

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PROVENIENTES DO
METABOLISMO DE *STREPTOMYCES* sp. LINHAGEM 2S**

MARCELA GEORGIA HECK
FARMACÊUTICA - UFRGS

Porto Alegre/RS, Brasil

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PROVENIENTES DO
METABOLISMO DE *STREPTOMYCES* sp. LINHAGEM 2S**

MARCELA GEORGIA HECK
FARMACÊUTICA - UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre/RS, Brasil

Outubro de 2007

AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas a quem eu agradeço para a realização deste trabalho.

Primeiramente devo agradecer à Capes pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço também à Margaroni Fialho de Oliveira e à Professora Sueli Van Der Sand por cederem os isolados utilizados neste trabalho.

Eu agradeço à minha mãe, minha grande incentivadora. Foi ela quem me incentivou a ingressar no mestrado e foi quem sempre esteve ao meu lado, nos bons e nos maus momentos. Obrigada Mãe!

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório pela ajuda prática e também pelo apoio, pelo companheirismo e pelo bom humor, mesmo quando nada parecia funcionar ou quando havia muita vidraria para lavar. Obrigada pessoal!

Agradeço à Maira e a Vanessa, minhas amigas, mais do que colegas, com quem troquei muitas idéias, e especialmente à Maira que tanto nos ensinou sobre microbiologia.

Agradeço ao meu orientador, o Professor Germani, que sempre me incentivou, confiou no meu trabalho e que, mais que professor, foi um pai para mim durante esses anos.

Finalmente, não tenho palavras para agradecer ao Professor Alexandre, que chegou abrindo portas e disposto a ajudar a todos.

Muito obrigada a todos vocês!

Produção de Compostos Antimicrobianos Provenientes do Metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2s¹

Autor: Marcela Georgia Heck
Orientador: Dr. José Carlos Germani

RESUMO

O crescente número de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos leva os cientistas a buscar novos compostos bioativos. Os actinomicetos apresentam um grande potencial de produção de metabólitos secundários, principalmente antibióticos. Assim, este trabalho teve como objetivo selecionar actinomicetos produtores de antibióticos e otimizar a produção dos mesmos. Realizou-se uma triagem para detectar a atividade antimicrobiana de 24 isolados de actinomicetos. Esta triagem foi realizada contra 8 microrganismos alvo de interesse clínico e 10 isolados apresentaram alguma atividade antimicrobiana. Destes foram escolhidos 4 isolados que apresentaram as maiores zonas de inibição e com eles foram feitos novos ensaios de antibiose, inclusive contra *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) ATCC 33591. A cepa 2s apresentou os melhores resultados, sendo selecionada para a produção de compostos antimicrobianos. O isolado foi cultivado em meio líquido e de forma estática, sob diferentes condições nutricionais e de temperatura. Foram realizadas coletas em 1, 3, 6, 9, 12 e 15 dias para avaliar a atividade antimicrobiana da cepa frente à MRSA, e também verificar mudança no pH do meio, bem como quantificar o crescimento das bactérias através da massa seca. Os meios de cultivo onde houve maior produção de compostos antimicrobianos continham peptona como fonte principal de nitrogênio e extrato de levedura como fonte primária de carbono, sendo que um deles continha ainda extrato de carne. A melhor temperatura de produção foi 37°C e o pico de produção ocorreu no terceiro dia. O composto antimicrobiano foi separado por cromatografia em camada delgada e foram feitos testes de coloração em cromatografia em camada delgada e análises espectroscópicas visando a elucidar sua possível estrutura química. Essas análises indicaram a presença de hidroxilas livres e um ciclo contendo nitrogênio, indicando estrutura semelhante a da bleomicina.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil. (112 p.) Outubro, 2007.

Production of Antimicrobial Compounds Produced By The Metabolism of *Streptomyces* sp. Strain 2s¹

Author: Marcela Georgia Heck
Adviser: Dr. José Carlos Germani

ABSTRACT

The increasing number of infections caused by resistant bacteria lead the scientists to search new bioactive compounds. Actinomycetes present a great potential to produce secondary metabolites, mostly antibiotics. Thus, the present work had the objective to select actinomycetes producers of antibiotics and to optimize their production. A previous screening was performed with 24 isolated strains of actinomycetes to detect their antimicrobial activity. This screening utilized 8 target microorganisms with clinical interest and 10 isolates showed some antimicrobial activity. Afterwards, the 4 isolates that produced larger inhibition zones were chosen. Further antibiases assays were proceed with these isolates, including with Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33951. The strain 2s showed the best results and was selected to produce the antibiotics compounds. The strain was cultivated in liquid medium without agitation, under distinct nutritional and temperature conditions. Samples were taken in 1, 3, 6, 9, 12, 15 days to evaluate the antimicrobial activity against MRSA and also to verify changes in pH and to assess growing of the bacteria by quantifying its dry weight . The media that produced more antimicrobial compounds contained peptone as the main nitrogen source and yeast extract as primary carbon source, one of the media contained also meat extract. The best temperature production was 37°C and maximum production was observed in day 3. The antimicrobial compound was separated by thin-layer chromatography and were performed color tests in thin-layer chromatography and spectroscopy analysis to elucidate its chemical structure. The results of these analysis indicated the presence of hydroxyl groups and rings with nitrogen in its structure, possibly resembling bleomycin.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil. (112 p.) October, 2007.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Os actinomicetos	4
2.1.1 Características gerais dos actinomicetos	4
2.1.2 Identificação dos actinomicetos	6
2.1.3 Os actinomicetos e os antibióticos	9
2.2 Metabólitos secundários	10
2.3 Antibióticos	12
2.3.1 Histórico	12
2.3.2 Atualmente	14
2.4 O fenômeno de resistência	17
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina	20
2.5 Desenvolvimento de novos antimicrobianos	25
3. MÉTODOS	29

3.1 Triagem	30
3.1.1 Triagem em placa	30
3.1.2 Triagem em caldo	32
3.2 Análise da influência das condições de cultivo na produção de antibiótico	33
3.2.1 Comparação de cultivo estático e cultivo agitado	33
3.2.2 Comparação entre diferentes meios de cultivo	34
3.3 Análise Estatística	36
3.4 Morfologia	37
3.5 Avaliação do espectro de ação	38
3.6 Separação do composto por cromatografia em camada delgada	39
3.7 Autobiografia	41
3.8 Purificação parcial do composto	41
3.9 Identificação parcial do composto	42
3.9.1 Coloração de CCD	42
3.9.2 Determinação do pH	46
3.9.3. Métodos espectroscópicos	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Triagem	50
4.1.1 Triagem em placa	50
4.1.2 Triagem em caldo	52
4.2 Análise da influência das condições de cultivo na produção de antibiótico	53
4.2.1 Comparação de cultivo estático e cultivo agitado	53
4.2.2 Comparação entre diferentes meios de cultivo	54

4.3. Morfologia.....	62
4.4 Avaliação do espectro de ação.....	63
4.5 Separação do composto.....	67
4.6 Autobiografia.....	69
4.7 Purificação parcial do composto.....	69
4.8 Identificação parcial do composto.....	70
4.8.1 Coloração de CCD.....	70
4.8.2. Determinação do pH.....	75
4.8.3 Espectroscopia.....	75
5. CONCLUSÕES.....	85
6. PERSPECTIVAS.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS.....	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Antibiose em placa pelo método de traço cruzado	30
FIGURA 2. Gráfico da variação da massa seca do actinomiceto 2s ao longo do tempo	60
FIGURA 3. Morfologia do isolado 2s. Cultivo em Agar Amido Caseína	62
FIGURA 4. Inibição frente <i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953.....	65
FIGURA 5. Inibição frente <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.....	66
FIGURA 6. Inibição frente <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	67
FIGURA 7. Cromatografia em Camada Delgada do filtrado do cultivo do isolado de actinomiceto 2s contendo o composto antibiótico produzido	68
FIGURA 8. Autobiografia da CCD aplicada no sistema clorofórmio/etanol/água 8:5:1.....	69
FIGURA 9. Resultado da coloração com Ninhidrina	72
FIGURA 10. Resultado da coloração com o reativo de Dragendorff.....	73
FIGURA 11. Resultado da coloração com Anisaldeído.....	74
FIGURA 12. Espectro de IV do composto antimicrobiano produzido pelo actinomiceto 2s e separado por CCD	76
FIGURA 13. Anel de massa 99, com heteroátomo e pico de absorção em IV em 1690 nm	77
FIGURA 14. Espectro de UV do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s e separado por CCD	78
FIGURA 15. Estrutura química do composto antitumoral Bleomicina	80
FIGURA 16. Espectro de massas do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s.....	81
FIGURA 17. Espectro de massas do fragmento 399	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultado da antibiose na triagem inicial dos isolados actinomicetos com atividade contra as bactérias alvo	51
TABELA 2. Halos médios de inibição do isolado 2s frente à MRSA	56
TABELA 3. pH médio dos meios de cultivo com o actinomiceto 2s ao longo do tempo	59
TABELA 4. Massa seca do actinomiceto 2s ao longo do tempo.....	61
TABELA 5. Média dos halos de inibição, em mm, contra as bactérias alvo.....	64
TABELA 6. Resultado dos testes de coloração em CCD.....	70
TABELA 7. Ciclos heteroaromáticos e suas respectivas absorções no espectro de UV.....	79

1. INTRODUÇÃO

Há no mercado uma vasta gama de medicamentos antimicrobianos disponíveis. Eles apresentam diferentes mecanismos de ação e, por isso são eficazes contra um ou outro tipo de microrganismo. Os antimicrobianos também diferem quanto a sua origem e obtenção, logo, os custos também variam bastante.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) promove o “uso racional de medicamentos”, cuja definição é: “pacientes devem receber medicamentos apropriados as suas necessidades clínicas, em doses que vêm ao encontro de suas necessidades individuais, por um período adequado de tempo e com o menor custo para ele e para a sua comunidade”.

A atenção dispensada ao uso racional de medicamentos é dada porque, segundo a OMS (09/2002), mais de 50% de todos os medicamentos são prescritos, dispensados ou vendidos inapropriadamente. No caso dos antimicrobianos o uso inadequado pode levar a outro grave problema: o desenvolvimento de microrganismos resistentes, ou seja, o microrganismo

desenvolve a habilidade de sobreviver em presença de um antimicrobiano ao qual ele era susceptível anteriormente. O uso inadequado dos antimicrobianos ocorre porque a escolha do tratamento de uma infecção é feita empiricamente, uma vez que, normalmente, essa escolha acontece sem o conhecimento do patógeno e é baseada na sintomatologia do paciente e na incidência desses patógenos no hospital ou na região onde se encontra o paciente.

A emergência de cepas resistentes começou a ser observada já na década de 40, quando alguns microrganismos como estreptococos hemolíticos, gonococos e pneumococos resistiram ao tratamento com sulfas, antimicrobianos sintéticos que foram os primeiros a serem utilizados na clínica médica.

Este fenômeno levou a comunidade científica a buscar novos organismos produtores de antibióticos, principalmente os de solo como fungos e actinomicetos. Foi, então, que se descobriu o imenso potencial de produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana por parte dos actinomicetos.

Os actinomicetos são bactérias filamentosas, que foram e ainda são confundidas com fungos, principalmente pelas suas características macroscópicas. A família Actinomycetaceae é a responsável pela produção da maioria dos antibióticos conhecidos, especialmente o gênero *Streptomyces*, o qual produz cerca de 75% dos antimicrobianos utilizados na clínica médica. Portanto, actinomicetos são microrganismos que apresentam um grande potencial para a produção de compostos antimicrobianos e são uma fonte de muito sucesso na busca de novos antibióticos.

Tendo isso em vista, e a preocupação quanto à rapidez do desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos do mercado, este trabalho tem como objetivos principais realizar a triagem de actinomicetos isolados de compostagem de lixo urbano para avaliar sua atividade antimicrobiana, selecionar um isolado bom produtor de compostos antimicrobianos, testar diferentes formas de cultivo para melhor produção de antimicrobianos e elucidar parcialmente a estrutura do composto produzido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os actinomicetos

2.1.1 Características gerais dos actinomicetos

Actinomicetos são bactérias Gram positivas cuja morfologia é variada de acordo com o gênero. Podem ser esféricas ou bacilares e formam filamentos, hifas, que compõem um micélio de coloração variada. Eles consistem em células procarióticas longas com vários nucleóides (EMBLEY, 1994). O micélio é uma vantagem para o microrganismo, pois ele tem a capacidade de aderir ou penetrar em tecidos e ajudam a secretar enzimas e outros metabólitos. Com a aproximação do micélio aos substratos, o indivíduo precisa secretar apenas uma quantidade pequena de enzima para atingir níveis efetivos (CHATER, 2006).

Algumas espécies de actinomicetos podem se reproduzir por fragmentação das hifas, como o gênero *Nocardia*, por exemplo; em outros actinomicetos a reprodução é feita através de esporos assexuais do tipo conidiósporos ou esporangiósporos. Os esporos podem ser móveis (o que é

raro) ou não e, normalmente, são formados quando há escassez de nutrientes. Eles não são muito resistentes ao calor, porém resistem bem à dessecação, tendo assim um grande valor na preservação da espécie (EMBLEY, 1994).

A classe dos actinomicetos possui alto conteúdo de guanina e citosina (G+C) em seu DNA; são geralmente aeróbicos ou microaerófilos, mas também se encontram espécies anaeróbicas (CROSS, 1989; EMBLEY e STACKEBRANDT, 1994 e GOODFELLOW, 1989).

Os actinomicetos são encontrados sobretudo no solo. Estima-se que em cada grama de solo contém 10^6 – 10^9 células destas bactérias. No entanto, eles podem estar presentes nos mais diversos ambientes, como águas, plantas e, até mesmo, em associação com líquens (GONZÁLEZ *et al.*, 2005).

Essas bactérias são muito versáteis metabolicamente, o que possibilita a utilização de muitas fontes diferentes de carbono; podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos. Algumas poucas espécies são patogênicas ao homem, animais ou plantas. A grande importância dos actinomicetos no ambiente é o seu papel na degradação de matéria orgânica; possuem atividade proteolítica, função na decomposição de queratinas, quitinas, celuloses, amido e, também, no ciclo de aminoácidos e nitrogênio (CHATER, 2006; KENNEDY, 1999).

Na pesquisa, a característica mais marcante do grupo é a capacidade de produzir metabólitos secundários, úteis na indústria farmacêutica e outras, despertando o interesse de biotecnologistas, geneticistas e ecologistas. Os actinomicetos sintetizam vários tipos de enzimas, também produzem vitaminas, e antibióticos (CHATER, 2006; KENNEDY, 1999;

PELÁEZ, 2006). Seguramente, a produção de antibióticos é a característica mais estudada e mais importante dos actinomicetos, especialmente no gênero *Streptomyces*, o qual produz a maioria dos antibióticos utilizados em humanos, na veterinária e na agricultura, sendo que na clínica médica eles representam cerca de 75% (CHATER, 2006; FGUIRA *et al.*, 2005). Outro fator muito interessante é que este único gênero produz inúmeros compostos não relacionados. Dentre os antibióticos, pode-se citar os aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamicinas, cefalosporinas, poliênicos, e outros.

2.1.2 Identificação dos actinomicetos

Na identificação dos actinomicetos é importante levar em consideração diferentes características desses organismos, o que implica na utilização de várias técnicas diferentes para esse fim.

Em relação à morfologia deve-se observar a cor do micélio e o tipo de esporo, quando presente. Para tanto é importante utilizar um meio de cultura que possibilite uma boa esporulação e a diferenciação do micélio. (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966; LECHEVALIER, 1989).

Outros fatores que podem diferenciar alguns actinomicetos são a composição da parede celular e o perfil de ácidos graxos (STACKEBRANDT *et al.* 1997). A composição da parede celular varia consideravelmente entre os diversos grupos de actinomicetos. Pode-se diferenciar alguns grupos de paredes celulares baseando-se em dois aspectos principais: o aminoácido diabásico presente na parede, e a presença de açúcares característicos. Todos

os tipos de parede celular contém alanina, ácido glutâmico, glucosamina e ácido murâmico, mas apresentam algumas diferenças. As paredes do Tipo I possuem o isômero L do ácido diaminopimérico (DAP) e glicina; o Tipo II possui o isômero *meso* do ácido diaminopimérico e glicina; Tipo III possui *meso*-DAP; Tipo IV *meso*-DAP, arabinose e galactose; Tipo V possui lisina e ornitina; Tipo VI apresenta presença variável de ácido aspártico e galactose; Tipo VII possui ácido diaminobutírico e glicina, com lisina variável; e o Tipo VIII apresenta ornitina. Os actinomicetos que possuem *meso*-DAP na sua parede apresentam os seguintes padrões de açúcares: A, arabinose e galactose; B, madurose; C, sem açúcar característico; D arabinose e xilose (LECHEVALIER, 1989). O grupo dos Streptomicetos, é um tanto diferenciado porque apresenta uma parede celular caracterizada como Tipo I, com presença de ácido L-diaminopimérico e glicina, mas ausência de açúcares característicos, assim como o gênero Nocardioides, enquanto os demais gêneros possuem o isômero *meso*-DAP (ANDERSON e WELLINGTON, 2001). O perfil de ácidos graxos baseia-se na capacidade das bactérias em sintetizar diferentes ácidos graxos. Para analisá-los é necessário extraí-los e então fazer a análise dos metil ésteres ácidos graxos resultantes dessa extração, a análise é feita por cromatografia (CHUN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2002). Os actinomicetos com parede celular do Tipo IV apresentam ácidos graxos α ramificados β hidroxilados, chamados ácidos micólicos, especialmente importantes na identificação do gênero *Nocardia* (LECHEVALIER *et al.* 1971).

Também se pode fazer uma caracterização bioquímica, nutricional e fisiológica, realizando-se de provas como as de utilização de diferentes fontes

de carbono e nitrogênio, resistência a antibióticos, testes de degradação como degradação de adenina, tirosina, xantina, queratina, caseína; testes de crescimento, que envolvem tolerância a temperatura, pH e inibidores químicos; e testes bioquímicos, como catalase e proteólise (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966; WILLIANS *et al.*, 1983).

Tanto as provas bioquímicas, como a determinação da composição da parede celular e o perfil de ácidos graxos são métodos laboriosos e que demandam tempo para a obtenção dos resultados. Além disso, a caracterização bioquímica apresenta certa variabilidade em seus resultados. Portanto, devido à dificuldade de cultivo de algumas espécies e ao advento da biologia molecular, com acesso cada vez mais fácil e com a rapidez na obtenção dos resultados, os métodos moleculares têm sido de maior preferência na identificação dos actinomicetos.

Dentre esses métodos, o mais utilizado é o seqüenciamento da subunidade 16S rRNA. Através de uma reação em cadeia de polimerase (PCR – *polimerase chain reaction*) amplificam-se regiões que codificam para o 16S rRNA (16S rDNA) utilizando primers homólogos a regiões conservadas do gene. Essas regiões são seqüenciadas e comparadas com seqüências previamente catalogados (HEUER *et al.*, 1997, EMBLEY e STACKEBRANDT, 1994).

Um estudo com actinomicetos isolados de líquens feito por González e colaboradores (2005), utilizou métodos variados para identificar o isolado. Eles fizeram observação direta do micélio vegetativo e do micélio aéreo, caracterizaram os ácidos graxos presentes, extraíram o DNA, e ainda

utilizaram outras técnicas de identificação por RNA. Através da análise da composição de ácidos graxos, eles puderam confirmar a maioria dos gêneros identificados pela morfologia, no entanto, a análise molecular foi capaz de obter informações mais aprofundadas quanto à diversidade em nível de linhagem.

Outros autores procuram identificar o gênero dos isolados através da observação direta do micélio em conjunto com a técnica de 16S rRNA PCR. FGUIRA *et al.* (2005) utilizaram essas observações e chegaram à conclusão de que sua cepa de trabalho pertencia ao gênero *Streptomyces*.

2.1.3 Os actinomicetos e os antibióticos

Selman Waksman foi ele quem descobriu o potencial dos actinomicetos de produzir compostos antibióticos, o que o levou a receber um Prêmio Nobel (CHATER, 2006). O primeiro uso médico e comercial de um antibiótico produzido por um *Streptomyces* foi no tratamento da tuberculose. Depois disso muitos outros foram descobertos.

