas na concentração de 1% no meio basal suplementado com 2,0g de

KNO₃, como fonte de nitrogênio. O isolado de actinomiceto com melhor atividade antibiótica foi inoculado em frascos de 250 mL contendo 50 mL dos meios com diferentes fontes de carbono para a produção do pré-inóculo e após o período de 48h de crescimento, 5 mL de cada pré-inóculo foi transferido para novos meios de cultura de acordo com a fonte de carbono respectiva. Para este ensaio cinco frascos foram inoculados com o isolado de actinomiceto para cada fonte de carbono. As análises de produção de antimicrobiano foram realizadas a cada 24h pelo período de 5 dias. Para determinar a atividade antimicrobiana alíquotas foram retiradas nos intervalos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h centrifugadas em tubos de microcentrífuga a 13.400 r.p.m. por 10 min. A atividade dos extratos com relação ao tempo de crescimento microbianos foi realizada utilizando a técnica de difusão em poço. A fonte de carbono que apresentou maiores índices de antibiose em menor tempo contra os microrganismos testes foi submetida ao crescimento em diferentes temperaturas e diferentes pH.

3.4.3. Influência da temperatura sobre a atividade antimicrobiana

O efeito da temperatura na produção do metabólito secundário foi avaliado através da inoculação do isolado de interesse em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL caldo AC. O actinomiceto permaneceu sob agitação por 7 dias nas temperaturas de 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C. Primeiramente, foi realizado um pré-inóculo para cada condição de temperatura em meio AC no qual as células inoculadas permaneceram em crescimento por 48h de acordo com a temperatura de interesse sob agitação de 150 r.p.m.

Após esse período, 5 mL do cultivo com crescimento celular foi transferido para um novo frasco cônico contendo o mesmo meio de cultura. O inóculo permaneceu em crescimento por 7 dias sob as mesmas condições de temperatura e agitação do pré-inóculo. A cada 24 h foram coletas amostras para avaliação da atividade antimicrobiana que foi determinada através do ensaio de difusão em poço. Cada amostra foi submetida ao processo de centrifugação por 10 minutos a 13.400 r.p.m para a obtenção do extrato bruto livres de células. A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada através do ensaio de difusão em poço.

3.4.4. Influência do pH não tamponado sobre a atividade antimicrobiana

O efeito do pH na produção do metabólito secundário foi avaliado através da inoculação do isolado de interesse em meio AC ajustado para pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. O pH ajustado ocorreu sem tamponamento do caldo. O isolado foi inoculado conforme as condições descritas no estudo de produção. A cada 24 h foram coletas amostras para avaliação da atividade antimicrobiana que foi determinada através do ensaio de difusão em poço.

3.4.5. Influência do pH tamponado sobre a atividade antimicrobiana

O efeito do pH na produção do metabólito secundário foi avaliado através da inoculação do isolado de interesse em meio AC tamponado para pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. O isolado foi inoculado conforme as condições descritas no estudo de produção. A cada 24 h foram coletas amostras para

avaliação da atividade antimicrobiana que foi determinada através do ensaio de difusão em poço.

3.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software StatSoft, Inc. (2005), STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. Aplicando o teste *Tuckey* ($\alpha=0,05$).

3.6. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da concentração mínima inibitória do extrato bruto otimizado produzido pelo isolado de actinomiceto, foram realizadas diluições do mesmo em meio tripticaseína de soja (TSB) nas proporções de 1 até 1/64. O ensaio foi realizado em microplacas de polipropileno com 96 poços e cada poço foi preenchido com 90 uL do extrato do isolado e suas respectivas diluições acrescidas de 10 ul de amostras de *Enterococcus* sp. *Staphylococcus* sp. na concentração final de 10^5 CFU/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A viabilidade das diluições foi determinada através da semeadura de 20 ul de cada poço em ágar tripticaseína de soja (TSA).

3.7. Estabilidade dos compostos frente a diferentes temperaturas

A estabilidade do extrato bruto foi determinada através da exposição do composto às temperaturas de 40 °C, 50, 60, 70, 80, 90°C e 100°C por 15 e 30 min. Após cada tratamento, a redução da atividade antibiótica do extrato foi determinada através do ensaio de difusão em poço.

Para determinar a atividade residual foi utilizada a seguinte fórmula (Cladera-Oliveira, 2004):

EQUAÇÃO:

Para determinar a atividade residual foi utilizada a seguinte fórmula:

$$A.R.(%) = \frac{Ht - 7}{Hc - 7} \times 100$$

Sendo:

Ht = halo do sobrenadante após tratamento (mm)

Hc = halo do controle (mm) - extrato produzido a 30°C.

A.R.= atividade residual

3.8. Estabilidade dos compostos frente a diferentes enzimas proteolíticas

O extrato bruto otimizado foi tratado com papaína, tripsina e proteinase K, nas concentrações finais de 2 mg/mL, a 37°C por 1 hora, para avaliar o efeito das enzimas proteolíticas sobre a atividade antibiótica. Após cada tratamento, a redução da atividade antibiótica do extrato foi determinada através do ensaio de difusão em poço. Para determinar a atividade residual foi utilizada a mesma fórmula da estabilidade térmica do compostos.

3.9. Cromatografia em camada delgada

3.9.1. Separação dos compostos por cromatografia líquida em camada delgada

Foram utilizadas placas de sílica gel 60 F (Merck) nas quais foram aplicadas 15 uL do extrato bruto. Realizou-se a secagem a temperatura ambiente. A fase móvel foi composta pelos seguintes solventes:

1. BAW1: Butanol/ácido acético/água. 4:1:5
2. BAW2: Butanol/ácido acético/água 3:1:1
3. Clorofórmio/Metanol/Amônia 100: 5: 1
4. Acetato de Etila/ Metanol/Água 100:13,5:10
5. Acetato de Etila/Butanol 1:1
6. Acetato de Etila
7. Butanol
8. Clorofórmio
9. Metanol

As bandas presentes na fase estacionária foram reveladas utilizando lâmpada ultravioleta (Handheld UV Lamp Model 9403F) nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

3.9.2. Autobiografia

A ação antibiótica da(s) banda(s) reveladas na CCD foi determinada através da técnica de autobiografia. Para isso, a placa de CCD foi colocada em uma placa de *Petry* e verte-se sobre esta meio de cultura *Müller-Hinton*. Após, foi realizada a semeadura da cepa teste *S. aureus* 53 na concentração de 0,5 na escala de *McFarland*. Primeiramente, a placa permaneceu a 4°C por 18 h, e depois foi transferida para uma estufa a 37° C por 24 h. A atividade antibiótica da banda foi observada através da inibição do crescimento do micro-organismo teste ao longo da placa de CCD.

3.9.3. Coloração CCD

Foram utilizados os reagentes anisaldeído, cloreto férrico e ninhidrina como reagentes de cor.

A reação de ninhidrina (TROLL & CANNAN, 1953) é realizada com o propósito de visualizar os aminoácidos, pois os mesmos não podem ser visualizados na cromatografia já que não absorvem luz no comprimento de onda visível. A ninhidrina reage com grupamentos amino livres produzindo um composto colorido. Diversos aminoácidos produzem tonalidades de cores com a ninhidrina, o que pode auxiliar na sua identificação. A reação de ninhidrina com prolina, por exemplo, gera um composto amarelo e com tirosina produz uma coloração azulácea.

A análise é feita borrifando uma solução de Ninhidrina sobre a placa de sílica contendo o extrato bruto (composto alvo). A placa é ativada em luz UV e

colocada em estufa a 100°C por aproximadamente 5 minutos. A presença de grupamentos amina livre é confirmada pelo aparecimento de cor azulácea.

O reativo de cloreto férrico é utilizado para identificar a presença de hidroxilas fenólicas, ou seja, grupos OH ligados ao anel aromático. Os fenóis formam complexos coloridos quando ligados ao íon Fe^{3+} . A coloração varia do azul ao vermelho (PAVIA et al., 1999). A solução de cloreto férrico é preparada adicionando 1g de $FeCl_3$ anidro a 100 mL de clorofórmio. Deixa-se uma hora em repouso e adiciona-se piridina (SHINER, 1992). A análise é feita borrifando uma solução de cloreto férrico sobre a placa de sílica contendo o extrato bruto. Então, observa-se o aparecimento da cor.

O anisaldeído é um reagente que é utilizado para identificar alguns compostos naturais como alcalóides ou flavonóides, mas não há um mecanismo de reação estabelecido para as reações que ele desencadeia. Sabe-se apenas que alguns compostos desenvolvem cores características quando revelados com anisaldeído. A metodologia é semelhante à da coloração com ninhidrina, onde se borrifa o reagente sobre a placa e aquece-se a mesma para o desenvolvimento de cor.

Para todos os testes de coloração de CCD foram utilizados os antibióticos de diferentes classes, solubilizados em água (10 mg) na mesma placa de CCD onde foi aplicado o extrato bruto. O sistema utilizado para eluição foi BAW (4:1:5).

Os antibióticos utilizados foram:

- Aminoglicosídeo: estreptomicina
- Rifampicina

- Glicopeptídeos: vancomicina
- Macrolídeo: eritromicina
- Quinolona: norfloxacino, ciprofloxacino.
- Penicilina
- Eritromicina
- Tetraciclina

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil de suscetibilidade das amostras de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp

O perfil fenotípico dos isolados de *Enterococcus* sp, observado pela técnica de disco difusão, mostrou que os mesmos apresentaram resistência a pelo menos cinco dos nove antimicrobianos utilizados (Tabela 3).

Outro aspecto importante observado foi à resistência das amostras de *Enterococcus* de origem clínica frente aos antimicrobianos ciprofloxacino e ácido nalidíxico, onde 100% dos isolados mostraram resistência. Fenotipicamente, 93% das amostras foram resistentes para os antimicrobianos: eritromicina, norfloxacino, vancomicina e estreptomicina. Em contrapartida, todas as amostras foram sensíveis à penicilina e nitrofurantoína.

TABELA 3. Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de *Enterococcus* sp.