Um único gênero de actinomicetos, *Streptomyces* é capaz de sintetizar vários compostos não relacionados estruturalmente, entretanto, outros gêneros também são capazes de produzir compostos relacionados. Os gêneros *Micromonospora*, *Nocardia* e *Saccharopolyspora*, por exemplo, também produzem aminoglicosídeos; *Aeromicrobium*, *Micromonospora*, e *Saccharopolyspora* produzem também antibióticos da classe dos macrolídeos; e ansamicinas são produzidas por cepas de *Amycolatopsis* (EMBLEY e STACKEBRANDT, 1994).

Contudo, é difícil determinar como aconteceu a evolução desses organismos, se eles possuem um ancestral comum ou se este tipo de evento aconteceu devido à transferência lateral de genes de múltiplos organismos (WOO *et al.*, 2006). O que não se pode negar, no entanto, é o imenso potencial dos actinomicetos como produtores de metabólitos secundários de grande interesse industrial, sobretudo na obtenção de compostos antimicrobianos.

2.2 Metabólitos secundários

Todos os organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até idênticas, para a geração de energia. Essas reações fazem parte do metabolismo primário. A grande diversidade entre os organismos é decorrente da maneira como cada um organiza algumas poucas unidades monoméricas em grandes macromoléculas. No entanto, existem outras rotas metabólicas que possibilitam os organismos produzirem os mais diversos tipos de compostos, alguns inclusive restritos a certos gêneros ou espécies. Essas rotas constituem o metabolismo secundário, ou seja, seus produtos não são essenciais para a vida do organismo, e normalmente, são produzidos na fase estacionária do indivíduo. Porém, também podem ser sintetizados durante o crescimento (VINING, 1986).

A produção de metabólitos secundários está distribuída dentre os mais variados reinos. As plantas produzem inúmeros metabólitos secundários com variadas funções, como proteção a predadores e pigmentos importantes para reprodução. Insetos produzem metabólitos para comunicação ou proteção; e ainda dentre os eucariotos, os fungos são grandes produtores de

metabólitos secundários como diversos tipos de enzimas e até mesmo antibióticos. Dentre as bactérias, o destaque fica para os actinomicetos, que assim como os fungos, sintetizam enzimas e a maioria dos antibióticos conhecidos (VINING, 1986).

Compostos originados do metabolismo secundário possuem estrutura muito diversificada, sendo algumas vezes difícil de classificá-los. Mesmo assim, procura-se fazer essa classificação baseada em seu precursor, que sempre é fornecido pelo metabolismo primário. Então podemos classificar os metabólitos secundários em:

- Sacarídeos, cujo principal precursor é a glicose. Dentre os sacarídeos encontramos a Estreptomicina, produzida pelo *Streptomyces griseus*;
- Peptídeos, como o nome já diz, são provenientes de amino ácidos. Um exemplo é a Penicilina G, sintetizada por *Penicillium chrysogenum*.
- Acilogeninas, provenientes de precursores acil ativados. Neste grupo podemos citar a Tetraciclina, de *Streptomyces aureofaciens* e a Geosmina, comum entre actinomicetos.
- Nucleosídeos, sintetizados a partir de ácidos nucléicos. A Cafeína é um representante deste grupo; ela é produzida por espécies de *Coffea*.
- Diversos, nesta categoria são colocados os compostos cujas estruturas não se encaixam em nenhuma das outras categorias, por exemplo, glicopeptídeos, entre os quais está a Vancomicina, originada de *Streptomyces orientalis*.

(VINING, 1986)

Os fatores que desencadeiam a produção de metabólitos secundários geralmente estão ligados à escassez de algum nutriente essencial como carbono, nitrogênio ou fosfato (VINING, 1986; OCHI, 2007).

Ainda não se sabe a função de muitos produtos do metabolismo secundário. 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.

2.3 Antibióticos

2.3.1 Histórico

Os microrganismos sempre estiveram presentes na vida do homem, e eles são a causa de inúmeras doenças. Entretanto isso só começou a ser descoberto no final do século XIX.

Mesmo assim, há descrições sobre o uso de antimicrobianos há 3000 anos, quando médicos chineses utilizavam fungos filamentosos, os quais eram chamados de bolores para o tratamento de tumores inflamatórios e feridas infecciosas. Provavelmente os fungos em questão produziam substâncias antibióticas desconhecidas na época. Os médicos indianos também faziam uso de fungos há mais de 1500 anos. Eles recomendavam a ingestão de fungos filamentosos, que eles chamavam de “mofos”, para a cura de desinterias (TAVARES, 2001).

Apesar destes relatos, a pesquisa por medicamentos começou a se desenvolver somente no século XVI, com o advento da alquimia. Nessa época foi descoberta uma das primeiras substâncias antimicrobianas: a quinina, obtida de uma árvore do Peru chamada cinchona, utilizada no tratamento da malária (TAVARES, 2001).

Em 1877, Pasteur e seu pupilo Jules Joubert foram os primeiros a reconhecer o potencial clínico de produtos microbianos como agentes terapêuticos. Eles observaram que o crescimento do bacilo anthrax na urina podia ser inibido por adição de outros microrganismos inoculados junto a ele (TAVARES, 2001).

No ano de 1889, Vuillemin propôs pela primeira vez um termo para definir o antagonismo entre seres vivos em geral: “antibiose”. O termo antibiótico foi usado somente meio século depois por Waksman, em 1942; ele definiu como antibiótico substâncias elaboradas por seres vivos, geralmente microscópicos, capazes de agir como tóxicos seletivos em pequenas concentrações sobre os microrganismos (TAVARES, 2001).

Dez anos antes, em 1932, Gehard Domagk demonstrou atividade antibacteriana das sulfas *in vivo*, antes elas eram utilizadas apenas como corantes. Dessa data até 1942, várias sulfas surgiram, algumas utilizadas ainda hoje, como sulfadiazina, sulfatiazol, sulfaguanidina e sulfamerazina (TAVARES, 2001).

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928, mas nessa data sua descoberta não foi valorizada. Ela somente foi usada para o

tratamento de infecções humanas em 1941 quando Florey e Chain retomaram as pesquisas com a mesma (TAVARES, 2001).

O sucesso terapêutico da penicilina incentivou os cientistas a buscar novos compostos antimicrobianos provenientes de microrganismos. Selman Walksman, chefe de um grupo de cientistas da Universidade de Rutgers, de Nova Jersey dedicou-se ao estudo de microrganismos do solo, especialmente actinomicetos, e em 1940 descobriu a actinomicina A e em 1942 a estreptotricina, ambas tóxicas para uso humano. Porém, em 1943 este mesmo grupo descobriu a estreptomina, a qual revolucionou a terapêutica anti-infecciosa por causa de sua ação contra bacilos Gram negativos e, sobretudo, contra *Mycobacterium tuberculosis*, promovendo a cura da tuberculose (TAVARES, 2001; CHAMBERS, 2003).

2.3.2 Atualmente

Antibióticos são substâncias produzidas por diversas espécies de microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetos), que suprimem o crescimento de outros microrganismos, ou seja, são produtos de origem natural. Antimicrobianos são compostos com a mesma função, porém podem ser também de origem sintética. Atualmente, o uso destes termos não segue exatamente esta definição, podendo então ser usado o termo antibiótico para incluir agentes antimicrobianos sintéticos, como as sulfonamidas e as quinolonas (CHAMBERS, 2003). Portanto, nesse trabalho, os termos antibiótico e antimicrobiano serão usados de maneira intercambiável, pois o composto

produzido é de origem microbiana e, sendo assim, ambos os termos se aplicam.

Há diversas maneiras de classificar os antimicrobianos.

1. Por microrganismos suscetíveis

- Antibacterianos: ativos contra bactérias
- Antifúngicos: ativos contra fungos
- Antivirais: ativos contra vírus
- Antiparasitários: ativos contra parasitas como helmintos
- Antiprotozoários: ativos contra protozoários

2. Por efeito nos microrganismos

- Bactericidas: matam os microrganismos alvo
- Bacteriostáticos: inibem o crescimento dos microrganismos, necessitando da ação do sistema imune do hospedeiro para eliminação do microrganismo.

A mesma terminologia pode ser adotada para outros grupos de antimicrobianos, como por exemplo, fungicida e fungistático.

3. Por mecanismo de ação

- Agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana. Por exemplo β -lactâmicos, vancomicina, bacitracina.

- Agentes que agem diretamente na membrana plasmática do microrganismo, afetando sua permeabilidade causando o extravasamento de compostos extracelulares. Polimixina, anfotericina B.
- Antimetabólitos que bloqueiam rotas específicas. Sulfonamidas, trimetoprim.
- Agentes que afetam metabolismo bacteriano dos ácidos nucleicos. Quinolonas e rifampicina.
- Agentes que inibem a síntese protéica, os quais podem ser subdivididos em:
 - I. Atuam na subunidade 30S do ribossomo: aminoglicosídicos.
 - II. Atuam na subunidade 50S do ribossomo: macrolídeos.
- Agentes antivirais, também subdivididos em várias classes. Exemplo: aciclovir.

4. Pela estrutura química

Esta classificação provavelmente é a mais ampla e mais complexa, visto que hoje existem no mercado mais de 15 classes de antibióticos com estruturas diferentes (LEVY e MARSHALL,2004). A seguir são citadas algumas das mais importantes.

- Sulfonamidas
- Quinolonas
- β -lactâmicos

I. Penicilinas

II. Cefalosporinas

III. Carbapenens

IV. Monobactâmico

- Aminoglicosídeos
- Macrolídeos
- Tetraciclinas
- Glicopeptídicos
- Estreptograminas

(MACHADO e BARROS, 2001; CHAMBERS, 2003; LEVY e MARSHALL, 2004).

2.4 O fenômeno de resistência

A descoberta das sulfonamidas e da penicilina parecia ter acabado com o problema das infecções bacterianas. Entretanto, já na década de 30 apareceram linhagens de *Streptococcus pyogenes* em hospitais militares que não respondiam mais ao tratamento com sulfas e nos anos 40 cepas de *Staphylococcus aureus* se mostraram resistentes à penicilina em hospitais de Londres (LEVY e MARSHALL, 2004). O homem passou a conhecer, então, as bactérias resistentes.

Resistência é a habilidade de um microrganismo ou célula em sobreviver em presença de um antibiótico. Ela pode ser intrínseca (ou natural), determinada pelo gênero da bactéria e pelo espectro de ação do

antimicrobiano; ou adquirida, a qual pode ser manifestada apenas por algumas cepas de uma mesma espécie bacteriana e é resultante de uma mutação ou desrepressão de um gene ou da aquisição de material genético novo (BARTH, *et al.*, 2001).

Os primeiros casos de resistência antimicrobiana aconteceram, certamente, por um processo de mutação espontânea no cromossomo bacteriano. Erros na síntese de DNA durante a replicação podem acontecer e levar à mutação espontânea de um par de bases numa taxa de 10^{-7} e 10^{-8} , ou seja, este é um evento bastante raro. Uma mutação que tem como resultado a resistência a algum agente antimicrobiano então, é um evento raríssimo, visto que uma mutação pode causar outros efeitos à célula (LEVY e MARSHALL, 2004).

A resistência, portanto, pode ser transmitida de maneira vertical para toda a progênie da bactéria mutada, ou ainda ser transmitida de forma horizontal para outras bactérias, inclusive de gênero diferente. A transmissão horizontal pode ser feita através de elementos genéticos móveis, como plasmídios, bacteriófagos, transposons e ainda por transformação (LEVY e MARSHALL, 2004).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em três categorias gerais:

Inativação enzimática: o microrganismo alvo é capaz de produzir uma enzima que modifica o antibiótico em algum local específico tornando-o inativo. Nesse caso podemos enquadrar a resistência a antibióticos aminoglicosídicos e β -lactâmicos.

Alteração do sítio de ação: ocorre uma modificação no local onde o antibiótico se liga à célula tornando sua ligação com a célula fraca ou impedindo-o de se ligar à mesma.

Alteração do transporte do antibiótico: nesse caso a bactéria pode diminuir a permeabilidade da membrana, reduzindo o número de porinas ou modificando-as, por exemplo; ou a bactéria desenvolve um mecanismo de efluxo do antibiótico através do qual a célula transporta o antibiótico para fora dela, impedindo-o de agir (LEVY e MARSHALL, 2004).

O fenômeno de resistência, como se pode notar, inclui vários organismos e drogas, e o grande problema é que muitas vezes um único microrganismo é resistente a vários antibióticos diferentes, eles são os chamados microrganismos multiresistentes. Esse tipo de resistência foi primeiramente detectado em bactérias entéricas no fim dos anos 50 e início dos 60 (LEVY e MARSHALL, 2004).

Outro problema sério é o fato de, uma vez adquiridos os genes de resistência, eles não são facilmente perdidos, ao contrário, eles são relativamente estáveis. Assim, as opções de tratamento vão ficando cada vez mais limitadas (LEVY, 2005).

O aparecimento de organismos resistentes ocorre somente quando este entra em contato com antibióticos, porque o medicamento inibe o crescimento das cepas suscetíveis, mas seleciona as resistentes. Assim é fácil compreender porque são encontradas mais cepas resistentes em hospitais. No entanto, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos na agricultura,

pecuária predispõe o aparecimento de resistência no ambiente (LEVY e MARSHALL, 2004).

Pacientes hospitalizados infectados com microrganismos resistentes permanecem no hospital o dobro do tempo em relação a pacientes infectados com microrganismos sensíveis. Além disso, eles apresentam maior morbidade e mortalidade, sem contar o aumento do custo deste paciente para o sistema de saúde (LEVY e MARSHALL, 2004).

O órgão Americano *Infectious Disease Society of America* (IDSA) reportou em julho de 2004 que nos hospitais americanos mais de 70% das bactérias causadoras de infecções hospitalares são resistentes a, pelo menos, um antibiótico comumente usado no tratamento de doenças bacterianas.

2.4.1 *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

Staphylococcus aureus é a bactéria que causa o maior número de infecções hospitalares e comunitárias (SCHITO, 2006; FORESTIER, *et al.*, 2007). O tratamento destas infecções depende do tipo de cepa em questão: MSSA, *Staphylococcus aureus* sensível à Meticilina e *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA).

Bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* são originalmente sensíveis a antibióticos β -lactâmicos (FORESTIER, *et al.*, 2007). Entretanto, três anos após o início do uso destes antibióticos, na década 40, cepas resistentes já começaram a ser identificadas (GOOTZ, 1990).

Contudo, a pesquisa de novos antimicrobianos continuou e moléculas semi-sintéticas começaram a ser produzidas. A meticilina foi a primeira penicilina semi-sintética resistente à degradação por β -lactamases (LOWY, 2003). Ela começou a ser utilizada em 1959, e em 1961 foi descrita pela primeira vez a ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, em um hospital do Reino Unido (BACH *et al.*, 2007; CRUM, *et al.*, 2006). MRSA se tornou uma fonte de infecções nosocomiais na Europa nas décadas de 60 e 70, e nos Estados Unidos esse problema começou a ser identificado um pouco mais tarde, no final da década de 70 (GOOTZ, 1990).

Em meados da década de 80 começou-se a detectar infecções por MRSA adquiridas na comunidade (CA-MRSA, *community-acquired* MRSA), as quais foram associadas a disseminações provenientes de ambientes hospitalares (CDC, 1981). Já na década de 90, foram reportados casos de CA-MRSA sem procedência hospitalar, mas associada a alguns grupos de risco, como crianças, moradores de rua, presos, portadores de HIV e atletas participantes de esportes de contato (APPELBAUM, 2006; e CRUM, *et al.* 2006). Mais recentemente, infecções por CA-MRSA têm sido reportadas em pacientes sem fatores de risco estabelecidos (KLUYTMANS-VANDENBERGH, *et al.*, 2006).

MRSA é uma das maiores causas de infecções hospitalares no Reino Unido (CUNNINGHAM, *et al.*, 2007), nos Estados Unidos mais da metade dos isolados de *Staphylococcus aureus* são resistentes à meticilina (APPELBAUM, 2006). Isso é uma tendência mundial.

Um estudo feito nos Estados Unidos constatou um aumento da incidência de MRSA em feridas operatórias de 9% para 30% entre 1995 e 2000 (MANIAN, *et al.*, 2003). Hsueh et al (2004), reportaram um aumento da incidência de MRSA de 26% para 77% em infecções hospitalares entre 1986 e 2001 em Taiwan. Na Europa, os índices de MRSA também são preocupantes: em 26 países monitorados pelo *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* foram coletados 50.759 isolados nosocomiais de 495 hospitais entre 1999 e 2002, resultando em uma prevalência de até 40% em países do sul e da Europa Ocidental.

As infecções hospitalares causadas por MRSA são principalmente encontradas na corrente sangüínea, no trato respiratório inferior, pele, tecidos moles e também pneumonias e bacteremias (SCHITO, 2006). Young e colaboradores (2004) constaram que MRSA está presente em infecções da pele e de tecidos moles em 63% das culturas positivas. Na França, um grande estudo que envolveu 2.365.067 pacientes hospitalizados entre os anos de 2000 e 2003, constatou uma prevalência de MRSA de 33%, e que 15% das infecções na corrente sangüínea eram devido a esta bactéria (Van Der MEE-MARQUET, *et al.*, 2004).

Pacientes infectados com MRSA têm pior prognóstico do que os pacientes com *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), eles permanecem 5 dias a mais no hospital e apresentam uma mortalidade de 20,7% enquanto nos infectados com MSSA essa taxa é de apenas 6,7%. Além disso, eles demandam maiores gastos, US\$ 40000 a mais do que os pacientes com feridas operatórias infectadas por MSSA (ENGEMANN, *et al.*, 2003).

Infecções de tecidos moles por MRSA são mais severas que as infecções por MSSA, e as opções de antibióticos efetivos nesse tratamento são mais limitadas (BACH *et al.*, 2007).

As infecções comunitárias por MRSA localizam-se principalmente na pele. Elas afetam geralmente pessoas mais jovens, no entanto, freqüentemente elas são severas, com uma taxa de hospitalização de 16% (CRUM, *et al.*, 2006).

Um estudo Norte-Americano avaliou a incidência de MRSA em infecções adquiridas na comunidade e constatou uma prevalência de 30,2% em 27 estudos retrospectivos e 37,2% em 5 estudos prospectivos desta cepa (SALGADO *et al.*, 2003). Bach e colaboradores (2007), da Universidade de Illinois, pesquisaram a incidência de MRSA adquiridos na comunidade no ano de 2005 em 52 pacientes e constataram sua presença em 73,1% dos casos contra 13,5% de MSSA, número este maior que em estudos prévios, levando-os a considerar uma “epidemia” de MRSA.

A resistência do MRSA acontece devido basicamente a 2 fatores:

1. Produção de β -lactamase

β -lactamases são enzimas que clivam a ligação amida do anel β -lactâmico inativando o agentes antimicrobianos desta classe.

2. Alteração das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs)

As penicilinas precisam se ligar a proteínas de membrana, chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBP, do inglês, *penicillin binding protein*) para exercerem sua atividade. Essas proteínas se localizam no

peptídeoglicano da parede celular de bactérias e estão envolvidas na síntese do mesmo. As penicilinas se ligam a essas proteínas, impedindo a formação da parede celular, levando à morte da célula. Logo, se a penicilina não consegue se ligar a essas proteínas, ela não consegue agir. A modificação de PBP responsável pela resistência a meticilina gera uma proteína PBP2a, cuja ligação com a mesma é extremamente fraca, impedindo sua ação.

A PBP2a é produto do gene *mecA*, que faz parte de um elemento genético móvel, staphylococcal chromosomal casset *mec* (SCC*mec*) (SCHITO, 2006). Até hoje, já foram identificados cinco tipos de SCC*mec* que diferem em tamanho e em composição genética (KLUYTMANS-VANDENBERGH, *et al.*, 2006). Cepas de MRSA hospitalares geralmente contêm os elementos genéticos SCC*mec* do tipo I, II e III, enquanto as cepas comunitárias apresentam os elementos do tipo IV (APPELBAUM, 2006).

Uma das grandes preocupações sobre cepas resistentes à meticilina é que normalmente elas carregam genes de resistência a outros antimicrobianos também, sendo assim, as opções para o tratamento de MRSA são mais limitadas e isso vem se agravando a cada dia. A resistência dessas cepas frente à lincosamida, fluoroquinolonas, clindamicina está se tornando mais prevalente; e o que é mais preocupante: já existem isolados com resistência a vancomicina, teicoplanina e linezolida (ELSTON, 2007), que são os antibióticos de última escolha no tratamento destes patógenos.