<i>Enterococcus</i> sp.	AC.NAL ^a	AMP ^b	CIP ^c	CLO ^d	ERI ^e	NIT ^f	NOR ^g	STRE ^h	VAN ⁱ
488*	R	S	I	I	I	S	I	R	S
1950*	R	S	R	R	S	S	R	R	R
2389*	R	S	R	S	R	S	R	R	R
2074	R	S	R	R	R	S	R	R	R
2688	R	S	R	R	R	S	R	I	R
2714	R	S	R	R	R	S	R	R	R
2499	R	S	R	R	R	S	R	R	R
2390	R	S	R	R	R	S	R	R	R
1854	R	S	R	R	R	S	R	S	R
1884	R	S	R	R	R	S	R	R	R
1885	R	S	R	S	R	R	R	R	R
1950	R	S	R	R	S	S	R	R	R
1953	R	S	R	R	R	S	R	R	R
2072	R	S	R	R	R	S	R	R	R
2319	R	S	R	R	R	S	R	R	R

^a Ácido Nalidixo; ^b Ampicilina; ^c Ciproxacina; ^d Cloranfenicol; ^e Eritromicina; ^f Nitrofurantoína; ^g Norfloxacino; ^h Estreptomicina, ⁱ Vancomicina.. R= resistente; I= intermediário; S= sensível.

*Amostras selecionadas para a avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de actinomicetos

Os *Enterococcus* sp. até recentemente eram considerados como comensais inofensivos, especialmente quando comparado a outras bactérias Gram positivas patogênicas. No entanto, há evidências crescentes de que estas bactérias possuem várias características específicas que lhes permitem sobreviver no ambiente hospitalar, colonizar os pacientes e causar infecções,

tais como bacteremia, endocardite, peritonite, infecções nas vias urinárias e outras infecções relacionadas ao uso de aparelhos hospitalares (SAVA et al., 2010).

O aumento do número de pacientes infectados e colonizados por *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) é um problema mundial. Num estudo envolvendo países da Europa, da América Latina e da América do Norte, no período de 1998 a 2004, foi observado um aumento de duas vezes na taxa de pacientes colonizados por VRE na América do Norte. Na Europa e América Latina as taxas se elevaram, mas de maneira menos expressiva (MOET et al., 2007). No Rio Grande do Sul observou-se nos anos de 2010 e 2011 um aumento significativo no número de casos, tanto de colonização quanto de infecção, em diversos hospitais de grande porte, caracterizando um surto. Na cidade de Porto Alegre, detectaram-se 11 casos a partir de julho em 2009; 235 casos em 2010; e 254 casos em 2011 no período de janeiro a junho (FALCI & DALAROSA, 2012). No Hospital Nossa Senhora da Conceição o primeiro surto de VRE ocorreu no ano de 2000. Após 10 anos de controle, a instituição enfrentou um novo surto, com o primeiro caso em abril/2010. Atualmente, a incidência combinada de colonização/infecção é de 3/1000 pacientes hospitalizados (FALCI & DALAROSA, 2012).

Neste estudo foi possível observar que 100% das amostras de *Staphylococcus* sp. foram resistentes a ampicilina e 90% foram resistentes a eritromicina, oxacilina e clindamicina (Tabela 4).

TABELA 4. Perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de *Staphylococcus* sp.

	Amostras	AM+Á.C ^a	AMP ^b	CIP ^c	CLO ^d	ERI ^e	OXA ^f	RIF ^g	CLIN ^h
<i>S.aureus</i>	21*	R	R	R	S	R	R	R	R
	28	R	R	R	S	R	R	I	R
	53*	R	R	R	R	R	R	S	R
	103*	S	R	R	R	R	R	R	R
	209	R	R	R	S	R	R	S	R
<i>S.epidermidis</i>	177	S	R	S	I	R	R	R	R
	157*	S	R	I	R	R	R	R	R
	221*	S	R	R	S	R	R	R	R
	229	S	R	S	S	S	S	S	S
	51*	R	R	S	R	R	R	R	R

^a Ácido Clavulônico+ Amoxicilina; ^bAmpicilina; ^cCiprofloxacino; ^dCloranfenicol; ^eEritromicina; ^f Oxacillina; ^g Rifampicina, ^hClindamicina. R= Resistente; I= Intermediário; S= Sensível.

*Amostras selecionadas para a avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de actinomicetos

As amostras de *Staphylococcus aureus* apresentaram resistência a pelo 75% dos antimicrobianos utilizados, sendo que 80% das amostras foram resistentes ao antimicrobiano amoxicilina + ácido clavulônico e 100% resistentes aos antimicrobianos: ampicilina, eritromicina, oxacilina, clindamicina e ciprofloxacino (Tabela 4).

S. aureus é um importante patógeno que pode causar infecções graves, tanto em pessoas saudáveis quanto em pessoas imunocomprometidas. Os antibióticos oxacilina e a metilina foram utilizados pela primeira vez na clínica

no início dos anos de 1960, no entanto alguns anos depois apareceram os primeiros isolados de *S. aureus* resistentes a estes agentes, coletivamente denominados meticilina-resistentes (MRSA) (AYLIFFE, 1997).

Num estudo realizado por quatro instituições do Brasil participantes do *Antimicrobial Surveillance Program in Latin America – SENTRY*, (Hospital São Paulo / UNIFESP, São Paulo, SP; Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS; Hospital de Base do Distrito Federal, Brasília, DF; e Laboratório Médico Santa Luzia, Florianópolis, SC) foi avaliado a resistência antimicrobiana de amostras Gram positivas isoladas de hospitais entre os períodos de janeiro 2005 a setembro 2008. Neste estudo, *S. aureus* foi o microrganismo mais comumente encontrado em infecções na corrente sanguínea, 31% das amostras foram resistentes a oxacilina e a grande maioria dos MRSA mostrou-se resistentes a clindamicina, ciproflaxacino e levofloxacino. Em contrapartida, vancomicina e doptomicina foram eficazes contra todas as amostras isoladas (GALES et al., 2009).

As amostras de *Staphylococcus epidermidis* foram resistentes a pelo menos 62,5% dos antimicrobianos testados, a exceção do isolado 229 que apresentou resistência apenas a ampicilina. As amostras de *S. epidermidis* apresentaram resistência principalmente a ampicilina (100%), eritromicina (80%), oxacilina (80%), rinfampicina (80%) e clindamicina (80%) (Tabela 4).

Segundo Diekema et al. (2001), em muitos países 75% a 95% dos isolados hospitalares de *S. epidermidis* são resistentes à meticilina, um antibiótico de primeira escolha contra infecções por estafilococos, enquanto que para *S. aureus* essa taxa corresponde entre os valores de 40 a 60%. Assim como em *S. aureus*, a resistência à meticilina é codificada em elementos

genéticos móveis (EGM), ou seja, no cassete cromossômico *mec* (SCC*mec*), que codifica uma proteína de ligação à penicilina, PBP2a, que apresenta uma afinidade diminuída para a meticilina contra as afinidades de outras PBPs (CHAMBERS, 1985).

Além da resistência à meticilina, *S. epidermidis* adquiriram resistência a vários antibióticos, incluindo rifamicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e sulfonamidas. A resistência a estreptograminas, linezolida e tigeciclina também ocorre, embora menos frequente (ROGERS et al., 2009).

4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de actinomicetos

4.2.1. Técnica da sobrecamada

No ensaio de sobrecamada, 57,3% dos actinomicetos utilizados apresentaram atividade contra as amostras clínicas selecionadas a partir do perfil de suscetibilidade analisado no antibiograma. Os isolados de actinomiceto 50 e 8S formam os que apresentaram atividade contra 90% das amostras clínicas de *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp. selecionadas (Tabela 5). Dos microrganismos Gram positivos selecionados a partir do ensaio de difusão em disco, as amostras 1950 (*E. faecalis*), 488 (*E. faecium*) e 1300 (*E. faecium*) foram inibidos somente pelos actinomicetos 50 e 8S. As amostras mais sensíveis, ou seja, que foram inibidas por um maior número de isolados de actinomicetos, foram, respectivamente, 103 (*S. aureus*), 157 (*S. epidermidis*) e 2389 (*E. faecium*).

4.2.2. Estudo de difusão em poço

Por apresentar atividade antibiótica contra a 83,33% e 91,66% das amostras clínicas selecionadas, os isolados 8S e 50 foram escolhidos para o ensaio de difusão em poço. Neste ensaio, os isolados foram crescidos em cultura submersa em caldo AC e o extrato bruto produzido pelo actinomiceto 50 inibiu as amostras clínicas testadas produzindo índices de antibiose nos valores entre 2,21 mm (amostra 221) e 3,78 mm (amostras 21, 103 e 488) (Tabela 6).

O extrato bruto produzido pelo isolado 8S não apresentou atividade inibitória contra as amostras clínicas de *S. epidermidis* 221 e 51 (Tabela 6).

Na avaliação da ação antibiótica utilizando a técnica de sobrecamada foi observada a ausência de atividade antibiótica dos isolados 50 e 8S contra a amostra clínica 51. Por essa razão, era esperado que não houvesse atividade antibiótica no ensaio de difusão em poço. A divergência nos resultados obtidos entre o ensaio de sobrecamada e o ensaio de difusão em poço para o isolado 8S pode ser devido ao fato que a formação de moléculas bioativas, durante o crescimento em meio líquido, é geralmente limitada à fase estacionária e durante o crescimento da cultura, meio sólido, esta produção geralmente coincide com a diferenciação morfológica (CHATER & BIBB, 1977).

TABELA 5. Atividade antibiótica dos actinomicetos testados contra os microrganismos Gram positivos no ensaio da sobrecamada.

Actinomicetos	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>		
	2389	1950	488	1300	21	53	103	157	221	51
1S						X	X	X	X	X
8S	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
50	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
L1.1	X						X			
L1.2								X		
L1.4						X	X	X		
L1.5						X		X		
L1.9	X						X			
L1.11								X		
L1.12								X		
L1.13	X						X			
L1.14	X									
L1.15						X		X		
L1.16							X			
L1.18								X		
L1.20								X		
L1.21							X			
L1.22							X	X		

Continuação TABELA 5. Atividade antibiótica dos actinomicetos testados contra os microrganismos Gram positivos no ensaio da sobrecamada.

L2.2			X
L2.6			X
L3.3			X
L4.4	X		
L5.5		X	X

(x) indica a formação de halo. Observação: na tabela são mostrados apenas os isolados de actinomicetos que apresentaram atividade contra pelo menos um isolado clínico.

A diferença entre os resultados obtidos, pelos dois isolados de actinomicetos, através do ensaio de difusão em poço pode estar relacionado a concentração/difusão em meio líquido dos metabólitos formados ou ainda a eficácia das moléculas bioativas formadas. Ou seja, o actinomiceto 50 pode ser capaz de produzir um número maior da molécula bioativa sob as mesmas condições de crescimento que o actinomiceto 8S ou ainda, mesmo formando a mesma quantidade de moléculas, a difusão destas pode ocorrer de maneira diferente quando o microrganismo cresce em meio líquido. Cunha et al. (2010) ao estudar a produção de beta-lactamase em 16 isolados de actinomicetos frente a isolados causadores de mastite bovina, observaram que em meio sólido todos os isolados apresentaram atividade antibiótica, quando aplicada a técnica de difusão em poço, apenas 2 isolados foram capazes de formar halos de inibição. Os autores justificaram que esses dois isolados de actinomicetos foram eficazes no ensaio de difusão porque ocorreu maior difusão das suas moléculas utilizando a metodologia de difusão em poço.

Esses resultados também corroboram com o estudo realizado por Salamoni et al.(2010) onde 80% dos isolados de *Streptomyces* mostraram atividade antibiótica no ensaio de dupla camada mas somente 44% das amostras mostraram atividade quando crescidas em meio líquido.

Por apresentar halos significativamente maiores contra um número maior de amostras clínicas o actinomiceto 50 foi escolhido para a otimização de produção de seu extrato bruto (tabela 6).

TABELA 6. Perfis de atividade antibiótica dos isolados de actinomiceto 8S e 50 contra cocos Gram positivos de origem clínica. Técnica de difusão em poço. Crescimento em meio AC durante 7 dias, 30°C, 150 r.p.m.

Cocos Gram positivos clínicos	50	8S
21	3,42*	2,92*
53	3,28	1,42
103	3,78	2,92
157	3,21	1,57
221	2,21	0
488	3,85	1,71
1300	3,21	1,57
1950	3,35	2,28
2389	3,35	2,28
<i>S. aureus</i> ATCC 27664 SEE (Fiocruz)	4,00	3,42
ATCC <i>Enterococcus faecium</i> 43	3,21	2,14

Índice de antibiose(I.A)= média dos halos de inibição/diâmetro da ponteira. Médias seguidas de

*, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

4.3.Otimização da produção dos compostos bioativos

A otimização da produção dos compostos com atividade antibiótica foi realizada através da avaliação da curva de produção, variação de fonte de carbono, tempo de incubação, pH tamponado e pH não tamponado do caldo de cultivo.

Para estes ensaios foram escolhidas aleatoriamente amostras de *Enterococcus* sp. e *Staphylococcus* sp., sendo elas: 1950 (*E. faecium*) , 221 (*S. epidermidis*), 53 (*S. aureus*) e 488 (*E. faecalis*).

4.3.1. Curva de crescimento para a produção de metabólito ativo

Para a avaliação da atividade antibiótica o isolado 50 foi crescido em caldo AC, durante sete dias, a 30 °C (Tabela 7). A cada 24h uma amostra era retirada para determinação da biomassa e produção de moléculas bioativas.

Nesse experimento não foi observada diferença significativa entre os valores dos índices de antibiose formados nos tempos de 72 h, 120 h e 148 h para todas as amostras clínicas testadas. Estes valores também representam os maiores índices de antibiose obtidos neste experimento.

A curva de crescimento realizada permitiu observar que ocorreu um crescimento contínuo do actinomiceto ao longo do tempo, apresentando um indício de estabilidade da biomassa após o quinto dia de crescimento (Figura 2).

A produção de metabólitos secundários por *Streptomyces* sp. ocorre, geralmente na fase estacionária do crescimento (GRAMAJO et al., 1993). Neste estudo, foi observado 3 picos de produção de metabólitos secundários

com atividade significativamente maior do que nos outros períodos. O primeiro pico em 72 h pode ser caracterizado como o final da fase log de crescimento, onde, segundo Vining (1986), pode ocorrer à formação de metabólitos secundários. O autor ainda destaca que o padrão bifásico, no qual a fase de produção (idiofase) se inicia com o término da fase de crescimento (trofofase), nem sempre ocorre, ou seja, o produto do metabolismo secundário pode ser formado durante a trofofase. A partir do quinto dia, aconteceu a estabilização da produção de biomassa, sugerindo que em 44 h se inicia a fase estacionária. Ao mesmo tempo pôde-se observar a ocorrência de 2 picos de atividade antibiótica, em 120 h e em 148 h. Os padrões de inibição sugerem que possa haver a produção de um composto formado por um conjunto de moléculas bioativas, na qual é observada o início de atividade em 72 h. Muitos estudos apontam que o tempo para o crescimento tem efeito significativo na produção de compostos antibióticos (SILVA et al., 2012; SONG et al., 2012; JAIN et al., 2011). Ao estudar a produção de L-asparaginase por *Streptomyces abiduflavus*, Narayana et al. (2008) obtiveram níveis máximos de produção do composto no período de 72 h de incubação; o mesmo período de incubação também foi apontado como melhor tempo para produção de antibiótico antitumoral por *Streptomyces capoamus* (MUKHTAR et al., 2012).

Por não haver diferença significativa entre os halos formados nos tempos de 72h, 120h e 148h, foi determinado como tempo de melhor produção do metabólito secundário, o tempo de crescimento de 72h, por este ser o menor tempo.

TABELA 7. Valores dos índices de antibiose produzidos contra bactérias Gram positivas de origem clínica empregando-se o extrato bruto do isolado 50 crescido durante 7 dias, a 30°C, a 150 r.p.m.

Tempo	1950	221	53	488
24h	0	0	0	0
48h	1,5	0	0	2,71
72h	4,07*	3,5*	3,92*	3,92*
96h	3,28	2,28	2,35	3
120h	3,5*	3,5*	3,28*	3,92*
148h	4,28*	3,85*	4*	4,28*
196h	3,5*	2,92	3	3,85*

Índice de antibiose(I.A)= média dos halos de inibição/diâmetro da ponteira. Médias seguidas de

*, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

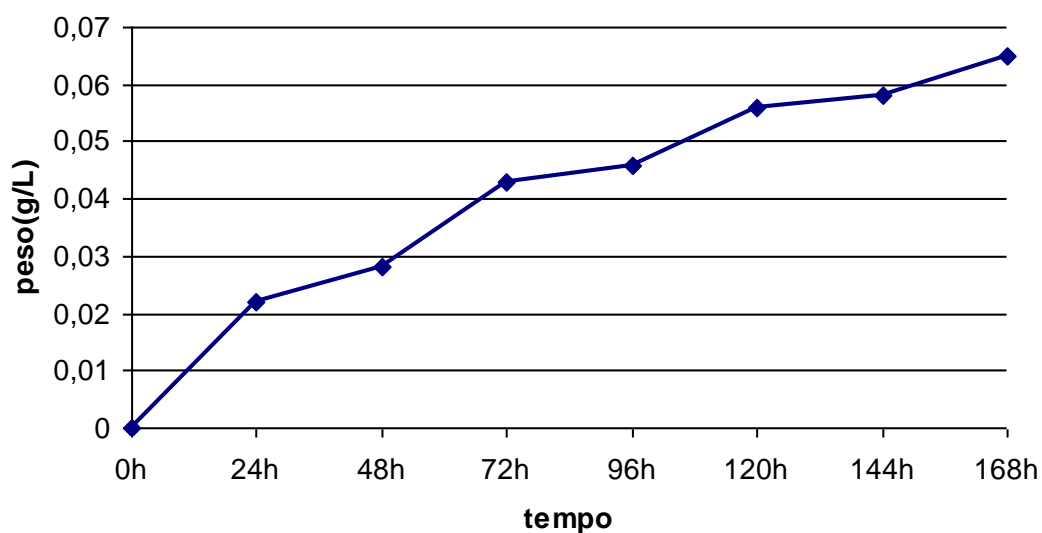


Figura 2. Curva de crescimento do Actinomiceto 50 em caldo amido caseína (AC) durante 7 dias a 30°C com agitação de 150 r.p.m.

4.3.2. Avaliação da produção de metabólitos ativos em diferentes fontes de carbono

Neste ensaio foi avaliada a influência de quatro fontes de carbono na produção de metabólito(s) ativo(s): sacarose, amido, glicerol e glicose na produção de moléculas bioativas. Os resultados mostram que o isolado 50 produziu compostos com atividade antibiótica com as quatro fontes de carbono testadas (Tabela 8). A melhor atividade contra os cocos Gram positivos foi na presença de amido em 72h de crescimento, neste período os índices de antibiose foram significativamente maiores para os isolados **53 e 488**. Para o isolado 1950, a melhor atividade ocorreu em 72 e 120h não havendo diferença significativa entre os dois tempos. Para o isolado **221**, os melhores tempos de produção foram 120 h e 72 h.

Na presença de sacarose, não foi observada atividade antibiótica contra o isolado 1950 ao longo do tempo testado. Para os demais isolados, essa atividade foi observada a partir de 24 h. O melhor período de atividade antibiótica contra o isolado 221 ocorreu a partir de 72 h, e para os isolados 53 e 488 ocorreu em 120 h. A atividade antibiótica na presença de glicerol foi observada a partir de 48 h de crescimento. O melhor tempo para produção de moléculas bioativas apresentou variação entre os isolados teste, sendo 48 h para a amostra 53; 72h para a amostra 488; 96h para a amostra 1950 e 120 h para a amostra 221. Na presença de glicose, a formação de halos de inibição ocorreu apenas no período de 72h onde a atividade inibitória foi positiva para todas as amostras clínicas.

A produção tardia de metabólitos quando utilizada a glicose pode ser devido ao fato da mesma ser um substrato rapidamente assimilável e geralmente o emprego de substratos rapidamente assimiláveis leva a uma menor produção de metabólitos secundários. O crescimento de organismos é mais rápido quando fontes de carbono, nitrogênio e fosfato, facilmente assimiláveis, são abundantes no meio de cultivo. Este fato, em parte, deve-se à repressão e inibição que estes compostos exercem sobre a maioria dos processos celulares não essenciais. Em princípio, a produção de antibióticos pode estar sujeita aos mesmos controles regulatórios. De fato, a ocorrência da síntese destes compostos em estado estacionário pode ser um reflexo do alívio da repressão/inibição, após a exaustão de um ou mais nutrientes (CHATER & BIBB, 1994). A glicose é reconhecida como uma eficiente fonte de carbono para o crescimento microbiano, no entanto, apresenta efeito negativo sobre a síntese de diversos metabólitos secundários. Polissacarídeos, oligossacarídeos e lipídeos constituem, frequentemente, fontes de carbono mais eficientes para a produção de metabólitos secundários (DEMAIN & FANG, 1995). Por ser uma molécula mais simples, a glicose é metabolizada mais rapidamente que as demais fontes de carbono utilizadas, contribuindo apenas para síntese de material celular. Dessa forma, uma pequena quantidade de carbono e energia fica disponível para a produção de antibióticos.

Os resultados obtidos no ensaio com fontes de carbono mostraram que o amido foi a melhor fonte de carbono para a produção de compostos antibióticos, levando em consideração o menor tempo para a produção desses metabólitos.