2.5 Desenvolvimento de novos antimicrobianos

Atualmente, há mais de 200 drogas com atividade antimicrobiana, sendo que 47 novos antibióticos foram aprovados pelo FDA e *Canada Health Ministry* no período de 1983 a 2001. Desde 1998, somente 9 novos antimicrobianos foram aprovados, dos quais apenas 2 apresentavam um novo mecanismo de ação. No ano de 2002 foram aprovados 90 novos medicamentos, mas nenhum antimicrobiano; em 2003 foram aprovados 2 agentes antimicrobianos, um lipopeptídeo e uma quinolona, produzidos por indústrias de biotecnologia de pequeno porte. Atualmente, estão sendo pesquisados aproximadamente 550 novos medicamentos e, desse total, apenas 6 são da categoria dos antimicrobianos (OVERBYE e BARRET,2005).

Esta falta de interesse pelo desenvolvimento de novos antibióticos por parte das grandes indústrias farmacêuticas é vista com grande preocupação pela comunidade científica, pois doenças infecciosas são a segunda causa de morte em países desenvolvidos e a falta de pesquisa de antimicrobianos eficazes contra microrganismos resistentes, principalmente, é que infecções comuns podem se tornar incuráveis e até letais. Para agravar a situação, estão surgindo cepas pan-resistentes (que não respondem a quase nenhum antibiótico) que obrigam o uso de antimicrobianos muito tóxicos ao homem como a Polimixina B e a Colistina (PROJAN, 2003; NORRBY, *et al.*, 2005).

Muitos são os motivos que fazem a indústria farmacêutica parar de investir na busca de novos antibióticos. Um deles é a dificuldade de sucesso, ou seja, muitos antimicrobianos lançados no mercado, após anos de pesquisa,

logo encontram cepas resistentes. Outro fator é a comercialização de medicamentos genéricos, cujos fabricantes não têm gasto com o desenvolvimento do produto e podem cobrar mais barato pelo mesmo. Assim, a entidade que pagou por toda a pesquisa não tem lucro ou até mesmo não tem o retorno do seu investimento (PROJAN, 2003; NORRBY, *et al.*, 2005).

Calcula-se que o custo do desenvolvimento de um novo composto antimicrobiano seja de € 500 a 800 milhões e, normalmente, o tempo que a droga leva para chegar no mercado após a primeira administração em humanos é maior que seis anos. Desde a descoberta de uma molécula bioativa até o produto final, o maior custo do processo é o da triagem clínica, sobretudo das fases II e III, cujo objetivo é assegurar a eficácia e segurança do medicamento (NORRBY, *et al.*, 2005).

Outro fator limitante na introdução de novas drogas no mercado são as regras impostas pelos órgãos reguladores. Na Europa e nos Estados Unidos há a exigência de dados estatísticos que comprovem superioridade significativa do novo agente antibacteriano frente aos já existentes no mercado. É importante salientar o caso da vancomicina, que entrou no mercado quando a incidência de MRSA era baixa. Sob essa nova exigência de apresentar efetividade com superioridade significativa sobre um antibiótico já no mercado, provavelmente ela não teria passado na comparação com a meticilina. Ironicamente, hoje muitas cepas de MRSA são suscetíveis somente à vancomicina (PROJAN, 2003).

A promoção do uso racional de medicamentos, cujo objetivo é evitar o uso demasiado de antibióticos a fim de prevenir a emergência de cepas

resistentes também é um fator visto negativamente pelas indústrias porque, de certa forma, limita a venda destes medicamentos (PROJAN, 2003; NORRBY, *et al.*, 2005).

A terapia com antimicrobianos dura, em geral, um período curto de tempo. Com isso é compreensível que o preço atribuído a ele seja alto; para haver o retorno do investimento da sua produção. Além disso, este tipo de medicamento é considerado “*life-saving*”, ou seja, são os salva vidas; com isso seus preços algumas vezes são superestimados, pois o doente será obrigado a pagá-lo (PROJAN, 2003).

Finalmente, é muito mais interessante e rentável para a indústria farmacêutica investir na pesquisa de medicamentos de uso prolongado utilizados em doenças crônicas, como hipertensão, hiperlipidemia e diabetes mellitus, porque com estes medicamentos o retorno do investimento é garantido e não há o risco de perderem a atividade, pois nestes casos não ocorre o desenvolvimento de resistência (OVERBYE e BARRETT, 2005; PROJAN; 2003, NORRBY, *et al.*, 2005).

Há, ainda, um outro fator que causou grandes frustrações na indústria: advento do genoma. A indústria quis utilizá-lo como alvo para o desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana, entretanto todos os estudos neste campo falharam (OVERBYE e BARRETT, 2005; PROJAN, 2003; NORRBY, *et al.*, 2005).

A verdade sobre a descoberta de novos compostos antimicrobianos é que sua maior fonte de sucesso são os produtos naturais de origem microbiana, sobretudo actinomicetos e fungos (PELÁEZ, 2006). Esses produtos

são normalmente metabólitos secundários cujas funções na natureza acredita-se ser comunicação ou proteção (OVERBYE e BARRETT, 2005).

Uma grande vantagem da utilização de compostos originários de microrganismos é que eles geralmente são produzidos dentro de uma célula, e muitas vezes são moléculas capazes de penetrar em outras células. Dessa forma é eliminado o problema de permeabilidade nas células que alguns produtos sintéticos apresentam, tornando necessário todo um estudo de direcionamento ao alvo (OVERBYE e BARRETT, 2005).

Outra comprovação de que os produtos naturais são a melhor fonte de pesquisa de antibióticos é que nos últimos 30 anos, somente as oxazolidinones são de origem totalmente sintéticas (OVERBYE e BARRETT, 2005; PROJAN, 2003; NORRBY, *et al.*, 2005). Os actinomicetos têm sido grupo de organismos mais bem sucedido na busca de compostos antimicrobianos, inclusive modelos matemáticos sugerem que o número de antibióticos a serem descobertos a partir somente do gênero *Streptomyces* pode ser maior que 10^5 (PELÁEZ, 2006; WATVE, *et al.*, 2001).

3. MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas 24 cepas de actinomicetos previamente isoladas por Margaroni Fialho de Oliveira de amostras de leiras de compostagem formadas de lixo urbano da Central de Triagem e Compostagem de Resíduos Sólidos de Sapiranga e de uma composteira experimental da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e gentilmente cedidas pela Professora Sueli Van Der Sand (OLIVEIRA, M.F., 2003).

Os isolados foram mantidos em microtubos com 1mL de caldo Amido Caseína, aos quais foi adicionado glicerol estéril a uma concentração final de 15%. Os tubos foram lacrados e congelados para preservação da linhagem original.

3.1 Triagem

3.1.1 Triagem em placa

A primeira etapa da pesquisa foi realizar a triagem dos isolados de actinomicetos para verificar se esses isolados apresentavam atividade antimicrobiana. Para tanto foi utilizado o método de antibiose em traço cruzado (Figura 1), no qual se inocula o microrganismo produtor de antibiótico em um traço central de uma placa de Petri e os microrganismos alvo em traços perpendiculares a este traço central.



FIGURA 1. Antibiose em placa pelo método de traço cruzado

Inoculou-se o actinomiceto na forma de um traço central em placa de Petri com ágar Bennett (2g/L de peptona (marca Himedia); 1g/L de extrato de carne (marca Biobrás), 1g/L de extrato de levedura (marca MicroMED) e 1,8% de ágar (Himedia)); pois este é um meio rico no qual todos os microrganismos

citados apresentam um bom crescimento e, propicia a formação das hifas aéreas dos actinomicetos, o que não ocorre em outros meios ricos como Mueller-Hinton, por exemplo. Incubou-se por 7 dias a 30° para que ele crescesse e desenvolvesse suas hifas aéreas, então inoculou-se os microrganismos alvo em traço perpendicular previamente crescidos em caldo nutritivo por aproximadamente 16 horas a 35°C. Foram inoculados 4 microrganismos alvo, em cada um dos dois lados da placa. Após a placa foi colocada na estufa a 35°C por 24 horas, quando então se fez a leitura do teste. Verificou-se quais os microrganismos foram inibidos (em duplicata) e, no caso de haver inibição, mediu-se a distância entre o microrganismo alvo e o actinomiceto.

Foram escolhidos microrganismos patogênicos de interesse clínico de diferentes morfologias (cocos, bacilos, esferoidais) e diferentes composições de parede, com a finalidade de analisar o potencial do composto antimicrobiano produzido. Foram usadas bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 25133, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13885, *Escherichia coli* ATCC 25922; e a levedura *Candida albicans* ATCC 90028; perfazendo um total de 8 microrganismos alvo.

Os quatro isolados de actinomicetos que apresentaram maiores distâncias de inibição foram selecionados para a triagem em caldo.

3.1.2 Triagem em caldo

Os quatro isolados de actinomicetos selecionados na triagem em placa foram cultivados em tubos com caldo Amido Caseína e incubados por 7 dias a 30°C e procedeu-se antibioses em poços contra *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) ATCC 33591, pois esta bactéria é responsável pela maioria das infecções hospitalares e o número de antibióticos disponíveis para o seu tratamento está cada vez mais limitado.

A antibiose em poços foi realizada em uma placa de Petri com ágar Müeller-Hinton (Acumedia), foram feitos 4 poços com ponteira de 1000µL estéril e inoculou-se com swab estéril MRSA crescido por aproximadamente 16 horas em caldo nutritivo a 35°C e diluído a 0,5 da escala de MacFarland. Em cada poço, foram colocados 100µL do caldo de cultivo dos isolados de actinomicetos cultivados em caldo Amido Caseína. A placa foi deixada em geladeira *overnight*, para a difusão do caldo no ágar e após esse tempo foi colocada em estufa a 35°C por 24 horas, quando se fez a leitura dos halos.

Os dois isolados que apresentaram maiores halos de inibição foram submetidos a um teste piloto de produção de compostos antimicrobianos em caldo Amido Caseína: amido 1g/L (Dinâmica); caseína 0,3 g/L (Vetec); KNO₃ 2g/L (Dinâmica) + NaCl 2g/L (Nuclear); K₂HPO₄ 2g/L (Reagen); MgSO₄ 0,05g/L (Reagen) e FeSO₄ 0,01 g/L (Reagen), e meio Bennett (peptona 2g/L, extrato de carne 1g/L, e extrato de levedura 1g/L), ambos a 30°C. Foram retiradas amostras em 7, 14 e 21 dias, e feito antibiose em poço contra MRSA ATCC 33591, como descrito anteriormente. O actinomiceto que apresentou maiores

halos de inibição foi o escolhido para a análise da influência das condições de cultivo na produção de antibiótico.

3.2 Análise da influência das condições de cultivo na produção de antibiótico

3.2.1 Comparação de cultivo estático e cultivo agitado

O isolado foi cultivado em meio líquido e sob diferentes condições nutricionais e de temperatura.

O primeiro teste foi realizado com os meios de cultivo:

- Meio Bennett (MB) (peptona 2g/L, extrato de carne 1g/L, e extrato de levedura 1g/L);
- Meio Bennett + Amido 10 g/L (MBA);
- Meio Bennett + Glicose 10 g/L (MBG).

Os três meios foram inoculados com a cepa selecionada e colocados em agitador rotatório com uma velocidade de 250 rpm. Em paralelo, testou-se cultivar a cepa em meio Bennett, porém sem agitação e em estufa a 30°C. A produção de compostos antimicrobianos foi avaliada através do método de antibiose em poço contra MRSA ATCC 33591.

Após este primeiro experimento, foram testadas mais duas temperaturas para cultivar o actinomiceto em meio Bennett sem agitação, 27°C e 37°C. Este cultivo teve por objetivo avaliar em qual temperatura a cepa produziria maior quantidade de antibiótico e com maior velocidade.

3.2.2 Comparação entre diferentes meios de cultivo

Definida a temperatura de trabalho, testaram-se 6 meios de cultivo distintos, variando fontes de carbono e nitrogênio, visando a maior produção de antibiótico. Os meios escolhidos foram:

- Meio Bennett (MB): peptona 2g/L, extrato de carne 1g/L, e extrato de levedura 1g/L;
- Meio Bennett + Amido 10 g/L (MBA);
- Extrato de levedura 2g/L + peptona 2g/L (LP);
- Extrato de levedura 2g/L + peptona 2g/L + glicose 10 g/L (G);
- Extrato de levedura 1g/L + Extrato de carne 1g/L + KNO_3 2g/L + NaCl 2g/L; K_2HPO_4 1g/L; MgSO_4 0,05g/L e FeSO_4 0,01 g/L (InA), e
- Extrato de levedura 1g/L + Extrato de carne 1g/L + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 g/L (Reagen) + NaCl 2g/L; K_2HPO_4 1g/L; MgSO_4 0,05g/L e FeSO_4 0,01 g/L (InB).

Todos os meios foram ajustados em pH 7,00 antes da esterilização.

Os meios InA e InB foram formulados visando a substituição da peptona, a qual é a fonte primordial de nitrogênio orgânico nos demais meios, por fontes de nitrogênio inorgânico. A quantidade de nitrogênio inorgânico dos meios InA e InB foram equivalentes às do meio Amido Caseína, no qual os actinomicetos apresentam um bom crescimento.

O cultivo foi feito em Erlenmeyer de forma estática e com um volume de meio de cultivo correspondente a 20% do volume do frasco.

Foi feito um pré-inóculo do isolado em tubos com Ágar Amido Caseína inclinado, foi incubado por 48 horas a 37°C para a produção de esporos. Adicionou-se 2mL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril em cada tubo e agitou-se por 1 minuto cada um deles para a remoção de esporos. As suspensões de esporos de todos os tubos foram vertidas em um Erlenmeyer estéril para a obtenção de um *pool* homogêneo para ser inoculado nos Erlenmeyers com o meio de cultivo a ser testado. Deste *pool* foram utilizados 2 mL para cada 25mL de meio de cultivo, com uma concentração de 10^7 UFC/mL. A contagem das Unidades Formadoras de Colônias foi realizada através da técnica de semeadura de superfície utilizando alça de Drigalsky, em Ágar Amido Caseína.

Realizou-se coletas após 1, 3, 6, 9, 12 e 15 dias para avaliar a atividade antimicrobiana da cepa frente à MRSA ATCC 33591, o pH do meio, e a quantificação do crescimento bacteriano através da massa seca.

Para a determinação da massa seca, o caldo de cultivo com as células foi primeiramente centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm (Centrífuga Janetzki modelo K23), para melhor separação das células do caldo, facilitando assim a filtração. A filtração foi feita a vácuo, utilizando o sistema filtrante marca Gelman Sciences e membranas de acetato de celulose de porosidade 0,22µm (Millipore) dessecadas por aproximadamente 24 horas antes do seu uso. A membrana contendo as células foram secas em estufa a 60°C até peso constante. Antes de cada pesagem as membranas foram esfriadas por 1 hora em dessecador.

O pH foi determinado em potenciômetro (WTW Wissenschaftlich – Technische Werkstätten modelo pH 330i/SET).

A atividade antimicrobiana foi analisada por antibiose em placas através do método de cilindros. Utilizou-se o ágar Müller-Hinton (Acumedia), e a bactéria alvo utilizada foi MRSA ATCC 33591. A bactéria foi cultivada previamente em caldo nutritivo por 16 horas, então foi diluída em solução salina a 0,5 na escala de McFarland, e inoculada com suabe estéril na placa de Petri contendo o ágar Müller-Hinton. Quatro cilindros de metal foram colocados em cada placa. Uma alíquota de 100 μ L do filtrado foi colocada dentro do cilindro, e a placa foi condicionada em geladeira por 12 horas para a difusão do filtrado no meio. Após a difusão, a placa foi incubada por 35°C por 24 horas, momento no qual se realizou a leitura dos halos de inibição.

3.3 Análise Estatística

Procedeu-se à análise estatística através do método de fatorial 6 x 6 (seis meios de cultura e seis tempos) no delineamento blocos casualizados com 3 repetições, e também procedeu-se às análises complementares da análise de variância as quais foram feitas através de teste de comparação múltipla de médias (Tukey) para os meios de cultura a 5% de probabilidade. Nos casos em que houve interação significativa (P-valor $\leq 0,05$) meios x tempo a mesma foi desdobrada comparando as médias de meio dentro de cada tempo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e os tempos dentro de cada meio pela análise de regressão (Linear, quadrática ou cúbica). Foi escolhida a

regressão de maior grau significativo independentemente da significância dos graus anteriores.

3.4 Morfologia

A caracterização morfológica foi feita analisando-se a cor do micélio aéreo e vegetativo, e observando-se o tipo de cadeia de esporos através da técnica de microcultivo. A cor do micélio aéreo e vegetativo foi observada utilizando ágar Amido Caseína e Czapeck-Dox (sacarose 1g/L (Reagen); NaNO_3 2g/L (Dinâmica) + KCl 0,5g/L (Nuclear); K_2HPO_4 1g/L (Reagen); MgSO_4 0,5g/L (Reagen) e FeSO_4 0,01 g/L (Reagen), ágar 15g/L.

O microcultivo foi realizado em placa de Petri de 90 mm contendo duas lâminas de microscópio posicionadas em cruz e dois pedaços de algodão umedecidos com água estéril periodicamente para manter a umidade do ambiente. Foi colocado um cilindro de ágar Amido Caseína já solidificado onde inoculou-se o actinomiceto em um traço central e ao redor do ágar, com auxílio de uma agulha de platina. A placa foi incubada a 37°C por até 20 dias. Foram feitas observações em microscópio óptico em 7, 14 e 21 dias, utilizando-se aumento de 400x.

3.5 Avaliação do espectro de ação

Para a avaliação do espectro de ação do composto produzido foram utilizados os filtrados do dia em que o halo de inibição contra MRSA foi maior, para cada meio de cultivo testado.

Esta avaliação foi realizada contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras.

As bactérias Gram positivas testadas foram:

- Enterococcus faecalis ATCC 29212
- Staphylococcus epidermidis ATCC 12228
- Bacillus stearothermophilus ATCC 7953

As bactérias Gram negativas testadas foram:

- Enterobacter aerogenes ATCC 13048
- Escherichia coli ATCC 25922
- Klebsiella pneumoniae ATCC 13883
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- Proteus mirabilis ATCC 25133
- Salmonella thyphimurium ATCC 14028

As leveduras foram:

- Candida albicans ATCC 90028
- Candida glabrata CBS 2001
- Candida tropicalis CBS 94

O teste foi feito pela técnica de antibiose em placas, pelo método de cilindros. O meio de cultivo foi Ágar Müller-Hinton e a quantidade de filtrado colocada nos cilindros foi 100µL. As bactérias alvo e as leveduras foram cultivadas previamente em caldo nutritivo por 16 horas. Foram diluídas em solução salina a 0,5 na escala de McFarland, e inoculadas com suabe estéril na placa de Petri contendo o ágar Müller-Hinton, mesmo procedimento utilizado na etapa anterior da pesquisa quando se avaliou a atividade antimicrobiana do composto contra MRSA. Após a adição de 100µL dos filtrados nos cilindros, as placas foram armazenadas em geladeira por 12 horas para a difusão dos filtrados no agar Mueller-Hinton. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e foi feita a leitura das mesmas.

3.6 Separação do composto por cromatografia em camada delgada

Cromatografia é um processo que possibilita a separação de componentes de uma mistura complexa. A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) consiste em uma camada fina de sílica-gel (SiO_2), alumina-gel (Al_2O_3), de amido e gesso, ou outros, aplicados sobre uma chapa sólida (de vidro ou alumínio). Aplica-se uma alíquota da amostra próximo à extremidade da placa e deixa-se secar. Coloca-se a placa em uma cuba contendo uma mistura de solventes, sistema solvente, a qual migra por capilaridade, atingindo o ponto de aplicação e separando os componentes da amostra conforme suas polaridades.

Neste trabalho foram utilizadas placas de alumínio e sílica Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, nas quais se aplicou aproximadamente 25µL do filtrado com capilares de vidro. A secagem das placas foi feita em estufa a 40°C, e após elas foram colocadas em cubas de vidro com diversos sistemas solventes retirados da literatura (BADJI, *et al.*, 2005; BOUDJELLA *et al.*, 2006; CARVALHO, 2007), são eles:

- BAW: Butanol/Ácido acético/ água 4:1:5
- Clorofórmio/ Metanol/ Amônia 100:5:1
- Acetato de etila/ Metanol/ água 100: 13,5: 10
- Clorofórmio/ Etanol/ água 16:8:1

Procedeu-se à leitura das placas sob luz ultra-violeta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Conforme a resolução e separação das bandas identificadas, alguns sistemas solventes foram modificados para otimizar a separação das mesmas.

Os sistemas modificados estão descritos abaixo:

- BAW: Butanol/Ácido acético/ água 3:1:1
- Clorofórmio/ Metanol/ água 75:5:1
- Clorofórmio/ Etanol/ água 8:5:1

A marca dos solventes utilizados foi Dinâmica (Etanol, Butanol e Ácido acético), Nuclear (Metanol) e Synth (Clorofórmio).

3.7 Autobiografia

A autobiografia é uma técnica utilizado para identificar a(s) banda(s) da CCD que possui atividade antimicrobiana. Para tanto, coloca-se a placa da CCD em um meio semi-sólido com a bactéria alvo e verifica-se onde ocorre inibição do crescimento da mesma.

Sendo assim, após à leitura das placas sob luz UV, estas foram colocadas em placas de Petri, onde se verteu ágar Müller-Hinton. Sobre o ágar inoculou-se a bactéria alvo, MRSA ATCC 33591, na diluição de 0,5 de MacFarland, como descrito anteriormente, e inoculada com *swab* estéril na placa de petri.

A placa de Petri foi colocada em geladeira por 12 horas para a difusão do composto antimicrobiano da sílica para o ágar. Após a difusão, a placa foi incubada por 35°C por 24 horas, quando foi realizada a leitura. Na banda onde se encontra o antimicrobiano há inibição do crescimento do microrganismo alvo.

3.8 Purificação parcial do composto

A purificação do composto antimicrobiano produzido foi feita diretamente da placa de CCD, pois dessa forma o composto já estava separado dos demais componentes do filtrado.

Cortou-se a banda correspondente à que inibiu o crescimento de MRSA e raspou-se a sílica dessa banda para um tubo plástico de 1,5 mL. Em cada tubo colocou-se uma quantidade de sílica correspondente a cinco bandas.

Os solventes testados para extrair o composto antimicrobiano aderido à sílica foram: Álcool Etílico, Álcool Metílico, Acetato de Etila e Clorofórmio. Adicionou-se 1mL de cada solvente separadamente em cada tudo com a sílica raspada da placa de CCD. Deixou-se os solventes 30 minutos em contato com a sílica, com agitação ocasional. Centrifugou-se a mistura por 20 minutos a 15000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Testou-se a atividade antimicrobiana de uma alíquota de 25µL de sobrenadante de cada tubo com solvente diferente pelo método de cilindros em placa, utilizando-se o respectivo solvente como branco. Após definido o solvente para extração do composto da placa de sílica, o sobrenadante com atividade antimicrobiana foi seco em estufa a 40°C.

3.9 Identificação parcial do composto

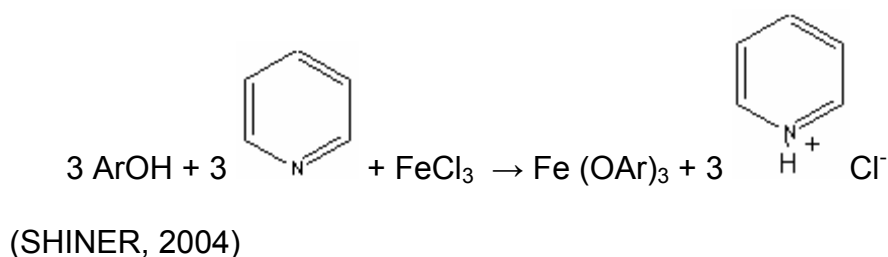
A identificação do composto foi feita através de uma série de análises.

3.9.1 Coloração de CCD

Utilizou os seguintes reagentes de cor para CCD: Cloreto férrico e Ninhidrina, Draggendorff e Anisaldeído.

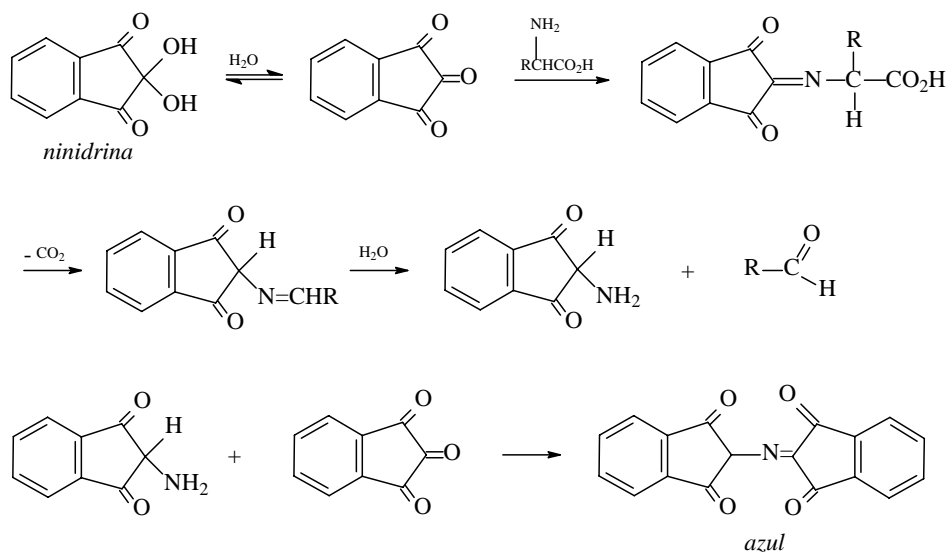
Nas colorações com Cloreto férrico utilizaram-se padrões de antibióticos de diversas classes: rifampicina, eritromicina, tetraciclina e gentamicina. Estes antimicrobianos foram dissolvidos em água (10mg de cada), aplicados na mesma placa de sílica onde foi aplicado o filtrado contendo

o composto antimicrobiano em estudo e foram submetidos a CCD, com o mesmo sistema escolhido para a separação do composto produzido pelo actinomiceto em estudo: clorofórmio/etanol/água 8:5:1. O reativo de Cloreto Férrico é utilizado para identificar a presença de hidroxilas fenólicas, ou seja, grupos OH ligados a um anel aromático. Os fenóis formam complexos coloridos com 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 em 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 3-5% sobre a placa de sílica contendo os compostos alvo. Observa-se então, o aparecimento de cor.

O teste da Ninhidrina é empregado para a determinação de grupos amino livres. Ele é bastante usado na identificação de aminoácidos e também serve na identificação de alguns antibióticos aminoglicosídeos. Todos os aminoácidos que contêm o grupo α -amino livre reagem com ninhidrina, produzindo uma substância de coloração azul-violácea. Algumas exceções, como a prolina e a hidroxiprolina, que possuem o grupo α -amino substituído, fornecem derivados com a cor amarelo característica.



A análise é feita borrifando uma solução de Ninhidrina sobre a placa de sílica contendo os compostos alvo. A placa é ativada em luz UV e colocada em estufa a 100°C por alguns minutos. A presença de grupamentos amina livre é confirmada pelo aparecimento de cor azul-violácea. Quaisquer outras cores (amarelo, laranja, vermelho) constituem resultado negativo.

Neste teste, e nos dois seguintes, aplicou-se sobre a placa de CCD antibióticos, de diferentes classes, solubilizados (ou parcialmente solubilizados em água) na mesma placa de CCD onde foi aplicado o filtrado contendo o composto antimicrobiano em estudo e deixou-se eluir no sistema clorofórmio/etanol/água 8:5:1. Os antibióticos utilizados foram:

- Aminoglicosídeos: amicacina, gentamicina e neomicina
- Ansaminas: rifampicina
- Azólico: cetoconazol
- Cefalosporina: cefalexina

- Glicopeptídeos: vancomicina
- Macrolídeo: eritromicina
- Penicilina: amoxicilina
- Poliênico: polimixina
- Polipeptídeo: bacitracina
- Quinolona: norfloxacino

O Anexo 1 apresenta as estruturas dos antibióticos citados.

Draggendorf é um reagente utilizado na identificação de alcalóides. Alcalóides são produtos naturais, a maioria ativa opticamente, e que possuem heterociclos com nitrogênio, em suas unidades estruturais. Possuem pronunciada atividade fisiológica, são originados de aminoácidos e, normalmente, possuem caráter básico (CHATWAL, 1981).

O reativo de Dragendorff iodado possui a seguinte composição: 10mL de solução aquosa de iodeto de potássio a 40%, 10mL de solução 1N de nitrato de bismuto em ácido acético glacial a 20%, 80mL de ácido sulfúrico a 10%, 2g de iodo ressublimado (MOFFAT, 1986). Ele é aplicado sobre a placa e uma reação é positiva quando há aparecimento imediato da cor vermelho tijolo.

Finalmente, 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.

3.9.2 Determinação do pH

O pH do composto antimicrobiano produzido pelo isolado de actinomiceto 2s e separado por CCD foi realizado solubilizando o composto seco em água destilada e determinando o pH com papel universal Merck.

O valor de pH se refere à concentração de íons Hidrogênio em solução, especificamente o pH de uma solução é definido como sendo o logaritmo inverso da concentração de íons H^+ , onde a concentração de H^+ está expressa em unidades de molaridade (BERG, *et al.*, 2007).

3.9.3. Métodos espectroscópicos

As análises espectroscópicas utilizadas foram Infra-Vermelho (IV), Ultra-Violeta (UV) e espectrometria de massas.

A espectroscopia de Infra-Vermelho abrange uma região que vai de 4000 a 600 cm^{-1} , na qual é capaz de captar a energia vibracional das ligações químicas. Cada tipo de ligação tem uma frequência de vibração natural diferente e assim, grupos funcionais podem ser identificados em regiões específicas do espectro. Apesar disso, duas moléculas diferentes, mesmo que apresentem os mesmo grupos funcionais, apresentam sempre um espectro diferente. Pode-se dizer que o espectro de Infra-Vermelho é a impressão digital da molécula, principalmente na região entre 1300 e 909 cm^{-1} , a qual

geralmente apresenta um padrão de absorção muito complexo (SILVERSTEIN, 1974).

As análises de infravermelho foram realizadas em um espectrômetro de Mattson Galaxy Series FT- 3000 modelo 3020. Confeccionou-se a amostra sólida misturando aproximadamente 2mg do composto antimicrobiano seco com 1g de brometo de potássio e submetendo a mistura a uma alta pressão, formando uma pastilha.

A absorção molecular na região ultravioleta (190 a 400nm) e visível (400 a 800nm) do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção da energia resulta da elevação de elétrons de um orbital de menor energia para um orbital de maior energia, em um estado excitado. Quando o elétron retorna ao seu estado normal, a diferença de energia é detectada e quantificada (SILVERSTEIN, 1974). Embora a absorção ultravioleta resulte da excitação de elétrons, o núcleo que mantém esses elétrons unidos nas suas ligações é determinante na força com que esses elétrons ficam ligados e na posição ou comprimento de onda onde ocorre essa absorção. Os núcleos de átomos que absorvem energia nessa região são chamados cromóforos (PAVIA *et al.*, 2001).

Nem todas as substâncias absorvem energia na região ultravioleta e visível, portanto a espectroscopia de UV é seletiva, ou seja, somente são reconhecidos grupos característicos, mesmo em uma estrutura muito complexa. Então, esta técnica é bastante importante na confirmação da presença ou ausência de grupos funcionais evidenciados por outras técnicas.

No método de UV realizou-se uma varredura a partir do comprimento de onda de 200 a 1000 nm em placa de quartzo M2 (Molecular Devices) e 96 poços de 200 μ L, onde foi adicionado o composto solubilizado em água.

A espectrometria de massas é capaz de determinar o peso molecular exato de uma substância, além de que, através da fragmentação da molécula, pode fornecer informações interessantes da mesma (CAMPOS, 1977).

Para a espectrometria de massas utilizou-se um sistema de HPLC acoplado à espectrômetro de massas com sistema de ionização por *electrospray* e com analisadores de massa em triplo quadrupolo (modelo API 5000, Applied Biosystems). A solução de infusão para os experimentos em MS e MS/MS foi preparada a partir de uma diluição da amostra original (1:500) em acetonitrila:água (1:1). Esta solução diluída foi injetada no sistema de ionização com um fluxo de 5 microlitros / minuto com a ionização sendo realizada em modo positivo [MH⁺].

O primeiro experimento foi realizado em modo de análise de massas sem fragmentação (Q1 MS), onde se analisaram as massas presentes na amostra utilizando somente o primeiro quadrupolo do sistema. Foi utilizada uma varredura de massas na faixa de 100 a 1000 u.m.a (unidades de massa).

O segundo experimento consistiu em análise dos perfis de fragmentação das dez espécies de razão m/z (massa/carga) mais intensos identificados no primeiro experimento. Os testes de fragmentação revelaram a produção de íons filho a partir dos precursores selecionado (*product ion* –

MS2). Neste experimento, as massas das quais se deseja obter perfis de fragmentação são selecionadas pelo primeiro quadrupolo, em seguida são submetidas ao gás de colisão no segundo quadrupolo e os íons filho obtidos são analisados pelo terceiro quadrupolo do sistema. Para a obtenção destes perfis, utilizou-se uma rampa de energia de colisão iniciando em 5 volts e indo até 130 volts, com intervalos de 10 volts.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem

4.1.1 Triagem em placa

Na triagem em placa realizada com 24 isolados de actinomicetos verificou-se que 14 isolados não apresentaram atividade contra nenhum dos microrganismos testados. Os demais 10 (42%) isolados de actinomicetos apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos microrganismos testados.

Destes dez, 7 (29%) cepas inibiram somente bactérias Gram positivas e 3 (12,5%) isolados foram capazes de inibir bactérias Gram negativas e também Gram positivas, no entanto a inibição observada foi de baixa intensidade. A tabela 1 mostra os isolados com atividade antimicrobiana e as bactérias inibidas por eles. A intensidade da inibição (+) foi medida pela distância entre o actinomiceto e a bactéria alvo. Nenhuma cepa foi capaz de inibir a levedura *Candida albicans*.

TABELA 1. Resultado da antibiose na triagem inicial dos isolados de actinomicetos com atividade contra as bactérias alvo

Cepa de actinomiceto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
2s	+++	+	+++	-	-	-	-
3s	++	++	+++	-	-	-	-
25e	++	+	+++	-	-	-	-
28	++	++	-	-	-	-	-
29s	+++	+	-	+	++	-	-
34e	+	+	++	++	++	++	+
35	+	+	++	-	-	-	-
47e	++	-	++	+	++	+	+
48	+	++	-	-	-	-	-
77e	+	+	-	-	-	-	-

- = sem inibição

+ = fraca inibição (1-3mm)

++ = inibição moderada (4-10mm)

+++ = forte inibição (mais de 10mm)

Fonte: Marcela Heck

Estudos anteriores demonstram que isolados de actinomicetos apresentam maior atividade contra bactérias Gram positivas do que contra bactérias Gram negativas, um desses estudos é o de González e colaboradores (2005), os quais trabalharam com 337 isolados e encontraram atividade antimicrobiana somente em 27% deles, sendo que a atividade mais freqüentemente encontrada foi contra bactérias Gram positivas (23%). Contra *Candida albicans* 10,7% e a menor atividade foi contra bactérias Gram negativas (6,5%). Outro estudo com 86 isolados (ZITOUNI *et al.*, 2005), todos os isolados apresentaram forte atividade contra bactérias Gram positivas, apresentaram atividade moderada contra leveduras, mas a atividade observada contra bactérias Gram negativas foi fraca a moderada e pouco freqüente. Ainda em outro estudo feito por Saadoun e Gharaibeh (2003) 18 de 60 isolados tiveram atividade contra bactérias Gram positivas e somente 7 contra Gram negativas.

Assim, podemos verificar que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. Desta triagem em placa foram selecionados os isolados 2s, 3s, 34e e 47e. Os isolados 2s e 3s foram escolhidos por apresentarem maiores distâncias de inibição contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, de interesse clínico por ser o patógeno causador do maior número de infecções, e *Enterococcus faecalis*. E os isolados 34e e 47e foram escolhidos por apresentarem um amplo espectro de ação.

4.1.2 Triagem em caldo

Dos isolados de actinomicetos 2s, 3s, 34e e 47e selecionados pela triagem em placa e cultivados em caldo Amido Caseína, os actinomicetos 2s e 3s apresentaram maiores halos de inibição contra MRSA (em torno de 15 mm contra aproximadamente 10mm dos isolados 34e e 47e). Os isolados 2s e 3s já haviam apresentado maiores distâncias de inibição frente à bactérias Gram positivas na triagem em placas do que os isolados 34e e 47e, os quais apesar de apresentarem um espectro de ação mais amplo, produziram quantidade de antibióticos consideravelmente menor.

Em escala piloto, o meio Bennett propiciou uma produção de compostos antimicrobianos maior do que o meio Amido Caseína, o que era esperado porque o meio Amido Caseína é utilizado para crescimento de actinomicetos, então possui uma fonte de carbono facilmente utilizável, o amido, o que faz com que os actinomicetos cresçam rapidamente, mas não entrem no metabolismo secundário. Os isolados 2s e 3s apresentaram um comportamento bastante semelhante, com diferenças mínimas entre os halos

de inibição contra MRSA, 22 e 20mm, respectivamente. Mas nesse ponto do trabalho a proposta foi utilizar apenas um isolado para analisar a influência das condições de cultivo na produção de antibiótico. Então, mesmo com pouca diferença de produção, escolheu-se o isolado 2s. O dia no qual se observou maior produção de antibiótico foi o sétimo dia, em 14 dias foi observada uma leve perda na atividade, que foi evidenciada em 21 dias.

4.2 Análise da influência das condições de cultivo na produção de antibiótico

4.2.1 Comparação de cultivo estático e cultivo agitado

Este ensaio demonstrou que a cultura estática, cultivada a 30°C era capaz de produzir halos de inibição de 20mm contra MRSA já no primeiro dia de incubação. Nos cultivos em agitador rotatório, não se observou produção de compostos antimicrobianos durante esse período, independentemente dos meios empregados. Esse fato está de acordo com estudos feitos por Bushell e colaboradores (1997, 1999), que evidenciaram a hipótese de que a produção de antibióticos em culturas líquidas está correlacionado com o tamanho da hifa. Hifas menores que 88 µm crescem na mesma taxa que hifas maiores, mas são incapazes de produzir quantidades significativas de antibióticos. Esses pesquisadores postulam que o sítio de produção de antibiótico está localizado a uma distância fixa da ponta da hifa em crescimento e que, dependendo do tipo de agitação, as hifas podem quebrar-se, reduzindo a sua capacidade produtiva. Entretanto, esse mesmo grupo de pesquisadores afirma que a agitação do cultivo é importante para haver troca de oxigênio, pois culturas

“pelletizadas” freqüentemente não produzem antibióticos por causa da restrição na transferência de massa dentro dos “pellets”. Entretanto, pôde-se constatar na presente pesquisa que esta última afirmação não é regra, visto que o cultivo sem agitação mostrou-se mais eficiente para produzir compostos antimicrobianos em um período curto de incubação. A explicação para este fato pode estar justamente no fato de que a restrição na quantidade de oxigênio do meio leva o isolado a um estresse que o obriga a produzir mais antibiótico a fim de eliminar outros organismos que estariam competindo com ele para utilizar essa quantidade limitada de oxigênio.

No ensaio da melhor temperatura de cultivo com a cepa 2s verificou-se maior produção a 37°C do que a 27°C. Portanto, essa temperatura foi adotada para os cultivos posteriores. Tal resultado era esperado, visto que este actinomiceto foi isolado de uma leira de compostagem de lixo urbano que usualmente apresenta temperaturas próximas ou acima de 40°C.

4.2.2 Comparação entre diferentes meios de cultivo

Em relação à produção de compostos antimicrobianos, avaliada através dos halos de inibição produzidos no ensaio de antibiose frente à MRSA, observou-se diferentes padrões ao longo dos dias, como se pode observar na tabela 2. Somente o meio G, extrato de levedura, peptona e glicose, apresentou o mesmo padrão ao longo dos dias. Neste meio não foram observados halos de inibição contra MRSA em nenhum dos tempos analisados, indicando que neste meio não há produção de compostos antimicrobianos. Provavelmente, isso acontece por causa da presença da

glicose no meio, pois esta é uma fonte de carbono prontamente disponível, assim, com nutrientes em abundância, não há necessidade do microrganismo entrar em metabolismo secundário.