Esse resultado corrobora com os dados encontrados por outros autores ao estudar a influência da fonte de carbono na produção de moléculas bioativas. Lebrihi, Lefebvre and Germain (1988) estudaram a regulação catabólica do carbono em *Streptomyces clavuligerus* na biossíntese de cefamicina C e expandase. Os autores utilizaram amido e glicerol como fonte de carbono e observaram que a atividade das enzimas cefamicina C sintetase e expandase foram maiores quando o amido foi empregado como fonte de carbono. Gao et al. (2009) também obtiveram melhores resultados quando utilizaram amido como fonte de carbono ao estudar a otimização de produção de avermectina por *Streptomyces avermitilis*.

TABELA 8. Valores dos índices de antibiose formados contra os cocos Gram positivos empregando extrato bruto do isolado de actinomiceto 50 crescido em diferentes fontes de carbono, durante 5 dias, a 30°C, a 150 r.p.m.

	Tempo	1950	221	53	488
Sacarose	24h	0	1,42	2,85*	2,57*
	48h	0	2,14	1,85	1,71
	72h	0	3,42*	3*	2,57*
	96h	0	3,14*	3*	2,85*
	120h	0	3,14*	3,71	3,57
Amido	24h	0	0	0	0
	48h	1,28	0	0	2,57
	72h	3,85*	3,28	4*	3,92*
	96h	3	2,28	3,85*	2,28

Continuação TABELA 8. Valores dos índices de antibiose formados contra os cocos Gram positivos empregando extrato bruto do isolado de actinomiceto 50 crescido em diferentes fontes de carbono, durante 5 dias, a 30°C, a 150 r.p.m.

Amido	120h	4,14*	3,71	2,57	3,71*
	24h	0	0	0	0
	48h	1,71	1,14	3,85	1,71
Glicerol	72h	2,35	1,57	1,78	3,14
	96h	2,85	2	3	2,14
	120h	0	2,35	1,14	0
	24h	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0
	72h	1,42	1,5	1,57	1,85
	96h	0	0	0	0
Glicose	120h	0	0	0	0

Índice de antibiose(I.A)= média dos halos de inibição/diâmetro do poço.. Médias seguidas de *, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

4.3.3. Influência da temperatura sobre a atividade antimicrobiana

Outro parâmetro físico avaliado foi a influência da temperatura na produção dos compostos bioativos. As temperaturas testadas variaram de 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C e 55°C, utilizando amido como fonte de carbono, sem o controle de pH do meio. A melhor atividade antibiótica foi observada a 30°C no período de 72 h (Tabela 9). Não foi observada diferença significativa

entre os índices de antibiose formados nos intervalos de 72, 120 e 144 h para todas as amostras testadas.

Na temperatura de 35°C o melhor tempo para atividade inibitória ocorreu as 96 h. A partir desse tempo não foi observada diferença significativa nos valores dos índices de antibiose formados, a exceção para a amostra 1950 nos tempo de 144 e 168 h. Quando incubado a 40°C, o extrato produzido pelo actinomiceto 50 apresentou maior atividade inibitória a partir de 120 h, não havendo diferença significativa após esse período. A partir de 40°C não foi observada atividade inibitória frente à amostra 53, sendo esta retomada em alguns períodos de incubação no extrato bruto produzido a 50°C. À temperatura de 45°C, o extrato bruto produzido pelo actinomiceto 50 formou halos de inibição para as amostras 1950, 221 e 488 em 168 h de cultivo. No crescimento a 50°C a atividade antibiótica para todos os isolados ocorreu em 144 h. Foi observada a formação de halos de inibição pontual em 24 h para isolados 53 e 488. Quando incubado a 55°C não foi observado crescimento do actinomiceto 50.

A habilidade do actinomiceto 50 de produzir moléculas bioativas a 50°C pode estar relacionada com a origem de isolado. O actinomiceto 50 é oriundo do processo de compostagem, neste ambiente a atividade microbiana pode alcançar temperaturas de até 65°C, deste modo, a tolerância desse microrganismo a elevadas temperaturas pode estar relacionada ao seu habitat.

O isolado 50 produziu moléculas bioativas nas faixas de temperatura entre 30 e 50°C. A capacidade de produção de moléculas antibióticas pelo isolado 50 já havia sido observada em estudos anteriores, onde o mesmo foi capaz de inibir amostras de *Enterococcus* sp. multirresistentes de origem

ambiental e clínica (ANTUNES & VAN DER SAND, 2013). Diferentes estudos têm demonstrado a habilidade de isolados de *Streptomyces* sp. em produzir moléculas bioativas em diferentes faixas de temperatura (SILVA, et al., 2012; BURDOCK et al., 2011; JAMES & EDWARDS, 1988). Nesse estudo foi observado que, a melhor temperatura de incubação para produção de moléculas bioativas foi 30°C. Nesta temperatura os melhores períodos de produção de metabólitos foram 72 h, 120 h e 144 h onde a formação de halos de inibição foi significativamente maior contra todos os cocos Gram positivos testados.

Oskay (2009) ao estudar o efeito da temperatura sobre a atividade antifúngica e antibacteriana de compostos produzidos por *Streptomyces* sp. observou que a melhor temperatura de incubação era 30°C, com 96 h de incubação. A mesma faixa de temperatura também apresentou melhores resultados no estudo de Mukhtar et al. (2012) na produção de moléculas antitumorais produzidas por *Streptomyces capoamus*, no período de incubação de 72 h.

A atividade pontual observada a 45°C e 50°C pode ser um indicativo de que o composto antibiótico é formado por um complexo de moléculas que podem apresentar um sinergismo e tem sua atividade diminuída na ausência de alguma das moléculas. A detecção de complexos antimicrobianos formados por mais de uma molécula bioativa é um fato observado em diferentes estudos, Badji et al. (2006) purificaram através de cromatografia líquida de alta eficiência um complexo com ação antifúngica produzido *Actinomadura* sp. formado por quatro compostos.

O mesmo fato foi relatado por Ezra et al. (2004) que ao estudar a composição de coramicina, produzido por *Streptomyces* sp. detectaram a presença de dois peptídeos com massas de 1217.9 e 1203.8 Da.

Um fato peculiar observado neste estudo foi a habilidade do actinomiceto 50 de produzir moléculas bioativas a 50°C, esse fenômeno pode estar correlacionado com a origem de isolado. O actinomiceto 50 é oriundo do processo de compostagem e neste ambiente a temperatura pode alcançar até 65°C; deste modo, a tolerância desse microrganismo a elevadas temperaturas pode estar relacionada ao seu habitat.

TABELA 9. Otimização da produção de compostos produzidos pelo isolado 50 de actinomiceto em caldo AC, submetidos a diferentes temperaturas de incubação.

	Tempo	1950	221	53	488
30°C	24h	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	1,50	0,00	0,00	2,71
	72h	4,07*	3,50*	3,93*	3,93*
	96h	3,28	2,28	2,35	3,00
	120h	3,50*	3,50*	3,29*	3,92*
	144h	4,28*	3,86*	4,00*	4,28*
	168h	3,50*	2,93*	3,00	3,86*
35°C	24h	1,71	0,00	0,00	0,00
	48h	2,50*	1,57	2,50*	2,14
	72h	1,93*	0,00	2,93*	2,07
	96h	3,50	3,00*	3,07*	2,35*
	120h	3,00*	2,21*	3,57*	3,14*
	144h	2,92	2,50*	3,42*	3,50*
	168h	1,71	2,21*	2,93*	3,00*
40°C	24h	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	2,28	2,50	0,00	0,00
	72h	3,14	2,28	0,00	2,36
	96h	3,28*	3,21	0,00	2,35
	120h	4,21*	3,93*	0,00	3,07*

Continuação TABELA 9. Otimização da produção de compostos produzidos pelo isolado 50 de actinomiceto em caldo AC, submetidos a diferentes temperaturas de incubação.

40°C	144h	4,14*	4,21*	0,00	3,42*
	168h	4,07*	4,21*	0,00	3,78*
45°C	24h	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	0,00	0,00	0,00	0,00
	72h	0,00	0,00	0,00	0,00
	96h	0,00	0,00	0,00	0,00
	120h	0,00	0,00	0,00	0,00
	144h	1,50	0,00	0,00	0,00
	168h	3,57	2,86	0,00	3,86
	50°C	24h	0,00	0,00	1,50
48h		0,00	0,00	0,00	0,00
72h		0,00	0,00	0,00	0,00
96h		0,00	0,00	0,00	0,00
120h		0,00	0,00	2,14	0,00
144h		3,57	2,78	3,64	3,64
168h		0,00	0,00	0,00	0,00

Índice de antibiose(I.A)= média dos halos de inibição/diâmetro da ponteira. Médias seguidas de

*, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

4.3.4. Influência do pH na produção do composto antimicrobiano

O terceiro parâmetro avaliado para a otimização da produção dos compostos bioativos produzidos pelo isolado 50 foi a influência do pH. Foram realizados dois experimentos: o primeiro com o controle do pH inicial do meio de cultura AC, sem tamponamento; o segundo com o tamponamento do pH do meio de cultivo. Para as duas análises a variação de pH utilizado foi de 5.0 a 10.0. No primeiro experimento, foi observado que o isolado 50 regulou o pH final do meio depois de 7 dias de crescimento para o valor médio de 6,5, a exceção foi daquele em que o pH inicial era 5,0 (Tabela 10). Não foi observada diferença significativa entre os halos de inibição formados entre as variações de pH testadas.

TABELA 10. Índice de antibiose e valores finais de pH formados pelo extrato do isolado 50 crescido em meio AC, com controle do pH inicial, sem tamponamento. Crescimento durante 7 dias, a 30°C, a 150 r.p.m.

pH inicial	221	53	488	1950	pH final
5,0	3,85*	4,35*	4,07*	4,50*	7,72
6,0	4,07*	4,39*	4,78*	4,46*	6,43
7,0	4,5*	4,64*	5,07*	4,75*	6,37
8,0	4,28*	4,64*	4,57*	4,92*	6,51
9,0	4,35*	4,69*	4,57*	4,71*	6,26
10,0	4,10*	4,21*	4,03*	4,28*	6,21

Índice de antibiose (I.A)= média dos halos de inibição/diâmetro da ponteira. Médias seguidas de *, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

O melhor resultado obtido para a formação de compostos com atividade antibiótica em caldo AC tamponado ocorreu em 96 h com o valor de pH tamponado em 5,0 (Tabela 11). Para os pH tamponados 6,0; 7,0 e 8,0 a formação de halos de inibição ocorreu a partir de 120 h. Não foi observada a formação de halo de antibiose para o isolado 221 em pH 8,0. Nos valores de pH 9,0 e 10,0 ocorreu crescimento do isolado 50, mas não foi observada a formação de halos de inibição pelo extrato bruto obtido.