No primeiro dia de cultivo, os meios que propiciaram maior produção foram os meios InA e InB, com halos médios de 19,2mm e 19,8mm, respectivamente. Essa produção foi significativamente maior que a produção observada nos demais meios de cultivo. Nos meios LP, MB, MBA e G além dos extratos, ainda há a peptona, como fonte primordial de nitrogênio, fonte orgânica; e ela também pode fornecer carbono. Os meios InA e InB possuem como fonte principal de nitrogênio NO_3^- e NH_4^+ , respectivamente, ambos inorgânicos, indicando então que quando se utiliza fontes inorgânicas como fonte principal de nitrogênio ocorre uma produção mais rápida de compostos antimicrobianos, o que deve ser influenciado também pela menor quantidade de carbono desses meios visto que a peptona presente nos outros meios também pode fornecer certa quantidade de carbono.

No terceiro dia de cultivo, os meios com produção significativamente maior que os demais foram LP e MB com halos médios de 21,3mm e 22,2mm, respectivamente. O meio LP também apresenta maiores halos de inibição contra MRSA no sexto dia, 21,3mm. O padrão observado no nono dia de cultivo foi bem diferente dos dias anteriores: três meios, InB, MB e MBA apresentaram maior produção de compostos antimicrobianos que os demais, comportamento que foi semelhante ao décimo segundo dia. Finalmente, no décimo quinto dia, o meio de cultivo no qual se observou maiores halos de inibição foi o meio MBA, provavelmente, após o sexto dia de cultivo, o amido foi

consumido, diminuindo a quantidade de nutrientes disponíveis no meio e acelerando a produção de compostos antimicrobianos neste meio.

TABELA 2. Halos médios de inibição do isolado 2s frente à MRSA

Tempo (dias)	$\bar{X} \pm DP$	Meios de cultivo				
		G	InA	InB	LP	MB
1	0 c \pm 0	19,1 a \pm 4,2	19,8 a \pm 2,5	12,5 b \pm 7,1	14,3 ab \pm 6,9	7,8 b \pm 6,5
3	0 c \pm 0	14,7 b \pm 11,0	19,1 ab \pm 3,1	21,3 a \pm 6,2	22,2 a \pm 4,8	13,8 b \pm 2,3
6	0 d \pm 0	10,8 c \pm 8,6	15,7 b \pm 1,6	21,3 a \pm 3,2	19,2 ab \pm 4,3	13,9 bc \pm 2,3
9	0 c \pm 0	9,6 b \pm 9,3	16,1 a \pm 1,2	15,5 ab \pm 4,9	19,3 a \pm 6,0	18,3 a \pm 2,1
12	0 c \pm 0	10,8 b \pm 8,4	14,9 ab \pm 1,8	13,4 b \pm 6,6	17,8 a \pm 3,5	20,2 a \pm 1,7
15	0 d \pm 0	10,8 c \pm 8,2	15,6 bc \pm 1,5	16,1 b \pm 1,7	17,2 ab \pm 2,0	21,1 a \pm 3,1

Análise de variância feita através de teste de comparação múltipla de médias (Tukey). Médias não seguidas de mesma letra, na linha, diferem ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

\bar{X} = Médias, DP = desvio padrão

G= meio com extrato de levedura, peptona e glicose;

InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO₃ e sais;

InB= meio com extrato de levedura, extrato de carne, (NH₄)₂SO₄ e sais;

LP= meio com extrato de levedura e peptona; MB= meio Bennett;

MBA= Meio Bennett suplementado com Amido.

Fonte: Marcela Heck

Na análise de regressão, nenhuma se ajustou para os tempos independentemente do meio, o que indica que não há diferença significativa na produção ao longo do tempo. Embora se possa notar um pico de produção no terceiro dia de cultivo, a diferença entre a inibição verificada neste pico e os outros dias de cultivo não é significativa.

A partir destes resultados, pode-se concluir que a cepa estudada apresenta maior produção de compostos antimicrobianos quando se utiliza extratos como fonte de carbono, sem suplementação de carboidratos. Isso se explica, possivelmente, pela produção de antibióticos ocorrer quando há uma escassez nutricional, pois havendo carboidratos prontamente disponíveis no meio de cultivo, não há necessidade de competir com outros microrganismos. Apesar de que a função dos antibióticos na natureza ainda não está completamente entendida, acredita-se que ela aconteça para proteger os nutrientes disponíveis no ambiente dos outros organismos presentes nesse meio ambiente; assim, o organismo produtor do antibiótico pode aproveitar todos esses nutrientes sem disputá-los com os demais (CHATER, 2006).

Fgura (2005) avaliou a atividade antimicrobiana de seu isolado em meio Bennett suplementado com 1% das seguintes fontes de carbono: amido, frutose, glicerol, glicose e sacarose. Contrariamente ao presente estudo, ele obteve máxima atividade no meio suplementado com glicose. Zitouni (2005) testou o meio ISP2 (1% de extrato de malte, 0,4% de extrato de levedura e 0,4% de glicose); e o meio sintético SM (NaCl 2g/L; K_2HPO_4 1g/L; ; KH_2PO_4 0,5 g/L, MgSO_4 0,2g/L), utilizando como fonte de nitrogênio NaNO_3 2g/L ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, e como fonte de carbono glicose (0,5%), amido (0,5%) ou extrato de levedura (0,3%). A melhor produção foi obtida no meio sintético. Para o isolado 2s quando se utilizou meios semelhantes ao meio sintético utilizado por Zitouni (meios InA e InB), a produção de compostos antimicrobianos foi mais rápida que nos demais meios testados. Quanto às fontes de carbono testadas por Zitouni, o amido foi a melhor, no entanto a

produção foi acentuada com a adição de extrato de levedura, diferente do presente estudo no qual a adição de amido retarda a produção de compostos de antimicrobianos.

Outro pesquisador, Sujatha (2005), também utilizou o meio inorgânico de sais como base de estudo para diferentes fontes de carbono e nitrogênio e obteve a máxima produção de antibióticos utilizando glicose, como fonte de carbono e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.

Através desses dados, podemos notar que o isolado 2s apresenta um comportamento peculiar quanto às fontes de carbono, pois produziu maiores halos de inibição quando cultivado somente utilizando extratos, sem a utilização de carboidratos nos meios de cultivo.

Podemos notar através dos valores de pH que no meio contendo glicose como suplemento no meio Bennett, estes valores foram significativamente mais baixos que os valores dos demais meios testados ao longo do tempo. Provavelmente isso ocorre devido à abundância de glicose e assim o actinomiceto segue a rota de Embden-Meyerhof, através da qual a glicose é convertida em ácido pirúvico; não havendo a necessidade de ativar rotas secundárias. Assim, o declínio do pH é decorrente da produção de ácidos orgânicos no meio de cultivo.

Os meios MBA e G têm comportamento similar (paralelo) ao longo do tempo e apresentam valores significativamente mais baixos do que os demais meios testados. O meio MBA apresenta valores de pH significativamente menores que os meios InA, InB, LP e MB, mas significativamente maiores que os valores de pH observados no meio G.

Os outros quatro meios também têm um comportamento paralelo entre si, apresentando valores mais altos de pH que os meios G e MBA.

Os meios LP, MB e InA apresentam sempre os maiores valores de pH, seguidos dos meios, InB, MBA e G (tabela 3), porém, os dois últimos com valores significativamente mais baixos que os anteriores.

Não houve diferença significativa entre as médias de meios LP e MB dentro de cada tempo; mas nos outros meios houve diferença em pelo menos um dos tempos observados, o que se pode verificar na tabela 3 a seguir.

TABELA 3. pH médio dos meios de cultivo com o actinomiceto 2s ao longo do tempo

Tempo (dias)	Meios de cultivo					
	G	InA	InB	LP	MB	MBA
1	5,48 c ± 0,24	7,80 a ± 0,29	7,49 ab ± 0,43	7,77 a ± 0,09	7,69 a ± 0,27	6,80 b ± 0,14
3	4,89 d ± 0,07	8,33 a ± 0,09	7,94 b ± 0,09	8,41 a ± 0,18	8,39 a ± 0,20	5,90 c ± 0,03
6	4,80 d ± 0,06	8,07 a ± 0,11	7,63 b ± 0,12	8,32 a ± 0,07	8,32 a ± 0,06	5,66 c ± 0,10
9	4,76 d ± 0,11	8,03 a ± 0,09	7,39 b ± 0,04	8,49 a ± 0,06	8,38 a ± 0,16	5,9 c ± 0,27
12	4,68 c ± 0,03	7,90 a ± 0,04	7,09 b ± 0,16	8,24 a ± 0,11	8,21 a ± 0,02	6,28 b ± 1,18
15	4,68 c ± 0,06	7,70 ab ± 0,11	6,95 ab ± 0,08	8,01 a ± 0,31	7,90 a ± 0,14	6,61 b ± 1,07

Análise de variância feita através de teste de comparação múltipla de médias (Tukey). Médias não seguidas de mesma letra, na linha, diferem ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

\bar{X} = Médias, DP = desvio padrão

G= meio com extrato de levedura, peptona e glicose;

InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO₃ e sais;

InB= meio com extrato de levedura, extrato de carne, (NH₄)₂SO₄ e sais;

LP= meio com extrato de levedura e peptona; MB= meio Bennett;

MBA= Meio Bennett suplementado com Amido.

Fonte: Marcela Heck

Em relação à massa seca há um comportamento diferenciado do meio MBA em relação aos outros cinco meios, o que fica evidente na figura 2.

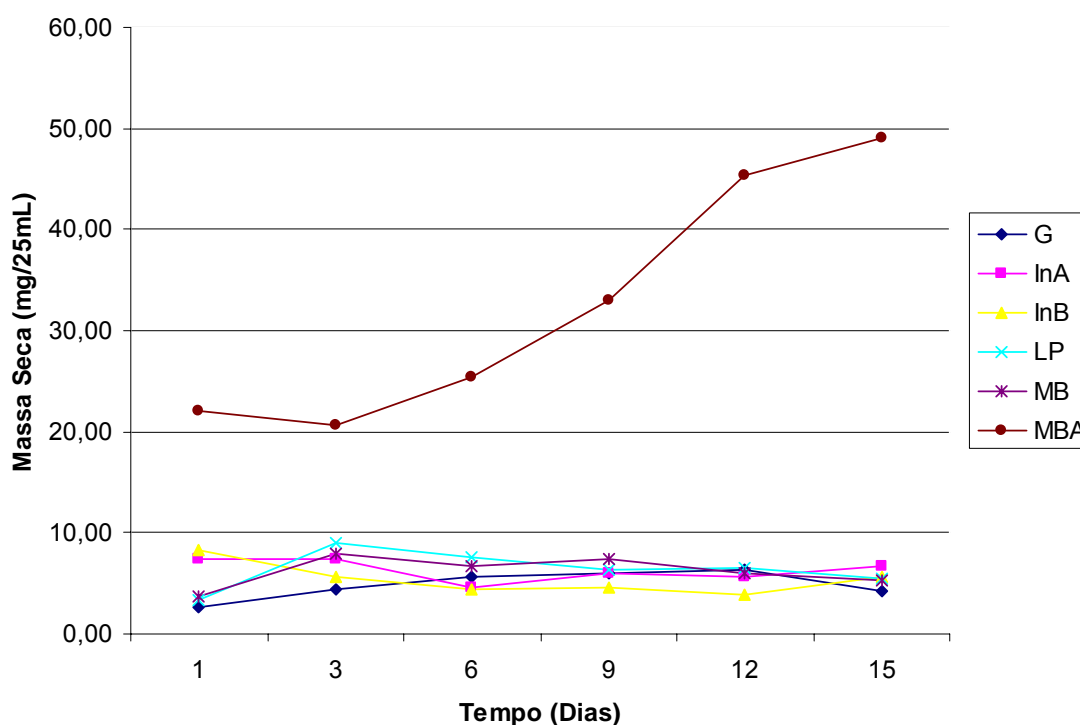


FIGURA 2. Gráfico da variação da massa seca do actinomiceto 2s ao longo do tempo

G= meio com extrato de levedura, peptona e glicose;

InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO_3 e sais;

InB= meio com extrato de levedura, extrato de carne, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sais;

LP= meio com extrato de levedura e peptona; MB= meio Bennett;

MBA= Meio Bennett suplementado com Amido.

Fonte: Marcela Heck

A massa seca dos cinco meios não se altera significativamente ao longo do tempo, enquanto que o meio MBA demonstra um comportamento crescente a partir do terceiro dia. O actinomiceto estudado apresentou uma taxa de crescimento (valor de massa seca) significativamente maior no meio MBA do que nos outros meios testados. A tabela 4 apresenta a média dos

valores de massa seca com os respectivos desvios e a análise de variância segundo Tukey.

TABELA 4. Massa seca do actinomiceto 2s ao longo do tempo.

Tempo (dias)	$\bar{X} \pm DP$					
	Meios de cultivo					
	G	InA	InB	LP	MB	MBA
1	2,7 a ± 1,5	7,3 a ± 1,2	8,3 a ± 0,3	3,3 a ± 0,6	3,7 a ± 3,1	17,0 b ± 8,7
3	4,3 a ± 1,5	7,3 a ± 2,5	5,7 a ± 1,5	9,0 a ± 1,0	8,0 a ± 2,0	20,7 b ± 2,1
6	5,7 a ± 1,5	4,7 a ± 1,2	4,3 a ± 0,8	7,7 a ± 0,6	6,7 a ± 2,9	25,3 b ± 7,6
9	6,0 a ± 2,6	6,0 a ± 1,7	4,7 a ± 1,5	6,3 a ± 1,5	7,3 a ± 2,0	25,3 b ± 7,6
12	6,3 a ± 1,5	5,7 a ± 2,1	3,8 a ± 0,3	4,7 a ± 3,2	6,0 a ± 3,0	33,0 b ± 7,2
15	4,2 a ± 1,0	6,7 a ± 2,3	5,7 a ± 2,3	5,5 a ± 1,3	5,3 a ± 2,9	49,0 b ± 9,6

Análise de variância feita através de teste de comparação múltipla de médias (Tukey). Médias não seguidas de mesma letra, na linha, diferem ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

\bar{X} = Médias, DP = desvio padrão

G= meio com extrato de levedura, peptona e glicose;

InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO_3 e sais;

InB= meio com extrato de levedura, extrato de carne, $(NH_4)_2SO_4$ e sais;

LP= meio com extrato de levedura e peptona; MB= meio Bennett;

MBA= Meio Bennett suplementado com Amido.

Fonte: Marcela Heck

A produção de metabólitos secundários acontece normalmente em determinada fase de crescimento ou sob condições especiais de crescimento não relacionadas com sua taxa máxima. Os metabólitos secundários não são necessários para o crescimento vegetativo em condições de abundância de nutrientes, entretanto, podem auxiliar em situações de escassez nutricional e de competição (VINING, 1986).

4.3. Morfologia

O isolado 2s inicia a formação de hifas visíveis a partir de 36 horas de crescimento. O micélio aéreo apresenta coloração branca, assim como o micélio vegetativo, mas este último pode escurecer ao longo do tempo tomando uma coloração cinza escuro. Nos meios Amido Caseína e Czapeck-Dox, o isolado não apresenta pigmentos difusíveis (FIGURA 3).



FIGURA 3. Morfologia do isolado 2s. Cultivo em Agar Amido Caseína

Através do microcultivo, verificou-se a formação de cadeias de esporos com 3 a 10 esporos. A forma da cadeia de esporos observada foi classificada como biverticulada. Um exemplo importante de actinomiceto que apresenta este tipo de esporo é *Streptomyces verticillus*, que produz a

bleomicina, um antibiótico da família dos glicopeptídeos utilizado no tratamento de muitas neoplasias (SUGYIAMA e KUMAGAI 2002).

4.4 Avaliação do espectro de ação

Não foi observada atividade contra as leveduras: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* CBS 2001 e *Candida tropicalis* CBS 94 em nenhum dos meios testados. Contra as bactérias Gram negativas testadas (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 25133 e *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028), também não foi detectada nenhuma atividade, nas condições de cultivo testadas.

Finalmente, registrou-se atividade antimicrobiana contra todas as bactérias Gram positivas testadas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953. Porém, não foi detectada atividade no meio G. Os halos produzidos foram de 18 a 25 mm.

Como mencionado anteriormente, muitos outros estudos demonstram que a atividade antimicrobiana mais marcante dos actinomicetos ocorre contra bactérias Gram positivas. Embora na maioria dos estudos se faça uso de carboidratos, como a glicose, como fonte de carbono; no presente trabalho não foi observada atividade antimicrobiana no meio que foi suplementado com glicose, mas sim quando utilizou-se extratos.

A tabela a seguir apresenta o tamanho dos halos de inibição produzidos.

TABELA 5. Média dos halos de inibição, em mm, contra as bactérias alvo

Bactéria	Meio	MB	MBA	LP	InA	InB	G
<i>B.stearotermophilus</i>		24,5	22	24	21	19,5	0
<i>E. faecalis</i>		22	20	22,5	20,5	16	0
<i>S.epidermidis</i>		25	20	24	21	18	0

G= meio com extrato de levedura, peptona e glicose;

InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO₃ e sais;

InB= meio com extrato de levedura, extrato de carne, (NH₄)₂SO₄ e sais;

LP= meio com extrato de levedura e peptona; MB= meio Bennett;

MBA= Meio Bennett suplementado com Amido.

Fonte: Marcela Heck

As figuras 4, 5 e 6 apresentam as fotos da inibições positivas dos meios InA, InB, LP e MB contra as bactérias Gram positivas

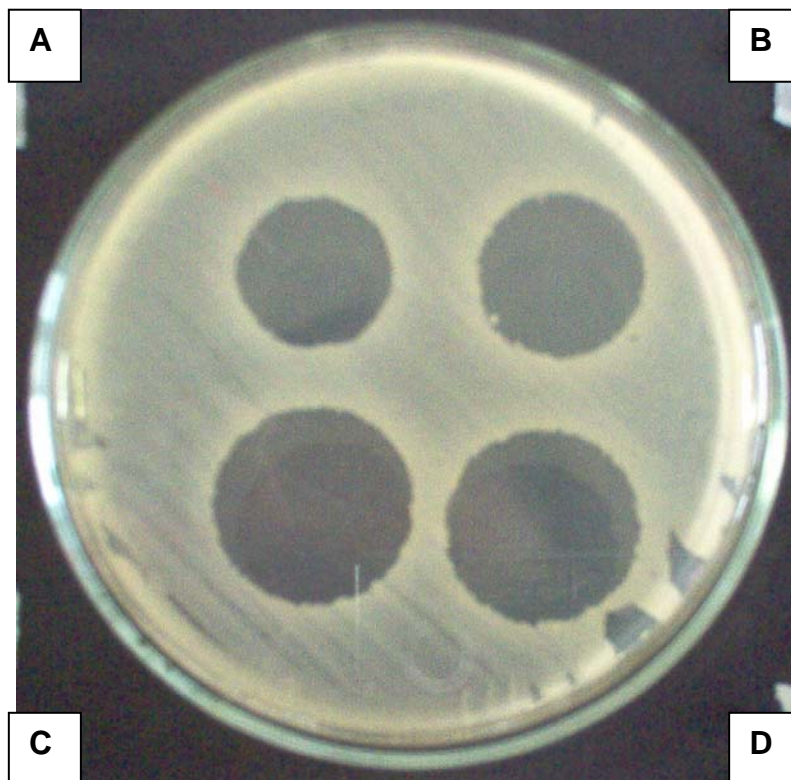


FIGURA 4. Inibição frente *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953

Filtrados com 3 dias de cultivo nos meios: A: InB meio com extrato de levedura, extrato de carne, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sais; B: InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO_3 e sais; C: LP= meio com extrato de levedura e peptona; D: MB= meio Bennett.

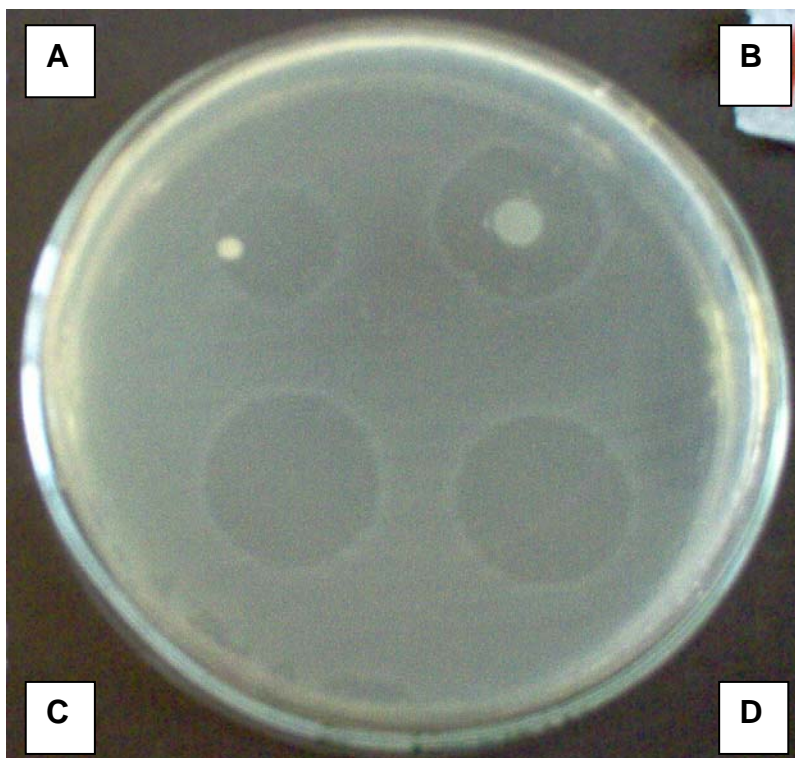


FIGURA 5. Inibição frente *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Filtrados com 3 dias de cultivo nos meios: A: InB meio com extrato de levedura, extrato de carne, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sais; B: InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO_3 e sais; C: LP= meio com extrato de levedura e peptona; D: MB= meio Bennett.

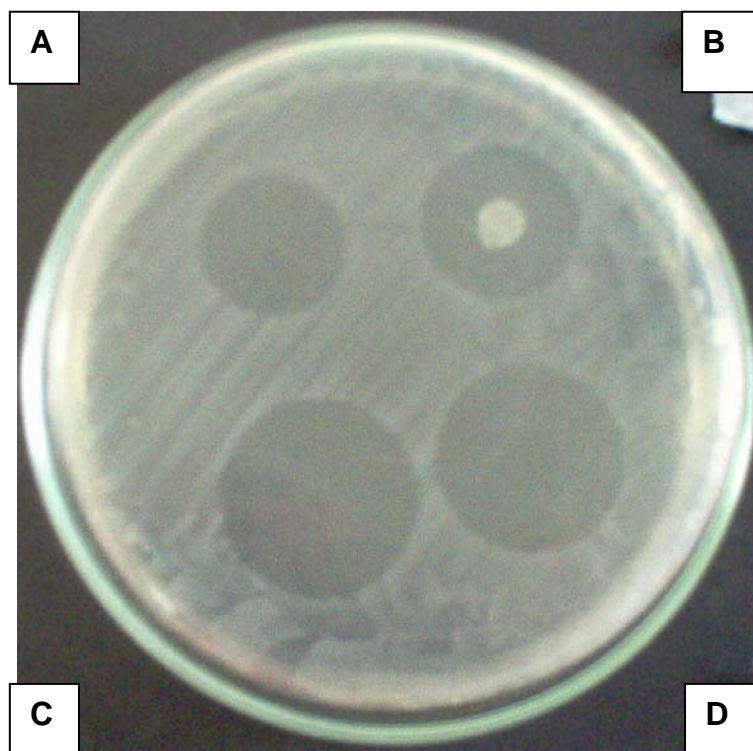


FIGURA 6. Inibição frente *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Filtrados com 3 dias de cultivo nos meios: A: InB meio com extrato de levedura, extrato de carne, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sais; B: InA= meio com extrato de levedura, extrato de carne, KNO_3 e sais; C: LP= meio com extrato de levedura e peptona; D: MB= meio Bennett.

4.5 Separação do composto

A maioria dos sistemas solventes testados apresentou um número de bandas semelhantes em ambos os comprimentos de onda. A 254 nm era visível uma banda no ponto de aplicação e outra no final da corrida, porém, em alguns sistemas foi observado arraste; em 365nm observou-se duas bandas fluorescentes. A distância dessas bandas variava conforme o sistema utilizado.

O melhor sistema solvente testado foi clorofórmio, etanol e água na proporção de 8:5:1, respectivamente. Neste sistema as duas bandas fluorescentes foram totalmente separadas, com Relação de frente (Rf) de

aproximadamente 0,70 e 0,20. Rf é distância do ponto de aplicação até a banda, dividida pela distância entre o ponto de aplicação e o ponto final da corrida do solvente.

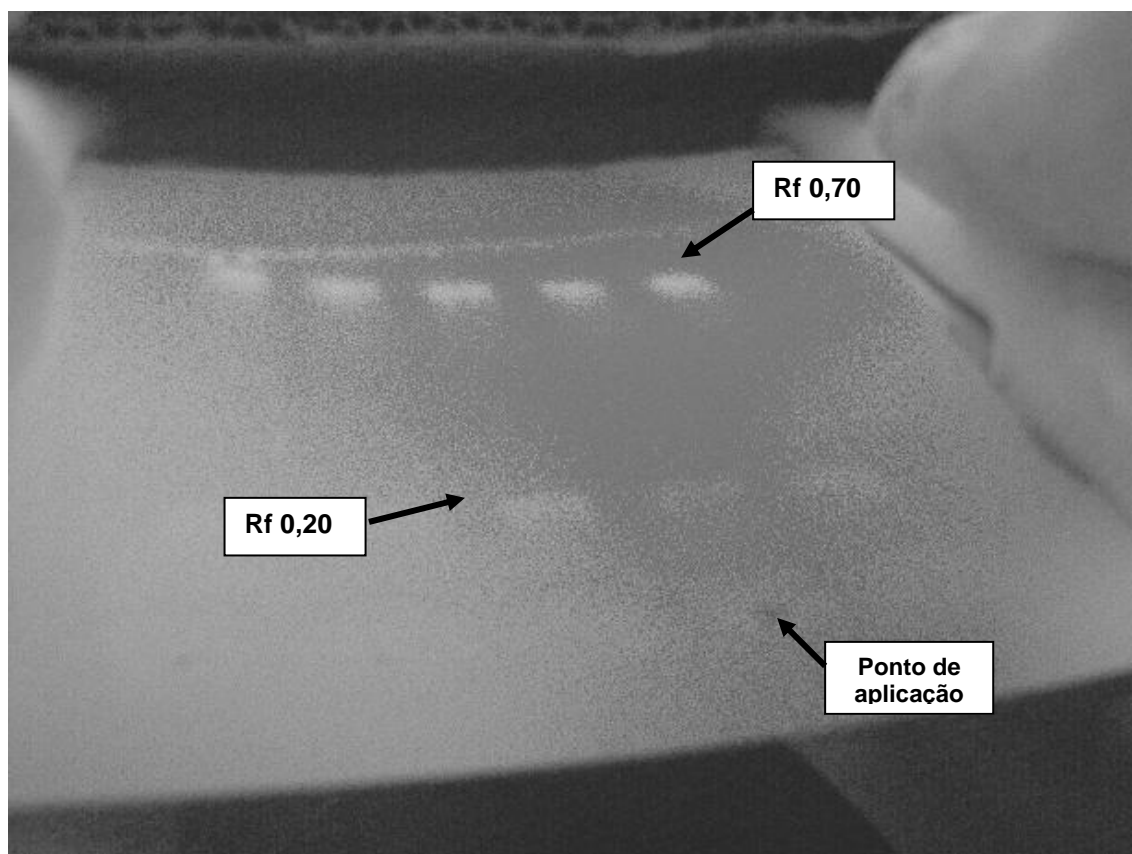


FIGURA 7. Cromatografia em Camada Delgada do filtrado do cultivo do isolado de actinomiceto 2s contendo o composto antibiótico produzido
Sistema solvente: clorofórmio/etanol/água 8:5:1. Leitura em 365nm.

4.6 Autobiografia

A banda que foi capaz de inibir o crescimento de MRSA foi aquela com Rf de 0,70

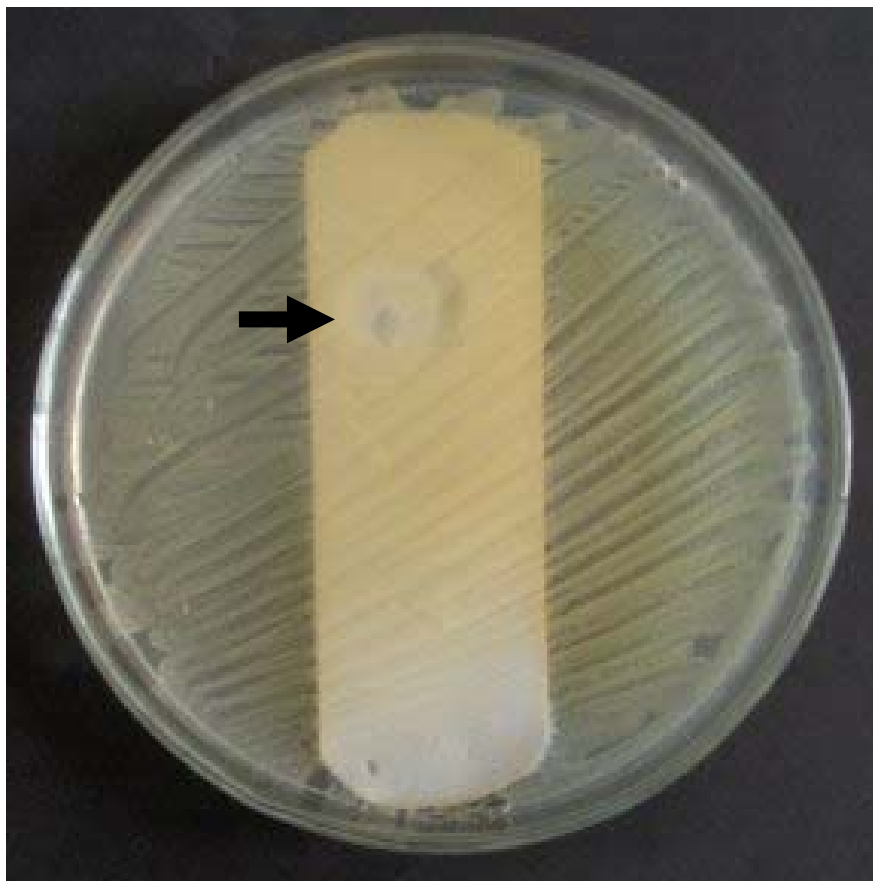


FIGURA 8. Autobiografia da CCD aplicada no sistema clorofórmio/etanol/água 8:5:1. A seta indica a zona de inibição contra MRSA

4.7 Purificação parcial do composto

Dois dos solventes testados foram eficientes para extrair o composto antimicrobiano da sílica, são eles: álcool etílico e álcool metílico. Devido à toxicidade do álcool metílico, adotou-se o álcool etílico para a extração do composto. Após a secagem, o composto apresentou uma cor amarela alaranjada, variando conforme a sua concentração.

4.8 Identificação parcial do composto

4.8.1 Coloração de CCD

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

TABELA 6. Resultado dos testes de coloração em CCD

Classe	Antimicrobiano	Reativo			
		FeCl ₃	Ninhidrina	Dragendorff	Anisalaldeído
Aminoglicosídeo	Gentamicina	-	+	-	+
	Neomicina	nd	+	-	+
Macrolídeo	Eritromicina	-	-	-	+
Polipeptídeo	Bacitracina	nd	+	+	-
	Polimixina B	nd	+	+	+
β-lactâmico	Amoxicilina	nd	+	-	+
	Cefalexina	nd	+	-	+
Glicopeptídeo	Vancomicina	nd	+	-	+
Tetraciclina	Tetraciclina	+	-	+	+
Ansamida	Rifampicina	+	-	+	+
Azólico	Cetoconazol	nd	-	+	-
Quinolona	Norfloxacino	nd	+	+	-
?	Composto	-	-	-	-
	Desconhecido				

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Nd: não determinado

Fonte: Marcela Heck

As conclusões as quais se pode chegar com estes testes são que o composto desconhecido não possui hidroxilas fenólicas, devido à negatividade do teste com cloreto férrico; não possui grupamentos amina livre, negativo para o teste com ninhidrina; não possui uma estrutura característica de alcalóide,

negativo para Draggendorff e, não pode ser considerado estruturalmente semelhante aos antibióticos testados que reagiram positivamente a esse teste e ao teste com anisaldeído, ou seja, todos os demais antibióticos testados.

As figuras 9, 10 e 11 mostram as fotos dos testes de coloração com Ninhidrina, Draggendorff e Anisaldeído, respectivamente.

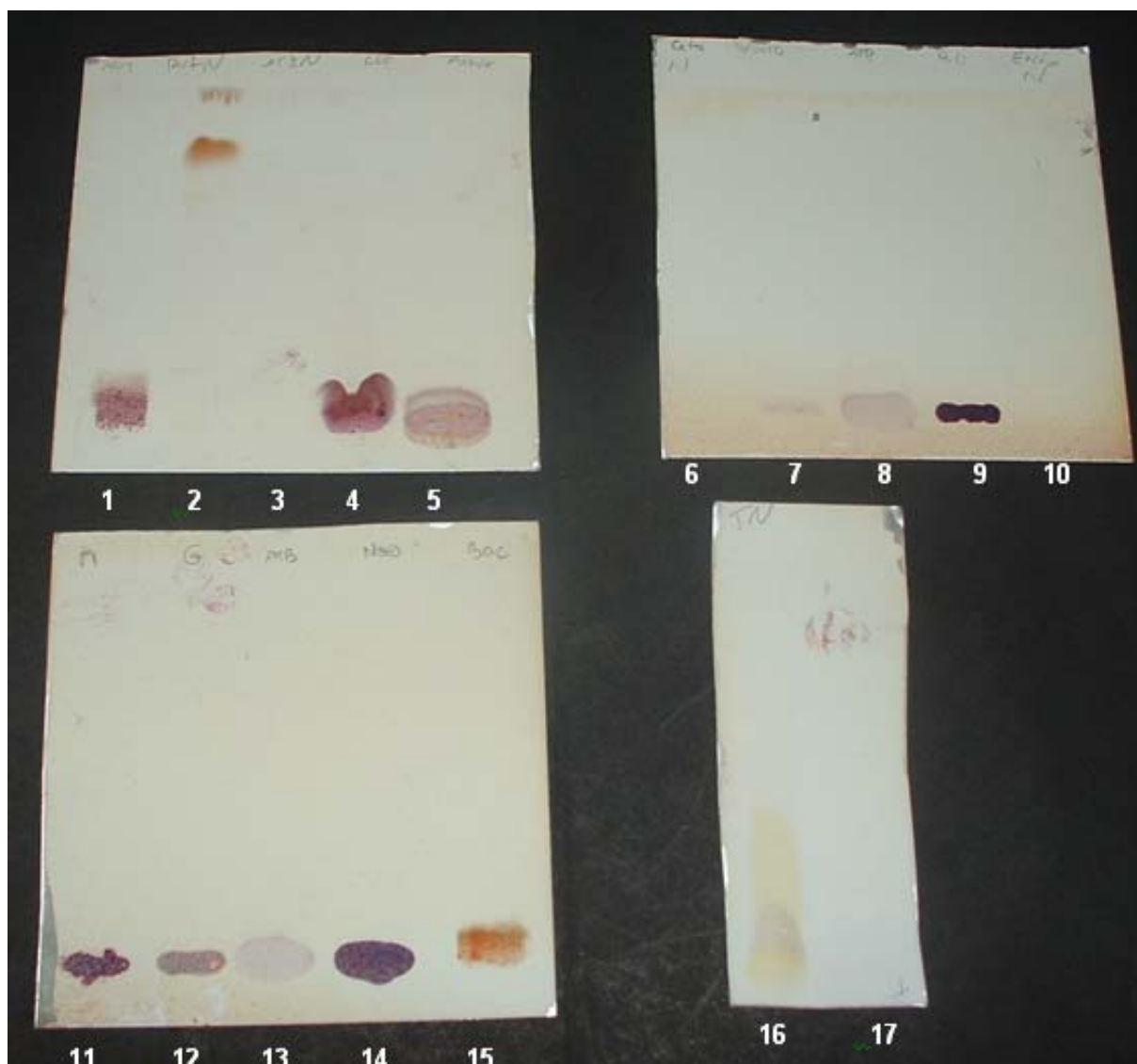


FIGURA 9. Resultado da coloração com Ninhidrina

Os números indicam o ponto de aplicação de cada antimicrobiano. 1- Norfloxacino; 2- Rifampicina; 4-Cefalexina; 5- Amoxicilina; 6- Cetoconazol; 7- Vancomicina; 9- Polimixina B;10- Eritromicina; 11- Amicacina, 12-Gentamicina, 14- Neomicina, 15-Bacitracina;16- Tetraciclina; 3, 8, 13, 17- Composto produzido peloactinomiceto 2s.

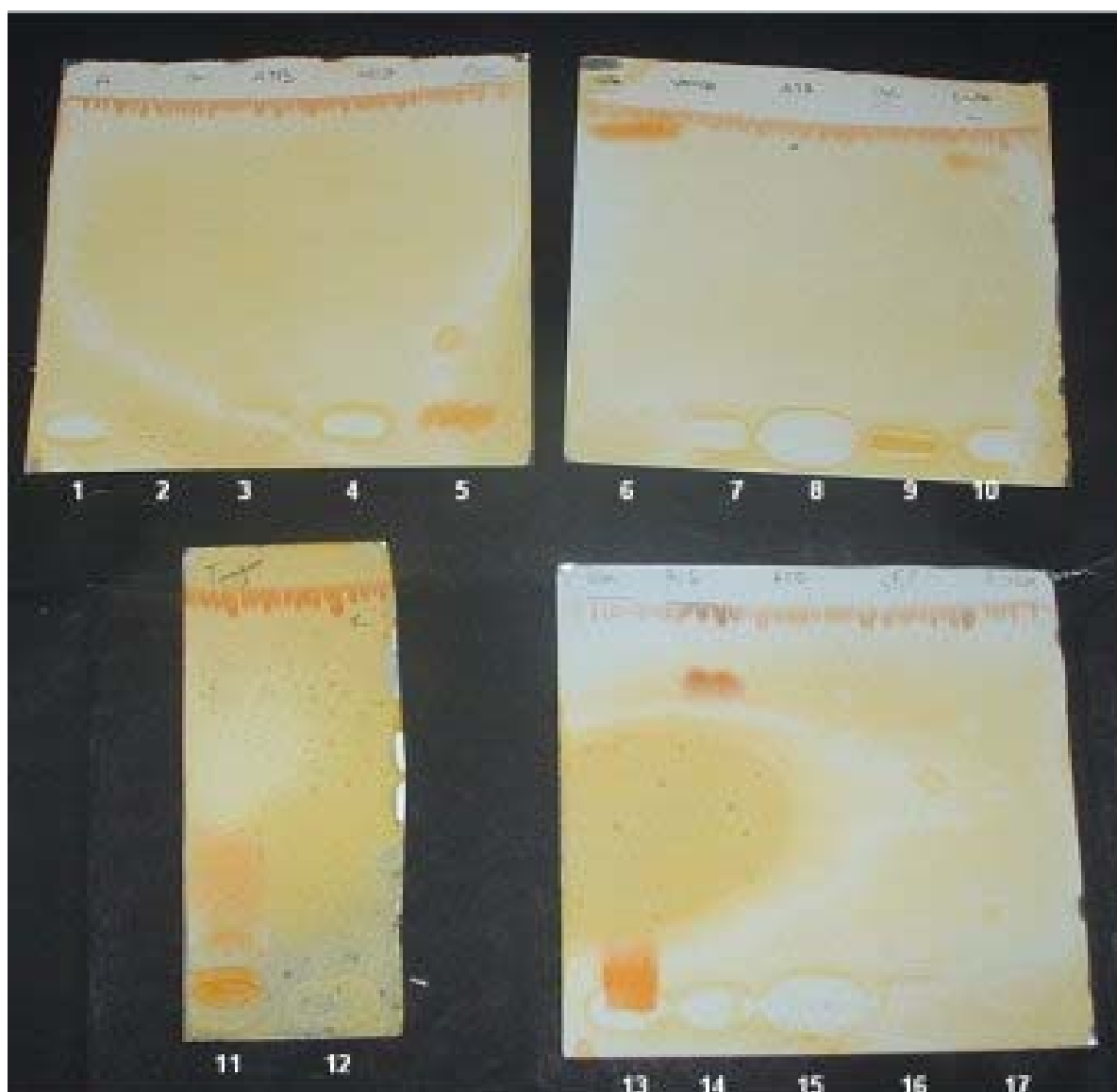


FIGURA 10. Resultado da coloração com o reativo de Dragendorff

Os números indicam o ponto de aplicação de cada antimicrobiano. 1- Amicacina, 2- Gentamicina, 4- Neomicina, 5- Bacitracina; 6- Cetoconazol, 7- Vancomicina, 9- Polimixina B; 10- Eritromicina; 11- Tetraciclina; 13- Norfloxacino; 14- Rifampicina; 16- Cefalexina; 17- Amoxicilina; 3, 8, 12, 15- Composto produzido pelo actinomiceto 2s.