TABELA 11. Índice de antibiose formado pelo extrato do isolado 50 crescido em meio AC em pH tamponado durante 7 dias a 30°C, a 150 r.p.m.

	Amostra	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
pH 5.0	1950	-	-	1,57	3,28*	3,36*	3,28*	3,42*
	221	-	-	-	2,28*	2,71*	2,78*	2,42*
	488	-	-	-	2,85*	3,42*	3,21*	2,14*
	53	-	-	-	3,71*	3,00*	3,5*	3,28*
pH 6.0	1950	-	-	-	-	3,28*	3,00*	2,71
	221	-	-	-	-	-	1,92	1,42
	488	-	-	-	-	3,07*	3,07*	2,85*
	53	-	-	-	-	2,64*	3,21*	2,78
pH 7.0	1950	-	-	-	-	2,42*	2,42*	1,78
	221	-	-	-	-	-	1,42*	1,42*
	488	-	-	-	-	2,92*	2,64*	2,71*
	53	-	-	-	-	1,85	2,71*	2,64*
pH 8.0	1950	-	-	-	-	2,85	2,42	-
	221	-	-	-	-	-	-	-
	488	-	-	-	-	-	2,35*	2,5*
	53	-	-	-	-	2,35*	2,64*	2,71

Índice de antibiose(I.A)= média dos halos de inibição/diâmetro da ponteira. Médias seguidas de *, nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Nos estudos de Song et al. (2012) foi observado que o pH inicial do meio de cultivo teve um grande impacto na atividade antibacteriana do isolado de *Streptomyces* sp. YJ1. Os compostos produzidos apresentaram um aumento da atividade com valores iniciais de pH de 5,0 a 7,0, com decréscimo de atividade inibitória para valores acima dessa faixa de pH. Thumar et al. (2010), também observaram a habilidade do isolado Kut-8 de *Streptomyces* sp. em secretar substâncias antibióticas quando crescido meio de cultura com pH entre as faixas de pH 7,0 a 9,0. Guimarães (2000) ao estudar a influência do preparo do inóculo e do pH na produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* So20, cultivado em biorreator, com agitação rotativa a 200 r.p.m e a uma temperatura de 30°C, observou que o pH 7,0 foi o que conduziu a melhores resultados no processo de produção de retamicina.

Os estreptomicetos são conhecidos por excretarem grande variedade de ácidos orgânicos no meio, sendo que a natureza e a quantidade destes ácidos dependem do tipo de limitação empregada (INOUE, 2006). Alguns estudos (SUROWITZ & PFISTER, 1985; DEKLEVA & STROHL, 1987) revelaram que a presença de alguns ácidos graxos pode influenciar na produção de moléculas antibióticas por estes alterarem o pH do meio de cultivo. O tamponamento do pH do meio de cultivo pode afetar o metabolismo do microrganismo por não ocorrer à alteração do pH do meio não permitindo, dessa maneira, que o microrganismo module as condições do meio do cultivo para as condições de produção de moléculas bioativas.

4.4. Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto produzido pelo isolado 50 contra as bactérias cocos Gram positivas foi na proporção de 1:4 para as amostras 1950 e 488; 1:64 para 221 e 1:128 para a amostra 53, conforme mostra a Tabela 12 .

Para esta avaliação, a diluição do extrato foi mais eficaz contra as amostras de *Staphylococcus* sp.

A diluição do extrato foi mais eficaz para as amostras de *S. epidermidis* 221 sendo ativa até a diluição máxima utilizado no estudo.

A eficácia da diluição do extrato foi menor contra as amostras de *Enterococcus* sp. , os cocos clínicos 488 e 1950 apresentaram o mesmo valor para o CIM. Esse resultado pode estar relacionado com o perfil das amostras determinado pelo antibiograma, nesta análise as amostras apresentaram perfil fenotípico similar diferenciando apenas para os antimicrobianos eritromicina e vancomicina.

TABELA 12. Concentração inibitória mínima do extrato bruto produzido pelo isolado 50 com 72 h de crescimento, sem controle de pH, a 30°C, a 150 r.p.m.

	Cocos clínicos	CIM
<i>E. faecalis</i>	1950	1:4
<i>E. faecium</i>	488	1:4
<i>S. epidermidis</i>	221	1:64
<i>S. aureus</i>	53	1:128

4.5. Estabilidade dos compostos frente a diferentes temperaturas

A estabilidade do extrato bruto produzido pelo isolado 50 foi determinada através da exposição do extrato bruto otimizado às temperaturas de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C por 15 e 30 min. Após cada tratamento, a redução da atividade antibiótica do extrato foi determinada através do ensaio de difusão em poço. Os compostos presentes no extrato bruto mostraram-se estáveis mediante o tratamento em diferentes temperaturas (Figura 3). Em 40°C não ocorreu redução da atividade do extrato em comparação ao controle. Os menores percentuais obtidos, 85%, foram a 90°C, em 15 e 30 minutos.

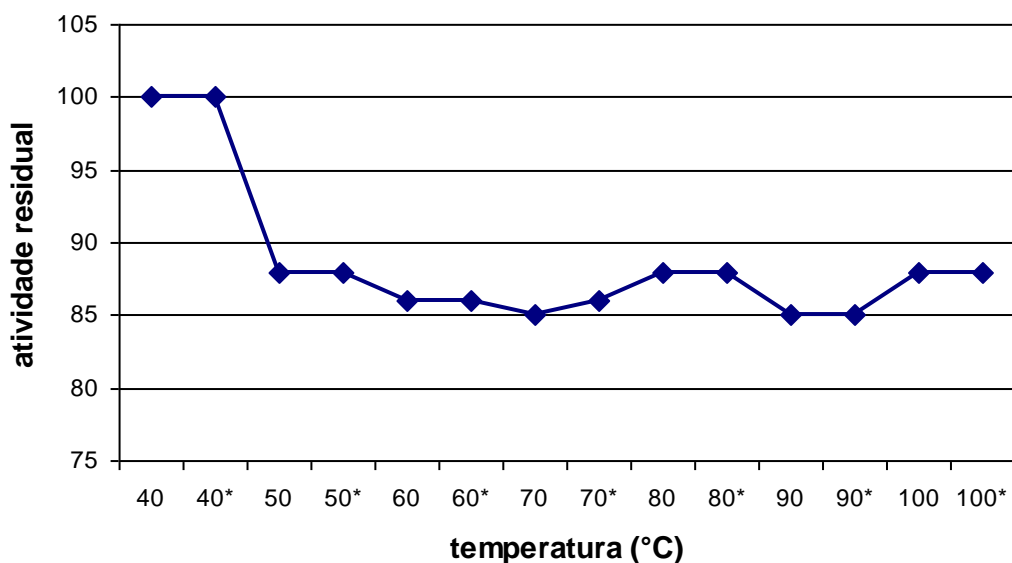


Figura 3. Atividade residual do extrato bruto produzido pelo actinomiceto 50 após incubação em diferentes temperaturas por 15 minutos e 30 minutos contra o isolado 53. Temperaturas seguidas de * indicam tratamento de 30 minutos.

A tolerância térmica apresentada pelo metabólito produzido pelo isolado 50 também foi encontrada por Uddin, et al. (2010) ao estudarem a otimização de um metabólito antimicrobiano produzido por *Streptomyces fulvoviridis* e verificaram que o antimicrobiano era estável ao tratamento de até 100°C por meia hora. Iqbal et al. (1994) relataram a estabilidade de peroxidases produzidas por *Streptomyces thermoviolaceus* por um período de 24 h a 50°C e por 10 minutos a 70°C. Outro estudo realizado por Amena et al. (2010) demonstraram a termoestabilidade a 80°C por 60 minutos da L-asparaginase produzida por de *Streptomyces gulbargensis*.

4.6. Estabilidade antibiótica frente a enzimas proteolíticas

O extrato do actinomiceto 50 foi tratado com proteinase K, tripsina e papaína nas concentrações finais de 2 mg/mL para avaliar o efeito das enzimas proteolíticas sobre a atividade antibiótica do extrato bruto. O extrato manteve sua atividade ao ser tratado com 2 mg/mL de todas as enzimas testadas, mas apresentou redução da atividade inibitória após o tratamento com as três proteinases sendo mais sensível ao tratamento com a tripsina, onde sua atividade residual manteve-se em 27% (Figura 4).

Essa análise permitiu determinar que os compostos antibióticos apresentam composição proteica, pois a sua atividade foi reduzida com o tratamento das proteinases utilizadas no estudo. É possível ainda inferir que os compostos apresentam em sua composição outras moléculas além de proteínas já que a sua atividade inibitória foi mantida após o tratamento com proteinases.

Bizani & Brandelli, (2002) ao estudarem a sensibilidade a enzimas proteolíticas de uma bacteriocina produzida por um isolado de *Bacillus* sp. observaram que a mesma era sensível a proteinase K na concentração de 2mg/mL, porém essa molécula não apresentou suscetibilidade à papaína ou tripsina, mantendo sua atividade residual com valores percentuais de 100%. Fontoura et al. (2009), também relatou a estabilidade de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Pseudomonas aeruginosa* frente à papaína, tripsina, proteinase K e pronase E.

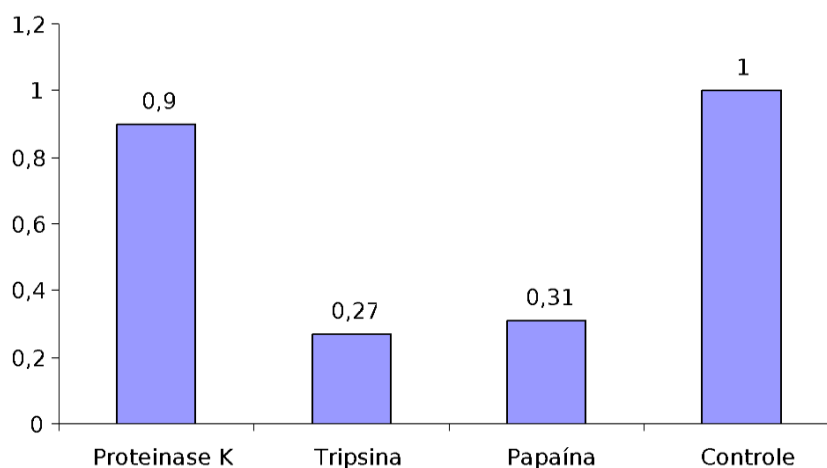


Figura 4. Atividade residual do extrato bruto produzido pelo actinomiceto 50 após o tratamento com enzimas proteolíticas.