FIGURA 11. Resultado da coloração com Anisaldeído

Os números indicam o ponto de aplicação de cada antimicrobiano. 1- Amicacina, 2- Gentamicina, 4- Neomicina, 5- Bacitracina; 6- Norfloxacino; 7- Rifampicina; 9- Cefalexina; 10- Amoxicilina; 11- Tetraciclina; 13- Cetoconazol, 14- Vancomicina, 16- Polimixina B; 17- Eritromicina; 3, 8, 12, 15- Composto produzido pelo actinomiceto 2s.

4.8.2. Determinação do pH

O pH do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s encontrado foi 7,0.

O pH 7,0 se refere a uma solução na qual a concentração de íons H^+ é igual a $1,0 \times 10^{-7}$ molar. Nesta solução não há uma quantidade de íon de OH^- superior à de H^+ , nem vice-versa. Assim, não se caracteriza nem o caráter básico, nem o caráter ácido do composto.

4.8.3 Espectroscopia

Na espectroscopia de Infra-Vermelho obteve-se o seguinte espectro (figura 12):

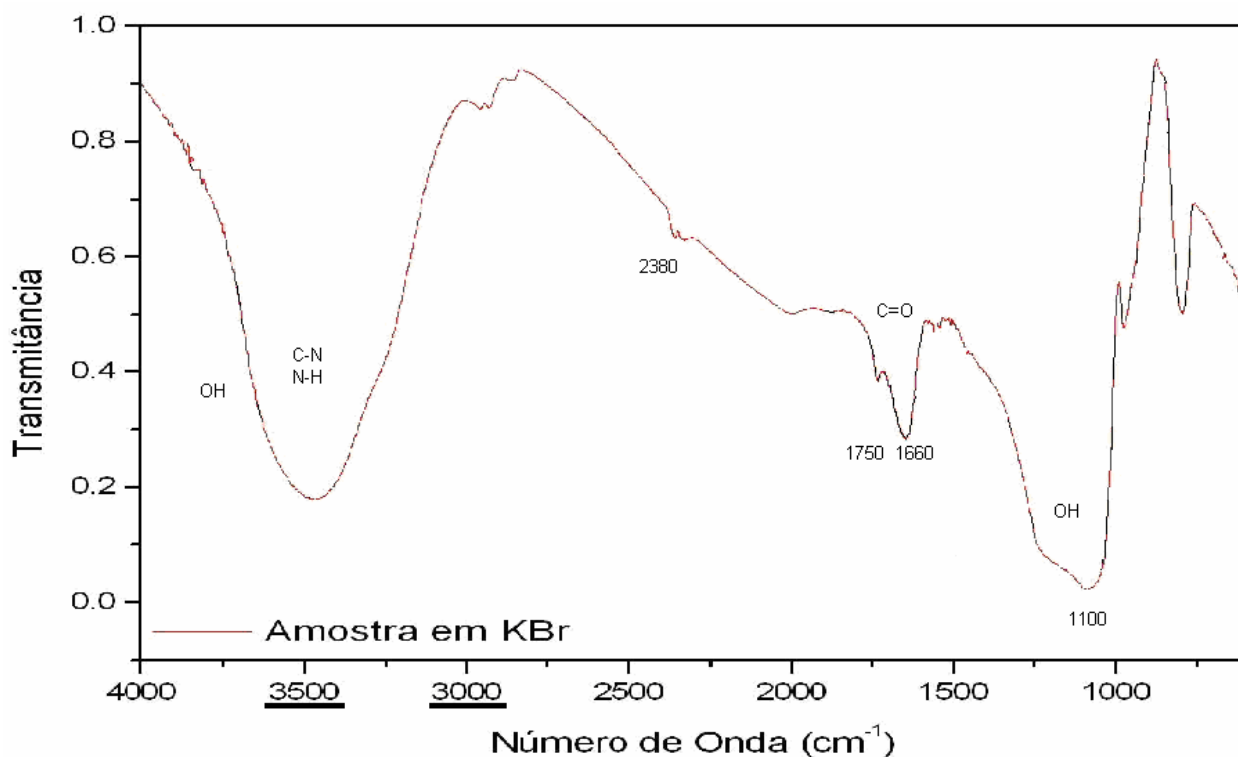


FIGURA 12. Espectro de IV do composto antimicrobiano produzido pelo actinomiceto 2s e separado por CCD

As bandas principais estão localizadas aproximadamente em 3500, 1750-1660 e 1100 cm^{-1} . Também se pode observar uma banda nítida por volta de 800 cm^{-1} , e pequenos picos em 980, 1750, 2380, 2950 e em 3000 cm^{-1} . As bandas mais importantes estão destacadas na figura, com os respectivos grupos funcionais responsáveis pelo pico.

Com estas informações podemos concluir que há a presença de hidroxilas livres, cujas bandas aparecem entre 3650 e 3584 (largas) e também entre 1300 e 1000 (deformação angular). Podemos concluir também que está presente o grupamento amida, visto que este grupo apresenta duas bandas características: a banda I, proveniente da ligação C=O encontrada em torno de 1680 e 1630, em amidas terciárias e em 1650 – 1515 em amidas primárias e

secundárias; e a banda II correspondente à ligação N-H, localizada por volta de 3300. A ligação C-N é encontrada entre 3500 e 3100.

Anéis heteroaromáticos com ligações do tipo N-H também podem estar presentes, visto que estes compostos apresentam bandas em 3550–3220 cm^{-1} , devido às ligações N-H; e 1600-1300 cm^{-1} pelo alongamento do anel. Grupos pirrol e indol apresentam sua banda mais característica ao redor de 3495. Iminocarbonatos, imins, compostos com RCH=NR e C=N apresentam bandas entre 1689 e 1471 cm^{-1} .

Ainda pode-se concluir que há um anel com um heteroátomo muito semelhante a este:

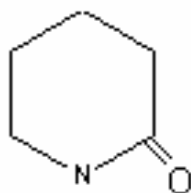


FIGURA 13. Anel de massa 99, com heteroátomo e pico de absorção em IV em 1690 nm

Pois este anel apresenta um pico em 1690 nm, e esse pico está presente no espectro de IV do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s.

O espectro de UV (Figura 14) produziu um espectro com três picos máximos de intensidade relevante: em 276 nm, em 308 e 316 nm.

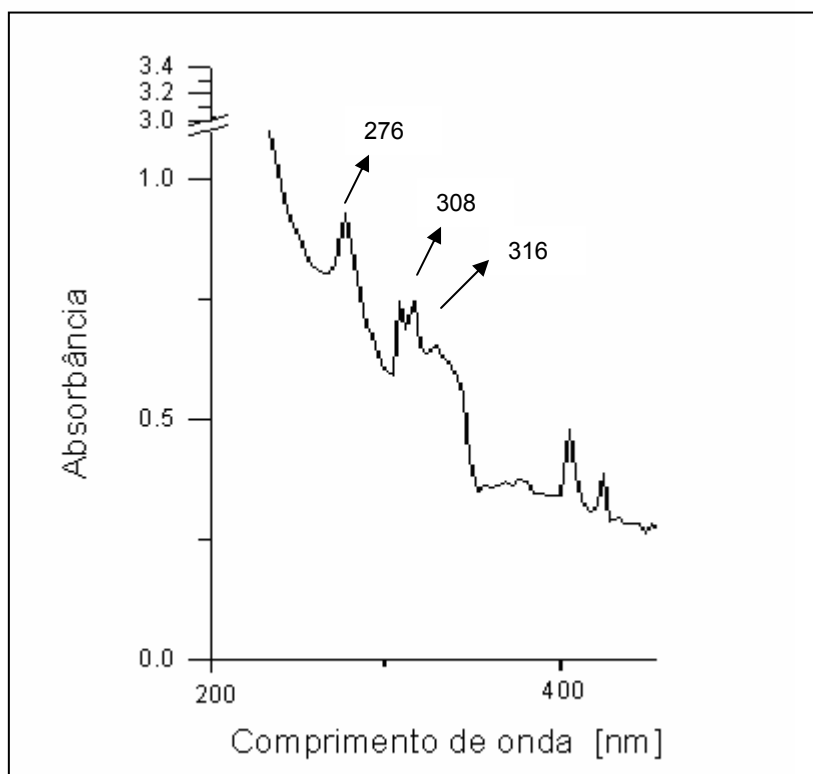
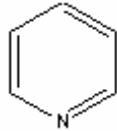
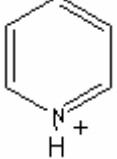
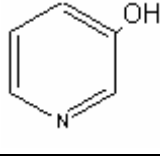
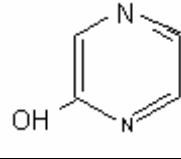
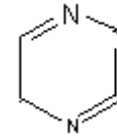
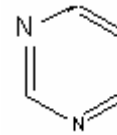
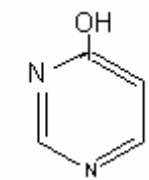


FIGURA 14. Espectro de UV do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s e separado por CCD

Comparando as bandas obtidas com as bandas do espectro de UV podemos concluir que o composto analisado apresenta ciclos heteroaromáticos com nitrogênio. A tabela 7 apresenta diversos ciclos heteroaromáticos com nitrogênio, os quais apresentam picos máximos de UV próximo à região na qual o composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s apresentou maior absorção: 276, 308 e 316 nm.

TABELA 7. Ciclos heteroaromáticos e suas respectivas absorções no espectro de UV.

Estrutura do composto	λ max (nm)	Massa
Hidroxipiridina		
	195 – 251 - 270	79
	256	80
 pH 6,8	246 – 278 - 315	96
Pirazinas		
 pH 5,0	221 - 317	96
	327 - 260	80
Pirimidinas		
	271 - 243	80
	223 - 260	96
Iminas		
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{NH}$	265	59. 37,5

Fonte: CAMPOS, 1977; SCOTT, 1964; SILVERSTEIN, 1974.

Deve-se levar em consideração que os comprimentos de onda de máxima absorção dependem também dos radicais ligados ao núcleo cromóforo do composto. Assim, um mesmo núcleo cromóforo pode apresentar picos em maiores ou menores comprimentos de onda do que núcleos cromóforos idênticos, dependendo do efeito exercido pelos seus ligantes.

Comparando-se os espectros de UV e IV obtidos com o banco de espectro: *UV and IR Spectra of Some Important Drugs* (DIBBERN, 1978) observa-se uma grande similaridade com os espectros do antimicrobiano Bleomicina (Figura 15), de massa 1415,56. Considerando que este composto é produzido por uma bactéria do gênero *Streptomyces*, pode-se sugerir que o antibiótico produzido pelo isolado 2s possua estrutura similar com a bleomicina, em cuja molécula possui vários ciclos heteroaromáticos com nitrogênio.

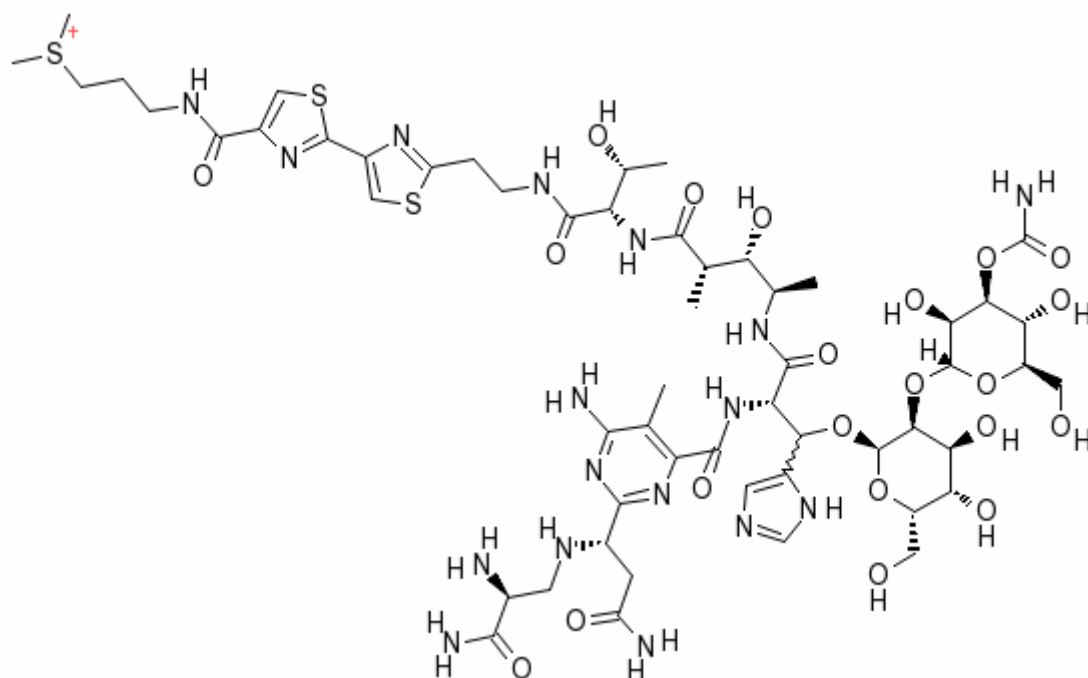


FIGURA 15. Estrutura química do composto antitumoral Bleomicina

A espectroscopia de massas gerou vários íons abundantes, no experimento de Q1 MS - análise de massas sem fragmentação, como se pode ver no espectro a seguir (figura 16).

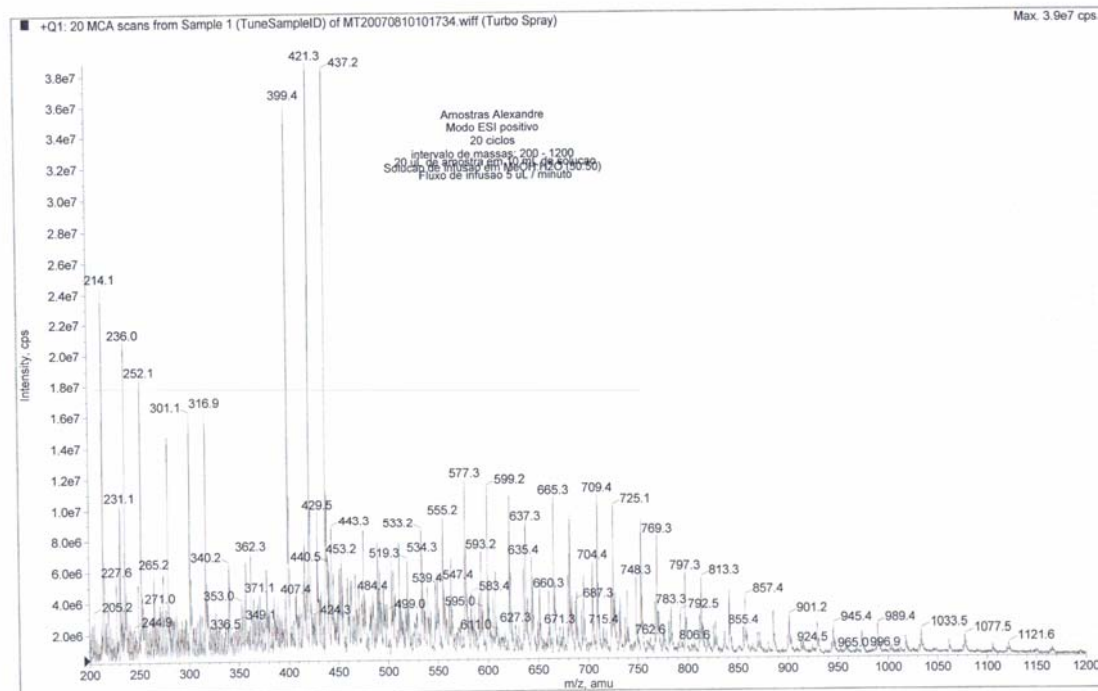


FIGURA 16. Espectro de massas do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s.

Os íons gerados foram os seguintes: 437,2; 421,3; 399; 299; 199; 99; 57; e outros picos de massas maiores, mas de baixa intensidade, que podem ou não fazer parte da molécula, pois não se pode afirmar que o composto antimicrobiano separado por CCD esteja completamente puro.

Abaixo se encontra o espectro do fragmento 399 (FIGURA 17).

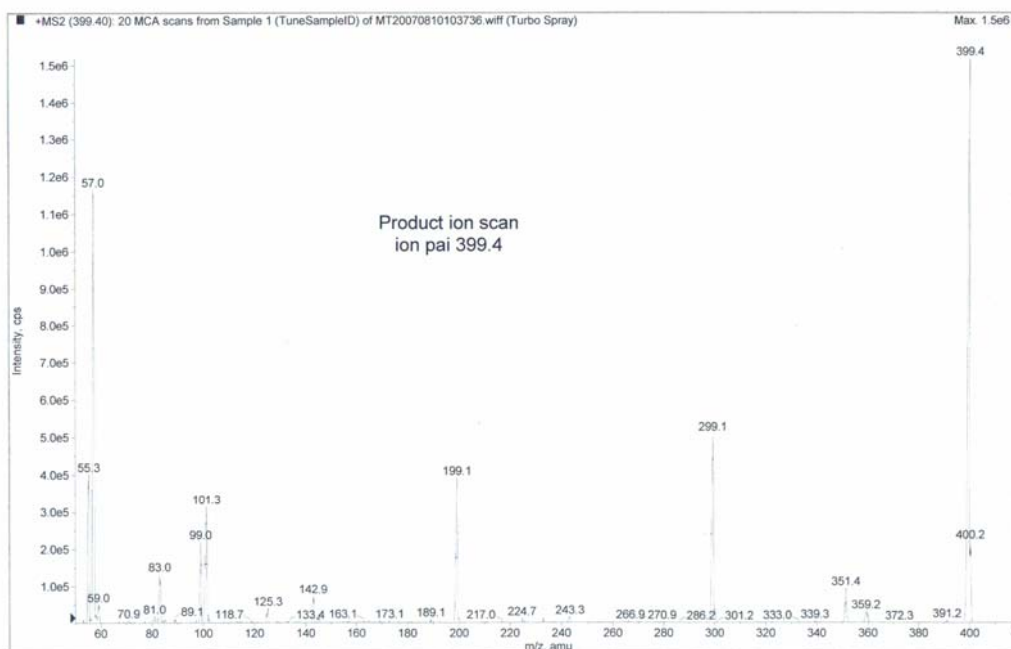


FIGURA 17. Espectro de massas do fragmento 399

O íon selecionado do experimento Q1 MS, de massa 399, gerou os seguintes fragmentos: 399; 299; 199; 101; 99; 83; 57; e 55. As transições foram comprovadas utilizando experimentos de íon precursor, onde se verifica o íon pai (399) a partir de um íon filho selecionado. Todas as transições foram confirmadas como originadas do íon de massa 399. O próprio íon 399 não apresentou íon precursor no intervalo de massa estudado.

Pelo perfil de fragmentação, a molécula que foi fragmentada perde três unidades de massa de 100 u.m.a até chegar a um núcleo de

massa 57 que não gerou fragmentos de intensidade relevante nas condições do experimento.

O espectro de massas vem ao encontro das informações anteriores quanto à presença de um heterociclo com nitrogênio. Encontra-se a massa 99, que pode corresponder à massa da N-ciclopentamida (FIGURA 13). A diferença das massas 83 e 57 gera um fragmento de 16, que pode ser devido à perda de um oxigênio. Diferenças de massa iguais a 100 pode indicar também a presença de algum açúcar, mas para poder afirmar-se isso é necessário lançar mão de outras técnicas de via úmida para identificação de açúcares, visto que a espectroscopia não é capaz de evidenciar a presença de tais grupos. No entanto, há mais indícios de que a massa de 100 seja um núcleo semelhante à N-ciclopentamida, com substituição de um carbono do ciclo por um nitrogênio, que resulta em massa de 100 u.m.a.