4.7. Cromatografia em camada delgada

4.7.1. Separação dos compostos e autobiografia

A cromatografia em camada delgada realizada com o sistema de solvente BAW (butanol, ácido acético e água) na proporção de 4:1:5 mostrou a presença de duas bandas visualizadas na luz UV no comprimento de onda de 365 nm, com um fator de retenção de 0,28 (Rf1) e 0,57 (Rf2), respectivamente (Figura 5). O fator de retenção é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel.



Figura 5. Cromatografia em camada delgada do extrato bruto do isolado 50. Sistema de solvente BAW (butanol, ácido acético e água) 4:1:5. Leitura 365 nm. Rf1 (Fator de retenção 1 = 0,28); Rf2(Fator de retenção 2 = 0,57), P.A (ponte de aplicação da amostra).

A autobiografia revelou que a banda capaz de inibir o crescimento do isolado clínico 53 se localizava entre as bandas visíveis Rf1 e Rf2 (Figura 6).

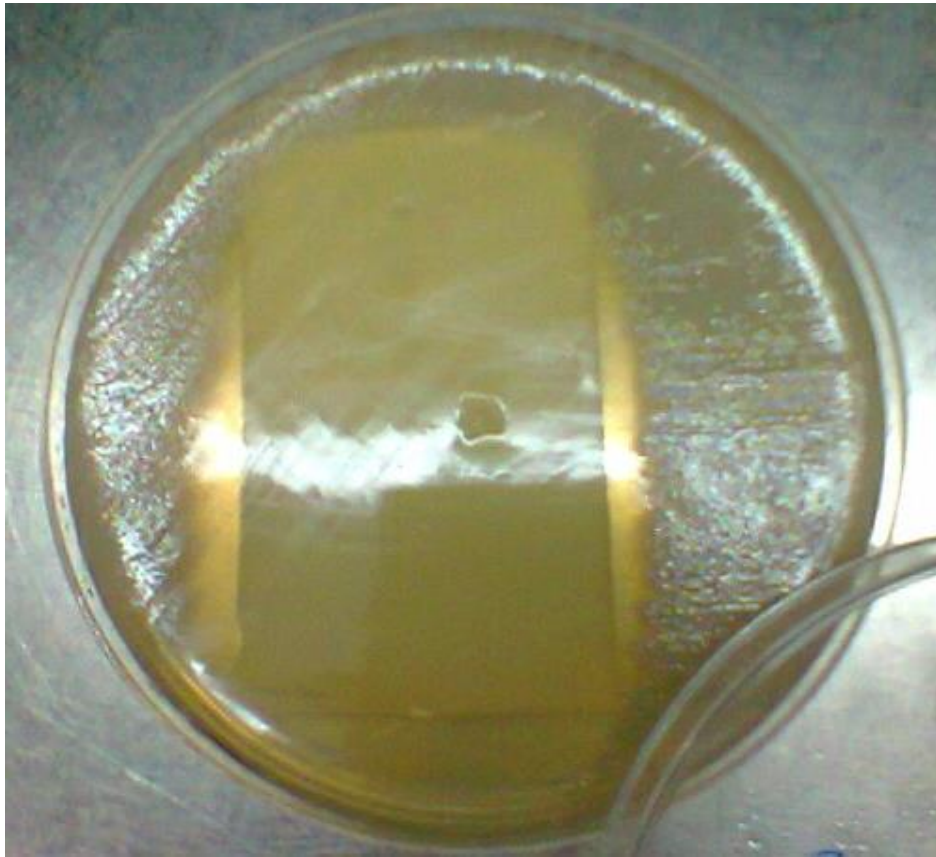


Figura 6. Autobiografia do extrato bruto do isolado 50 em cromatografia de camada delgada do sistema BAW (butanol, ácido acético e água) 4:1:5. Microrganismo teste: isolado clínico 53.

4.7.2. Coloração CCD

Os resultados obtidos nos testes de coloração na Cromatografia em Camada Delgada estão dispostos na tabela 13.

TABELA 13. Resultados dos testes de coloração de CCD.

Antimicrobiano	Ninhidrina	Cloreto Férrico (FeCl ₃)	Anisaldeído
Ciprofloxacino	+	-	+
Eritromicina	-	-	-
Penicilina G	+	-	+
Rifampicina	-	+	+
Estreptomicina	+	-	+
Tetraciclina	-	+	+
Vancomicina	+	-	-
Extrato bruto 50	-	-	+

(+) resultado positivo, (-) resultado negativo.

O uso de reagentes revelou que a molécula analisada não possui hidroxilas fenólicas devido ao resultado negativo na coloração com cloreto férrico; não possui grupamentos de amina livre devido à ausência de reação à ninhidrina. Devido ao resultado positivo no teste com o anisaldeído é provável que os compostos produzidos possuam uma estrutura característica de alcalóide. Nesta análise, observou-se que a coloração do extrato bruto ocorreu na mesma altura do antimicrobiano estreptomicina.

As figuras 7, 8 e 9 mostram as fotos dos testes de coloração com anisaldeído, cloreto férrico e ninhidrina, respectivamente.

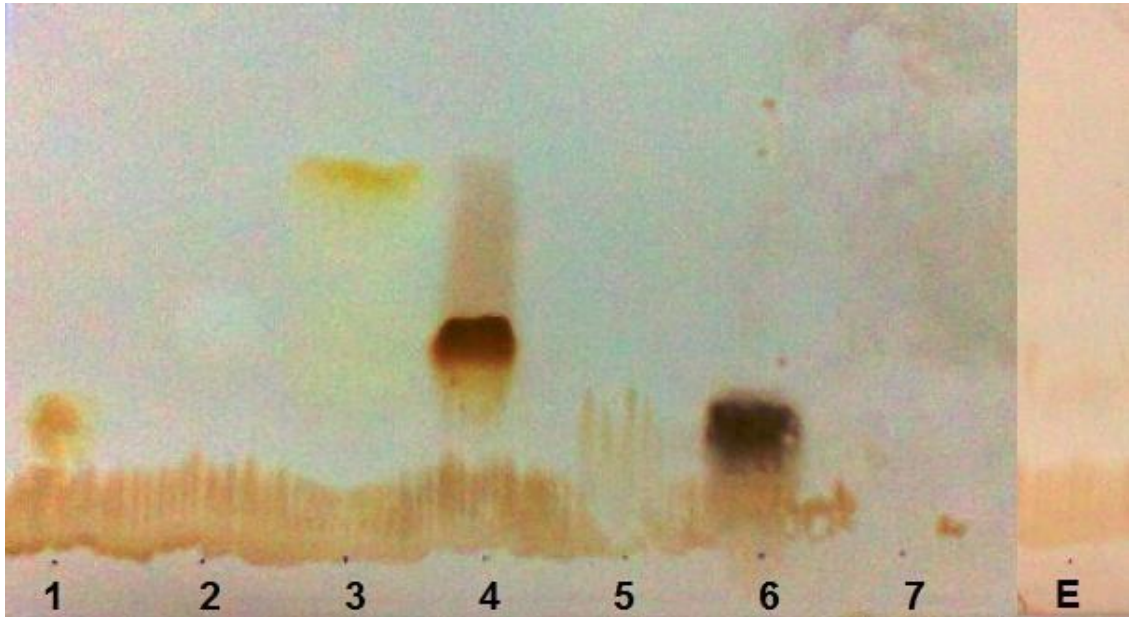


Figura 7. Cromatografia em camada delgada utilizando o reagente anisaldeído. Antimicrobianos utilizados: 1 - ciprofloxacino; 2 – eritromicina; 3 – penicilina G; 4 – rifampicina; 5 – estreptomicina; 6 – tetraciclina; 7 – cloridrato de vancomicina; E – extrato bruto. As setas indicam a coloração na mesma altura do antimicrobiano estreptomicina e do extrato bruto.

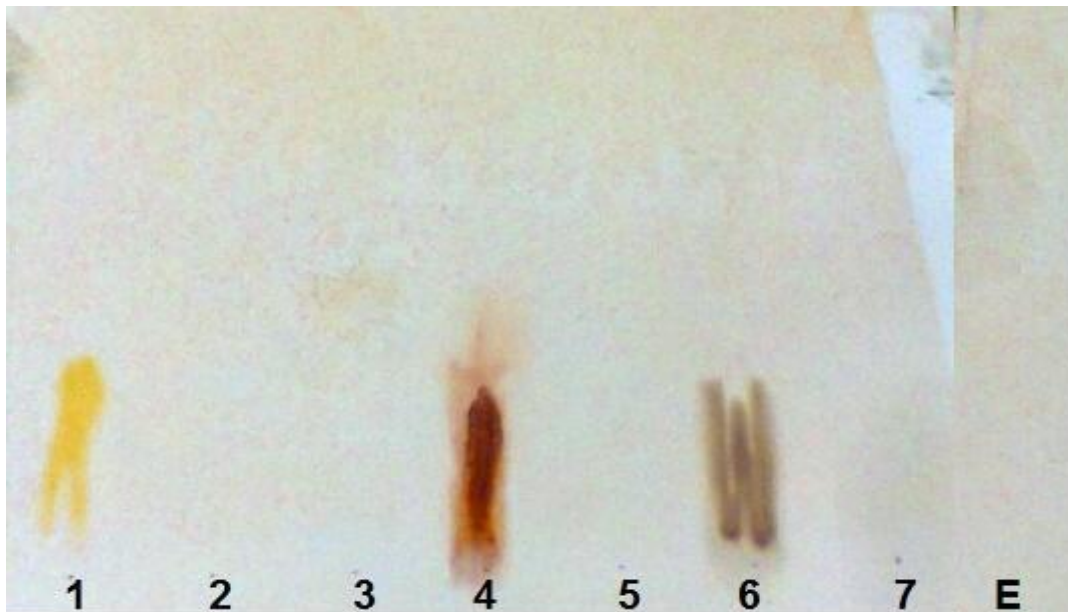


Figura 8. Cromatografia em camada delgada utilizando o reagente cloreto férrico. Antimicrobianos utilizados: 1 - ciprofloxacino; 2 – eritromicina; 3 – penicilina G; 4 – rifampicina; 5 – estreptomicina; 6 – tetraciclina; 7 – cloridrato de vancomicina; E – extrato bruto. As setas indicam resultados positivos da coloração.

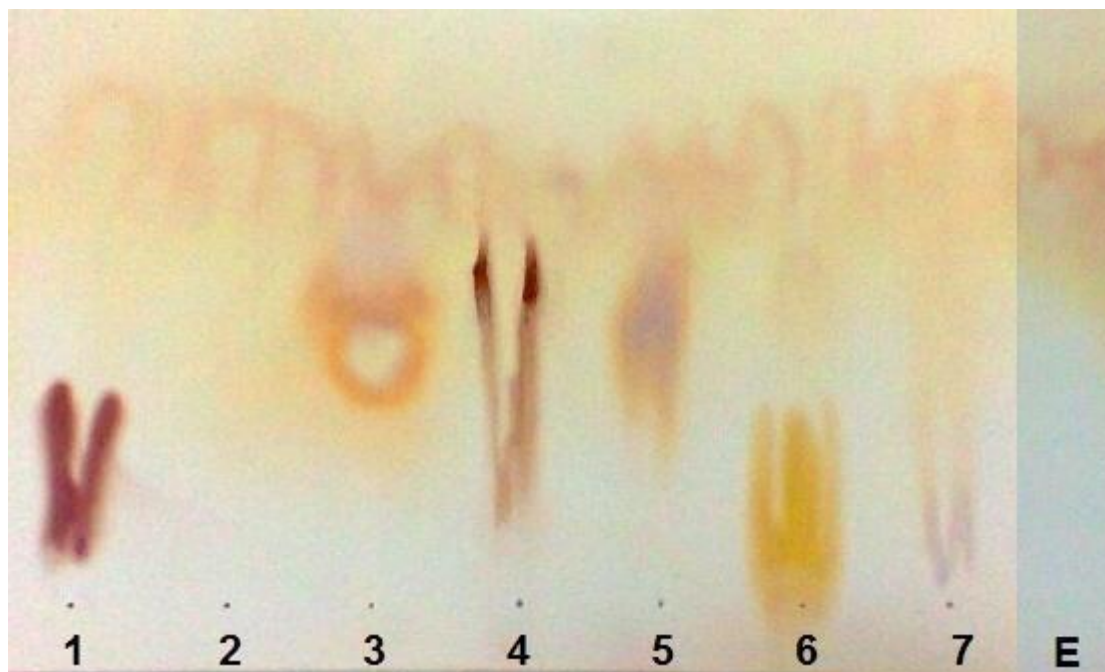


Figura 9. Cromatografia em camada delgada utilizando o reagente ninhidrina. Antimicrobianos utilizados: 1 - ciprofloxacino; 2 – eritromicina; 3 – penicilina G; 4 – rifampicina; 5 – estreptomicina; 6 – tetraciclina; 7 – cloridrato de vancomicina; E – extrato bruto. As setas indicam resultados positivos da coloração.

Os resultados obtidos através da CCD são apenas análises preliminares para a caracterização da(s) molécula(s) presente(s) no extrato bruto produzido pelo isolado 50. Esta análise geralmente é primária em estudos que procuram caracterizar moléculas bioativas (NANDA & ZARINA, 2011; HOZZEIN et al., 2011; HECK, M. G, 2007), sendo necessárias outras análises para tal fim. Neste trabalho o uso da CCD permitiu inferir algumas sugestões sobre a estrutura dos compostos bioativos.

A resistência de microrganismo patógenos a antimicrobianos é um problema mundial. Atualmente se busca, a partir de fontes naturais, novas moléculas bioativas com ação antibióticas. Os actinomicetos têm sido um grande aliado na descoberta de novos compostos bioativos devido a sua habilidade de produção de moléculas bioativas, especialmente antibióticos e outros agentes da indústria farmacêutica. Como observado neste estudo, alguns fatores físicos e químicos (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura, pH, etc) influenciam profundamente na habilidade de produção das moléculas bioativas. Por isso é importante avaliar quais as melhores condições de crescimento para a otimização do produto metabólito de interesse.

5. CONCLUSÕES

1. No ensaio de sobrecamada 57, 5% das amostras de actinomicetos formaram halo de inibição contra pelo menos 1 isolado clínico.
2. Os isolados 50 e 8S foram capazes de inibir 90% de os isolados clínicos no ensaio de sobrecamada.
3. No ensaio de difusão em poço o extrato bruto produzido pelo isolado 50 foi capaz de formar halos de inibição contra 91,66% dos isolados clínicos, enquanto que o isolado 8S inibiu 83,33%.
4. A melhor fonte de carbono para a produção de moléculas bioativas para o isolado 50 foi o amido.
5. O isolado 50 mostrou habilidade em crescer até a temperatura de 50°C, sendo 30° a melhor temperatura para a produção de molécula(s) bioativa(s) .
6. Em relação ao pH, não houve diferença significativa na produção de compostos com atividade antibiótica com pH do meio não tamponado. Nessas condições, o isolado 50 foi capaz de modular o pH para em torno de 6,5.
7. Quando ocorreu o tamponamento do pH, o melhor resultado obtido foi em pH 5.0 após 96 h. Não sendo observada atividade nos pH 9 e 10.

8. Na determinação da CIM do extrato bruto as amostras de *Staphylococcus* sp. foram mais suscetíveis a diluições maiores do que as amostras de *Enterococcus* sp.

9. O extrato bruto produzido pelo isolado 50 demonstrou estabilidade térmica até 100°C. No tratamento com proteases, o extrato bruto teve seu maior índice de redução frente a tripsina, mas sua atividade inibitória foi reduzida perante o tratamento com todas as proteinases.

10. A CCD revelou duas bandas com mostrou a presença de duas bandas com fator de retenção de 0,28 (Rf1) e 0,57 (Rf2). A coloração da CCD mostrou resultado positivo no teste com o anisaldeído.

6. PERSPECTIVAS

1. Capturar e purificar os compostos antibióticos produzidos pelo isolado 50 através de cromatografia de gel filtração e troca-iônica.
2. Identificar a molécula através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e espectrometria de massas.
3. Realizar teste de toxicidade dos compostos com atividade antibiótica.
4. Analisar os dados do sequenciamento do isolado 50.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMENA, S.; VISHALAKSHI, N.; PRABHAKAR, M.; DAYANAND, A.; LINGAPPA, K. Production, Purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 173-178, 2010.

ANTUNES, T.C; VAN DER SAND, S.T. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, 2010.

ARIAS, C.A; MURRAY, B.E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. **English Journal Medicine**, v. 360, p. 5, 2009.

AYLIFFE, G. A. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infection Disease**, v.24, p.74–79, 1997.

BADJI, B.; ZITOUNI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A; SABAOU, N. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 373–382, 2006.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1–26, 2005.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 512–519, 2002.

BURDOCK, T.; BROOKS, M.; GHALY, A.; DAVE, D. Effect of assay conditions on the measurement of dehydrogenase activity of *Streptomyces venezuelae* using triphenyl tetrazolium chloride. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 214-225, 2011.

CHAMBERS, H. F.; HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. **Journal Clinical Investigation**, v. 76, p. 325–331, 1985.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in *Staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Review**, v.10, p.781-91, 1997.

CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clinical Microbiology**, v.1, p.173-186, 1988.

CHATER, K.F, CHANDRA, G. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. **FEMS Microbiology Review**, v.30, p.651–672, 2006.

CHATTERJEE, S.; VIJAYAKUMAR, E.K.; FRANCO, C.M.; MAURYA, R., BLUMBACH, J.;, GANGULI, B.N.. Phencomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* species HIL Y-9031725. **The Journal of Antibiotics**, v.48, p. 1353–1354, 1995.

CLADERA-OLIVEIRA, F. Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antibacteriano produzido por *Bacillus licheniformis* P40. 2004. . Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2009.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface involved in biofilm formation. **Journal Bacteriology**, v.183, n. 9, p. 2888-2896, 2001.

CUNHA, M.N.C.; SILVA, N.M.V.; TEIXEIRA, M.F.S.; MOTA, R.A.; LIMA, J.L.; PORTO, T.S., PORTO, A.L.F.. Actinomicetos produtores de inibidores de β -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, v.62, n.6, p.1312-1319, 2010.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.74, n.3, p.417, 2010.

DAVIES, J.E.. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. **Ciba Foundation Symposium**, v. 207, p.15–27, 1997.

DEKLEVA, M.L.; STROHL, W.R. Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 1129-1132, 1987.

DEMAIN, A.L.; FANG, A. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. **Actinomycetology**, v. 9, p. 98-117, 1995.

DIEKEMA, D. J. et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infection Disease**, v.32, p. S114–S132, 2001.

DIXON, B. Sulfa's: True Significance. **Microbe**, v.1, p.500-501, 2006.

DTZ. Economic Impact of *Streptomyces* Genetics Research. **BBSRC**. April 2010.

DUARTE, W. M. Identificação de actinomicetos isolados de solo impactado com resíduos petroquímicos e seleção de potenciais degradadores de misturas de diesel e biodiesel. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, 2012.

EDWARDS, U.; ROGALL, T.; BLOCKER, H.; ERND, M.; BOTTGER, E. Isolations and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.19, p.7843, 1989.

ESPINOSA, C.J.; CORTES, J.A.; CASTILLO, J.S.; LEAL, A.L. Revision sistemática de la resistencia antimicrobiana em cocos Gram positivos intrahospitalarios em Colômbia. **Biomédica**, v.31, p.27-34, 2011.

EVANS, C.A; SMITH W.M; JOHNSTON, E.A. Bacterial flora of the normal human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 15, p. 305–24, 1950.

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

FAJARDO, A.; MARTINES, J.L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. **Current Opinion Microbiology**, v.11, p.161–167, 2008.

FALCI, D. R.; DALAROSA, M.G. *Enterococcus* Resistente à Vancomicina: um problema no Rio Grande do Sul. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. v. 2, n. 2, 2012.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **National Biotechnology**, v.24, p.1497-503, 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749–1757, 2009.

FLACH, J.; KARNOPP, C. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FLARDH, K; BUTTNERM, M.J. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **National Review of Microbiology**, v.7, p. 36-49, 2009.

FONTOURA, R.; SPADA, J.C.; SILVEIRA, T.S.; TSAI, S.M.; BRADELLI, A. Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 205-213, 2009.

FRANZ, C.M.A.P.;HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 47, p.1–24, 1999.

FRASER, L. et al. Enterococcal Infections (Infectious disease). eMedicine Clinical Reference. 2010.

GALES, A.C.; SADER, H.S; RIBEIRO, J. ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial susceptibility of Gram-Positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.13, n. 2, p.90-98, 2009.

GAO, H.; LIU, M.; LIU, J.; DAI, H.; ZHOU, X.; LIU, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, L. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.4012–4016, 2009.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; KRASTEL, P.; DETTNER, K.; RHEINHEIMER, J.; ZEECK, A.; FIEDLER, H. Endophenazines A-D, New phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **Journal Antibiotic**, v. 55, p.794–800, 2002.

GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration and Biodegration**, v. 51, n.4, p. 245-248, 2003.

GOODFELLOW, M. WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, v..37, p.189–216, 1983

GRAMAJO, H.C.; ERIKO, T; MERVYN, B. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. **Molecular Microbiology**, v. 7, n.6, p.837-845,1993.

GUIMARÃES, L.M., Influência do Preparo do Inóculo e do pH na Produção do Antibiótico Retamicina por *Streptomyces olindensis* So20. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

HASSAN, MA., EI-NAGGAR, MY. and SAID, WY. (2001). Physiological factor affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egyptian Journal of Biology*.3:1-10.

Health Protection Agency. *Enterococcus* spp.and glycopeptide-resistant *Enterococci* (GRE). 2005. Disponível em: www.hpa.org.uk. Acessado em 01/01/2013.

HECK, M. G. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. linhagem 2S. Porto Alegre, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2007.

HIDRON, A.I.; EDWARDA, J.R.; PATEL, J.; HORAN, T.C.; SIEVERT, D.M.; POLLOCK, D.A.; FRIDKIN, S.K.. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 29, p.996-101, 2008.

HOLT, J.G.; WILLIAMS, S.T; SHARPE, M.E. Bergey's Manual Systematic bacteriology. Baltimore. Williams & Wilkins, v.4, p.2300-2648, 1989.

HOPWOOD, D. A. Streptomycin nature and medicine. **Oxford University Press**, New York, NY, 2007.

HÖRNER et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia, Medicina Lab**, v.41, p.391-395, 2005.

Hospital Infections Program, National Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention, Public Health Service, US Department of Health and Human Services. National Nosocomial Surveillance System Report. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1998.

HOZZEIN, W. N.; RABIE, W.; ALI, I.A.M. Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.12, p. 2295-2301, 2011.

INOUE, O. O. Influencia de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20. Tese apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Escola politécnica da Universidade de São Paulo, 2006.

IQBAL, M; MERCER, D.K.; MILLER, P. G. G.; McCARTHY, A.J. Thermostable extracellular peroxidases from *Streptomyces thermoviolaceus*. **Microbiology**, v. 140, p. 1457-1 465, 1994.

IWASE, T.; UEHARA, Y.; SHINJI, H.; TAJIMA, A.; SO, H. TAKADA, K.; AGATA, T.; MIZUNOE, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. **Nature**, v. 465, p. 346-349. 2010.

JAIN, R.; UDDIN, K.Z.; PARVEEN, N.; SAXENA, A. Optimization of Cultural Conditions for the Production of Antibiotic by *Streptomyces* sp. VRY-1. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 10, p. 81-87, 2011.

JAMES, P. D. A.; EDWARDS, C. The effects of cultural conditions on growth and secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p.1-6, 1988.

KEITH, F.; CHATER, S.B.; LEE, K. J.; PALMER, T.; SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology**, v.34, p. 171–198, 2010.

KRESGE, N.; SIMONI, R.D.; HILL, R.L. Waksman, S: The Father of Antibiotics. The Chemical Nature of Actinomycin, an Anti-microbial Substance Produced by *Actinomyces antibioticus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.48, p.101-102, 2004.

KROPPESTEDT, R.; STACKEBRANDT, E.M.; GOODFELLOW, M. Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. **Systematic Applied Microbiology**, v.13, p.148–160, 1990.

LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 44-51, 1988.

MARPLES, M.J. The normal flora of the human skin. **Brazilian Journal Dermatology**, v.81, p.2–13, 1969.

MARTINEZ, J.L; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents**, v.44, p.1771–1777, 2000.

MIGUELEZ, E.M; HARDISSON, C.; MANZANAL, M.B. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. **Journal Cell Biology**, v. 145, p. 515-525, 1999.

MIYADOH, S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. **Actinomycetologica**, v.7, p.100–106, 1993.

MOET, G.J et al. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.57, n.1, p.7-13, 2007.

MUKHTAR, H.; IJAZ, S.; IKRAM-UL-HAQ. Production of antitumor antibiotic by *Streptomyces capoamus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 44, n. 1, p. 445-452, 2012.

MUNITA, J.M.; ARIAS, J.M.M; MURRAY, B.E. *Enterococcal* Endocarditis: Can We Win the War? **Current Infectious Disease Reports**, v.14, n.4, p. 339-349, 2012.

NANDA, A.; ZARINA, A. Studies on antagonistic effect of *Streptomyces* species collected from polluted and non-polluted environment. **Green Technology and Environmental Conservation (GTEC)**, p. 254-258, 2011.

NARAYANA, K.J.P; KUMAR, K.G.; VIJAYALAKSHMI. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p.331-336, 2008.

NARAYANA, K.J.P and M. VIJAYALAKSHMI.(2008). Optimization of antimicrobial metabolites production by *Streptomyces albidoflavus*. *Res. J. Pharmacol.* 2:4-7.

OLIVEIRA, M.F. Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 2002.

OSKAY, M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.13, p. 3007-3017, 2009.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. **Natural Review Microbiology**, v.7, p.555-567, 2009.

OTTO, M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. **Frontiers in Bioscience**, v.9, p.841–63, 2004.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S. Introduction to Spectroscopy: a Guide for Students of Organic Chemistry. 3. ed. South Melbourn: Brooks/Cole, 2001. 573 p.

RINTALA, H. et al. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of *Streptomyces*. **Molecular and Cellular Probes**, v.15, p. 337-347, 2001.

RIVAS, C.M. Antibióticos, ayer, hoy e mañana...?. **Química Viça**, v.5, n.2, p.63-77, 2006.

ROGERS, K.L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infection Disease Clinical North America**, v. 23, p. 73–98, 2009.

ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 38, p. 1-3, 1981.

SALAMONI, S.P.; MANN, M.B, CAMPOS, F.F.; 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 Microbiology Biotechnology**, v. 26, n.10, p.1847-1856, 2010.

SANCHEZ, J.S. Resistência a antibióticos. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 48, n.2, p.105-112, 2006.

SAVA, I.G; HEIKENS, E.; HUEBNER, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. **Clinical Microbiology Infection**, v. 16, p. 33–540, 2010.

SCHREMPF, H.. Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 79, p..285–289, 2001.

SHINER, R.L.; HERMANN, C.K.F.; MORRIL, T.C.; CURTIN, D.Y.; FUSON,R.C. The Systematic Identification of Organic Compounds.6. ed. New York:John Wiley e Sons, 1992.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEG, D. Characterization of *Streptomyces* species. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v.7, n.7, p.313-340, 1966.

SILVA I.R.; MARTINS, M.K.; CARVALHO, C.M.; AZEVEDO, J.L.; LIMA, P.R.E. The Effect of Varying Culture Conditions on the Production of Antibiotics by *Streptomyces* spp., Isolated from the Amazonian Soil. **Fermentation Technology**, v. 1, n.3, p.105, 2012.

SONG, Q.; YANG, Y.H.; YANG, H. Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by *Actinomycetes* YJ1 Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n.7, 2012.

STACH, J. E.; BULL, A. T. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 87, p. 3–9, 2005.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Internacional Journal Food Microbiology**, v. 36, p.1–29, 1997.

SUROWITZ, K.G.; PFISTER, R.M. Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 702-706, 1985.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.3, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p.1216, 2001.

THUMAR, J.T.; DHULIA, K.; SINGH, S.P. Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 2081-2087, 2010.

TROLL, W.; CANNAN, R. K. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and iminoacids: **Journal Biology Chemical**, v. 200, p. 803-811, 1953.

UDDIN, M.M.; MAHMUD, M. N.; ANWAR, M.N; MANCHURW, M.A. Influence of culturing conditions for optimum antimicrobial metabolite production by *Streptomyces fulvoviridis*. **The Chittagong University Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 63-75 , 2010.

VINING, L.C. Secondary metabolism. **Biotechnology**. Weinhein, v.4, p.21-29, 1986.

VOSS, A.; MILATOVIC, D., WALLRAUCH, S.C.; ROSDAHL, V.T.; BRAVENY, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 13, p. 50-55, 1994.

VOUNG, C.; GERKE, C.; SOMERVILLE, G.E.; FISCHER, E.R.; OTTO, M. Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.706–718, 2003.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, ASM Press: Washington, p.345, 2003.

WAKSMAN S.A. (1961).The actinomycetes. Classification, identification and description of genera and species. Baltimore: The Williams and Wilkins Co. 2:61-292.

WILLIAMS, S.T.; CROSS, T. Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. **Methods Microbiology**, v. 4, p.295—333, 1971.

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

WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins Company. Baltimore. v.4, 1989.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infection Disease**, v.39, p.309-317, 2004.

8. APÊNDICE

a) Meio de cultura para crescimento de actinomiceto:

Ágar Amido Caseína (AC)

Amido: 10 g

Caseína: 0,12g

NaCl: 2,0 g

KNO₃: 2,0g

K₂HPO₄: 2,0g

MgSO₄: 0,05g

FeSO₄: 0,01g

CaCO₃: 0,02 g

b) Lisozima (10 mg/mL)

Lisozima 0.01 g

Água 1.0 mL

c) Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K: 0.02 g

Água: 1.0 mL

d) SOLUÇÕES TAMPÃO

pH 5,0

Solução tampão de *Mcllvaine* (fosfato dissódico – ácido cítrico)

Na₂HPO₄ – 0,2 M (mL): 10,30.

Ácido cítrico – 0,1 M (mL): 9,70.

pH 6,0

Solução tampão de *Mcllvaine* (fosfato dissódico – ácido cítrico)

Na₂HPO₄ – 0,2 M (mL): 12,63.

Ácido cítrico – 0,1 M (mL): 7,37.

pH 7,0

Solução tampão de *Mcllvaine* (fosfato dissódico – ácido cítrico)

Na₂HPO₄ – 0,2 M (mL): 16,47.

Ácido cítrico – 0,1 M (mL): 3,53.

pH 8,0

Solução tampão de ácido bórico – cloreto de potássio.

H₃BO₃ KCl – 0,1 M (mL): 50,00.

NaOH – 0,1 M (mL): 4,00.

Água (ml): 46,00.

pH 9,0

Solução tampão de ácido bórico – cloreto de potássio.

H₃BO₃ KCl – 0,1 M (mL): 50,00.

NaOH – 0,1 M (mL): 21,24.

Água (mL): 28,76.

pH 10,0

Solução tampão de ácido bórico – cloreto de potássio.

H₃BO₃ KCl – 0,1 M (mL): 50,00.

NaOH – 0,1 M (mL): 43,90.

Água (mL): 6,10.