Mesmo que o maior pico obtido do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s apresentado no espectro de massas seja de 437,2 e esta massa seja muito inferior que a da bleomicina (FIGURA 15), há a possibilidade desse ter perdido grupamentos facilmente fragmentáveis pela força aplicada durante a ionização no espectrômetro de massas. Então, a massa total do composto desconhecido pode ser superior ao pico máximo de 437,2. Além disso, o composto pode apresentar grupamentos semelhantes à bleomicina (núcleos

heteroaromáticos), mas ter uma estrutura menor, sem a presença dos aminoácidos que compõe a bleomicina, visto que o teste de coloração com a ninhidrina deu resultado negativo.

5. CONCLUSÕES

1. Dos vinte e quatro isolados de actinomicetos testados, dez apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas.
2. O isolado 2s foi o melhor produtor de antibióticos contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina nas condições testadas, cultivo estático a 37°C.
3. A presença de extrato de levedura mais peptona, e extrato de levedura mais peptona com extrato de carne, nos meios de cultivo, influencia positivamente a produção de antibióticos.
4. A produção de compostos antimicrobianos é evidenciada desde o primeiro dia de cultivo.
5. O composto antimicrobiano produzido parece conter um ciclo contendo um nitrogênio, similar à hidroxipiridina e também hidroxila(s) livre(s) e uma estrutura genérica similar à bleomicina.

6. PERSPECTIVAS

1. Realizar o seqüenciamento da região 16S do rDNA para identificação do isolado 2s.
2. Proceder a purificação do composto antimicrobiano produzido pelo isolado 2s através de cromatografia em coluna.
3. Realizar análises por via úmida, como determinação de açúcares e grupos funcionais.
4. Realizar a análise do composto por Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética.
5. Analisar a atividade antitumoral do composto antimicrobiano produzido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, England, v. 51, p797-814, 2001.

APPELBAUN, P.C. MRSA – Tip of the Iceberg. **Clinical Microbiology Infection**, Paris, France, v. 12 (Suppl 2), p. 3-10, 2006.

BADJI, B.; RIBA, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Activité antifongique d'une souce d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, France, v. 15, p211-219, 2005

BACH, H.G.; STEFFIN, B.; CHADIA, A.M.; KOVACHEVICH, R.; GONZALEZ, M.H. Community-Associated Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Hand Infections in an Urban Setting. **The Journal of Hand Surgery**, St. Louis, United States, v.32A:380–383, 2007.

BARTH, A.L.; BARROS, E.; MACHADO, A. Resistência Bacteriana. In: BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARAMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos – consulta rápida**. 3 ed. Porto Alegre: Artimed, 2001. p. 27 – 31.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W.H. Freeman and Company, 2007. 1026p.

BOUDJELLA, H.; BOUTI, K.; ZITOUNI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from Saharan soil. **Microbiological Research**, Jena, Germany, v. 161, p.288-298.

BUSHELL, M.E.; DUNSTAN, G.L.; WILSON, G.C. Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, Netherlands, v.9, p. 849-852, 1997.

BUSHELL, M.E.; WARDELL, J.N. Kinetics and manipulation of hyphal breakage and its effect on antibiotic production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, United States, v. 25, p 404-410, 1999.

CAMPOS, M.M. **Química Orgânica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. v.2,924p.

CARVALHO. M. P. **Produção de Metabólitos Secundários de Basidiomicetos com Atividade Antimicrobiana**. 2007. 70 f.. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections—Michigan. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, United States, v.30, p.185-187, 1981.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobianos: considerações Gerais; In: GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc-Graw Hill, 2003. p.859 – 875.

CHATER, K.F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, [London], United Kingdom, v. 361, p. 761 – 798, 2006.

CHATWAL, G. **Organic Chemistry of Natural Products**. Bombay: Himalaya Publishing, 1981. v.1

CHUN, J.; BLACKALL, L. L.; KANG, S. O.; HAH, Y. C.; GOODFELLOW, M. A Proposal To Reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, Ames, England, v.47, p. 127–131, 1997.

CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes – Some Guidelines. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: William Wilkins, 1989. v. 4.

CRUM, N. F.; LEE, R.U.; THORNTON, S.A. STINE, O.C.; WALLACE, M.R.; BARROZO, C.; KEEFER-NORRIS, A.; JUDD, S.; RUSSELL, K. L. Fifteen-Year Study of the Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **The American Journal of Medicine**, New York, United States, v.119, p. 943-951, 2006.

CUNNINGHAM ,R; JENKS , P.; NORTHWOOD, J.; WALLIS, J.M.; FERGUSON, S.; HUNT, S. Effect on MRSA transmission of rapid PCR testing of patients admitted to critical care. **The Journal of Hospital Infection**, London, England, v.65, p. 24-28, 2007.

DIBBERN, H.W. **UV and IV Spectra of Some Important Drugs**. Aulendorf: Editio Cantor, 1978.

ELSTON, D.M. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, United States, v.56, p.1-16, 2007.

EMBLEY, T.M.; STACKEBRABDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Canada, v. 48, p 257 - 89, 1994.

ENGEMANN J.J. ;CARMELI Y.; COSGROVE S.E.; FOWLER V.G.; BRONSTEIN M.Z., TRIVETTE S.L. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, United States, v.36, p.592-8, 2003.

FGUIRA, L.F.B.; FOTSO, S.; MEHDI, R.B.A.; MELLOULI, L.; LAATSCH, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US 80. **Research in Microbiology**, Paris, France, v. 156, p. 341-347, 2005.

FORESTIER, E.; Rémy, V.; MOHSENI-ZADEHA, M.; LESENSB, O.; JAUHLACC, B.; CHRISTMANNA, D.; HANSMANNA, Y. Bactériémies à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : aspects épidémiologiques et thérapeutiques récents MRSA Bacteremia: recent epidemiological and therapeutical trends. **La Revue de médecine interne**, Paris, France, p. 1-10, 2007.

GONZÁLEZ, I.; SACIDO, A. A.; ANDERSON, A.; GENILOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, England, v. 54, p. 401-415, 2005.

GOODFELLOW, M. Suprageneric classification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: William Wilkins, 1989. v. 4.

GOOTZ, T.D. Discovery and Development of New Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, United States, v.3, p. 13-31, 1990.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, United, States, v 63, p. 3233 – 41, 1997.

HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; CHEN, W.H. Increasing Prevalence of methicilin-resistance *Staphylococcus aureus* causing nosocomial infection at a university hospital in Taiwan from 1986 to 2001. **Antimicrobial Agents and Chemotherapie**, Washington, United States, v. 48, p. 1361-1364, 2004

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

KLUYTMANS-VANDENBERGH, M.F.Q; KLUYTMANS, J.A.J.W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives **Clinical Microbiology Infection**, Paris, France, v. 12 (Suppl 1), p. 9-15, 2006.

LECHEVALIER, H.A. A Practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: William Wilkins, 1989. v. 4.

LECHEVALIER, H.A; HORAN, A C.; LECHEVALIER, H. Lipid Composition in the Classification of Nocardiae and Mycobacteria. **Journal Of Bacteriology**, New York, United States, v. 105, p. 313-318, 1971.

LEVY, B.S. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, Netherlands, v. 57, p. 1446-14450, 2005.

LEVY, B.S.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine supplement**, New York, United States, v. 10, p122-129, 2004.

LI, W.; LANOOT, B.; ZHANG, Y.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; LIU, Z. *Streptomyces scopiformis* sp. nov., a novel streptomycete with fastigate spore chains. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Ames, England, v. 52, p1629–1633, 2002.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, United States, v. 111, p. 1265–1273, 2003.

MACHADO, A; BARROS, E. Princípios Básicos do uso de Antimicrobianos. In: BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARAMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos – consulta rápida**. 3.ed. Porto Alegre: Artimed, 2001. p.33 – 35.

MANIAN, F.A.; MEYER, L.; SETZER, J.; SENKEL, D. Surgical site infections associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: do postoperative factors play a role? **Clinical Infectious Disease**, Chicago, United States, v.36, p.863-8, 2003.

MOFFAT, A.C. **Clarke's isolation and identification of drugs**. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.489-490.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002, **Journal of Natural Products**, New York, USA, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NORRBY, S.R.; NORD, C.E.; FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health **The Lancet Infectious Disease**, New York, United States, v. 5, p. 115–19, 2005.

OCHI, K. From microbial Differentiation to Ribosome Engineering. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tóquio, Japan, v. 71, p 1383-1386, 2007.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003. 120 f.. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2003.

OVERBYE, K.M; BARRETT, J.F. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug Discovery Today**, London, England, v. 10, n. 1, p. 45-52, 2005.

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.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; ENGEL, R.G. **Introduction to Organic Laboratory Techniques: a Microscale Approach**. 3.ed. Fort Worth: Saunders, 1999.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, London, England, v.7 1, p.981– 990, 2006.

PROJAN, S.J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? **Current Opinion in Microbiology**, London, England, v. 6, p. 427-430, 2003.

SAADOUN, I.; GHARAIBEH, R. The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potencial as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Arid Environments**, London, England, v. 53, p365-371, 2003.

SALGADO, C.D.; FARR, B.M.; CALFEE, D.P. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, United States, v.36, p.131– 139, 2003

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Infection**, Paris, France, v. 12 (Suppl 1), p. 3-8, 2006.

SCOTT, A.I. **Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products**. London: Pergamon Press , 1964. 443p.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria class nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, England, v. 47, p. 479-491, 1997.

STANECK, J. L.; ROBERTS, G. D. Simplified Approach to Identification of aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. **Applied Microbiology**, Washington, United States, v. 28, p 226-231, 1974.

SHINER, R.L.; HERMANN, C.K.F.; MORRIL, T.C.; CURTIN, D.Y.; FUSON, R.C. **The Systematic Identification of Organic Compounds**. 8.ed. Hoboken: J. Wiley, 2004. p. 344,

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.; GOTTLIEB, D. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, England, v. 16, p. 313-340, 1966.

SILVERSTEIN, R.M. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 3 .ed. New York: John Wiley & Sons, 1974. 340p.

SUGIYAMA, M; KUMAGAI, T. Molecular and Structural Biology of Bleomycin and Its Resistance Determinants. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, Osaka, Japan, v.93, p. 105-116, 2002.

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

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 792p.

VAN DER MEE-MARQUET, N.; DOMELIER A.S.; GIRARD N.; QUENTIN R. Bloodstream Infection Study Group of the Relais d'Hygiene du Centre. Epidemiology and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, United States, v.42, p.5650-5657, 2004.

VINING, L.C. Secondary Metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes**. Weinheim : VCH, 1986. v. 4, p19-38.

YOUNG, D.M.; HARRIS, H.W.; CHARLEBOIS, E.D.; CHAMBERS, H.; CAMPBELL, A.; PERDREAU-REMYNGTON, F. An epidemic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* soft tissue infections among medically underserved patients. **Archives of Surgery**, Chicago, United States, v.139, p.947-951, 2004.

ZITOUNI, A.; BOUDJELLA, H.; LAMARI, L.; BADJI, B.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAU, N. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Research in Microbiology**, Paris, France, v.156, p. 984-993, 2005.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; MAITHILI M. ; BHALACHANDRA, J.; BHOLE, D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, Berlin, Germany, v.176, p.386-390, 2001.

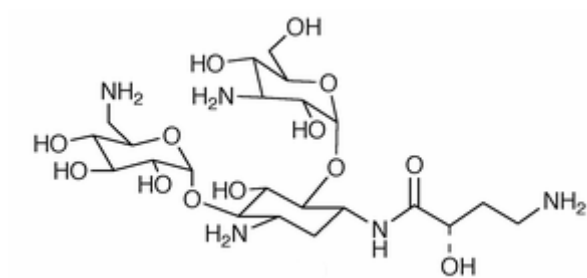
WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H. A.; SACKIN, M. J. Numerical Classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology** , London, England, v.129, 1743-1813, 1983.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; HUANG, Y.; YUEN, K. Y. Genomic evidence for antibiotic resistance genes of actinomycetes as origins of antibiotic resistance genes in pathogenic bacteria simply because actinomycetes are more ancestral than pathogenic bacteria. **Medical Hypotheses**, Edinburgh, Scotland, v.67, p1297-1304, 2006.

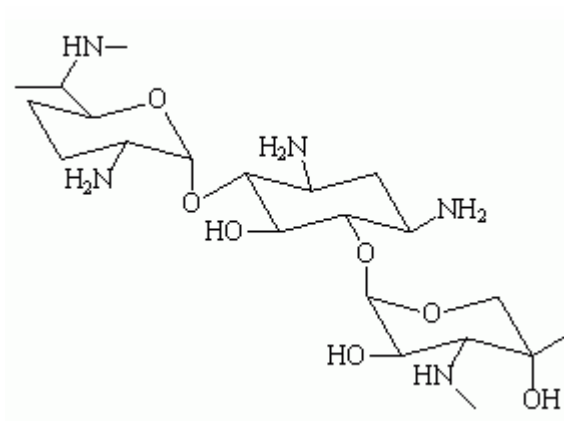
ANEXOS

ANEXO 1. ESTRUTURA DOS ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS COMO PADRÃO NA CCD

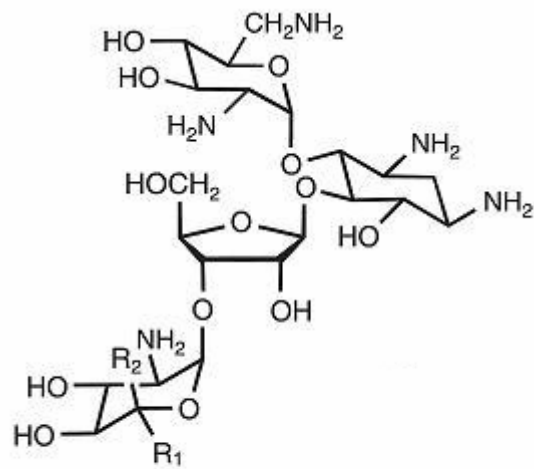
Amicacina:



Gentamicina:

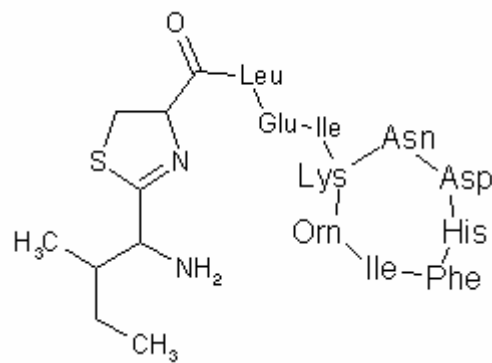


Neomicina:

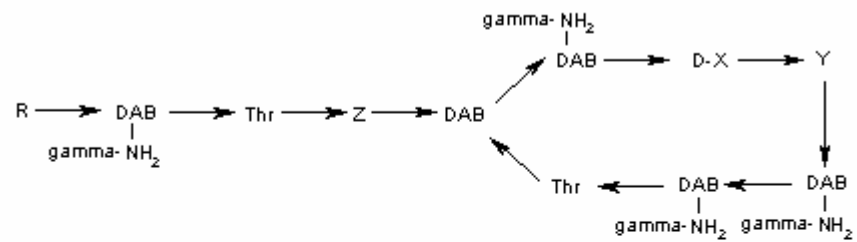


Neomycin B ($R_1 = H, R_2 = CH_2NH_2$)
 Neomycin C ($R_1 = CH_2NH_2, R_2 = H$)

Bacitracina:



Polimixina B:



DAB = Acido L-alfa,gamma-Diaminobutírico

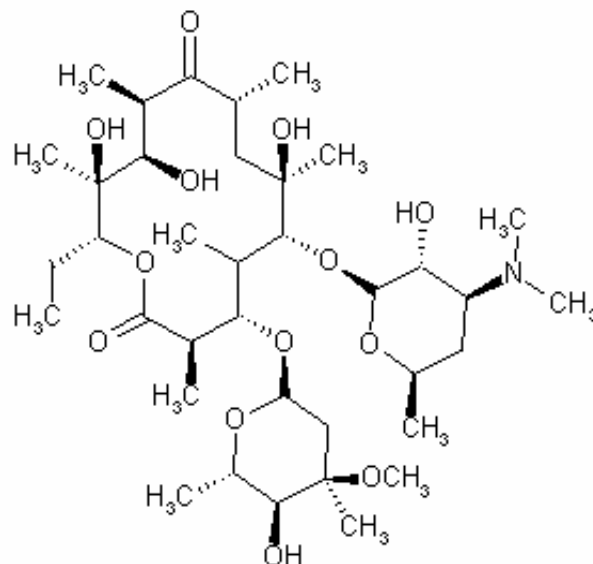
Polimixina B₁, R=(+)-6-Metiloctanoil X=Phe Y=Leu Z=DAB

Polimixina B₂, R=6-Metilheptanoil X=Phe Y=Leu Z=DAB

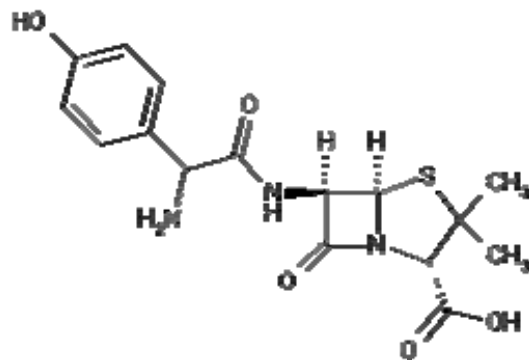
Polimixina D₁, R=(+)-6-Metiloctanoil X=Leu Y=D-Ser Z=DAB

Polimixina B₄, R=6-Metiloctanoil X=Leu Y=D-Ser Z=DAB

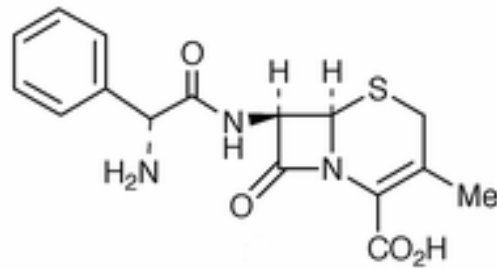
Eritromicina:



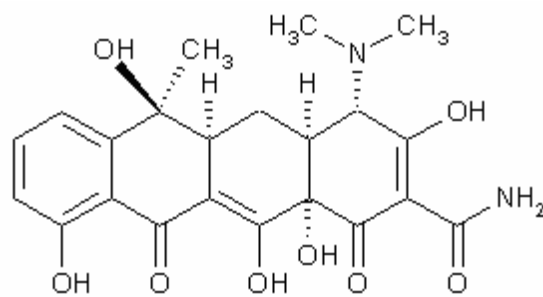
Amoxicilina:



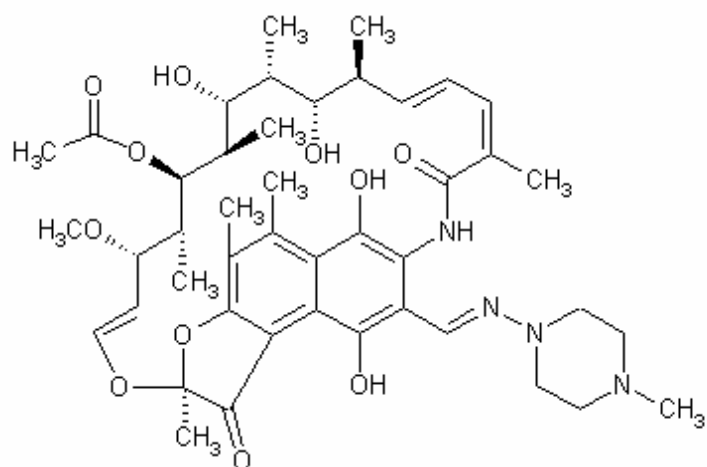
Cefalexina:



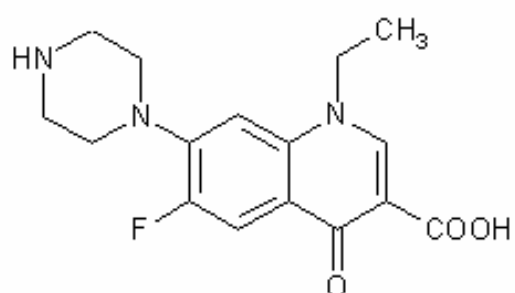
Tetraciclina



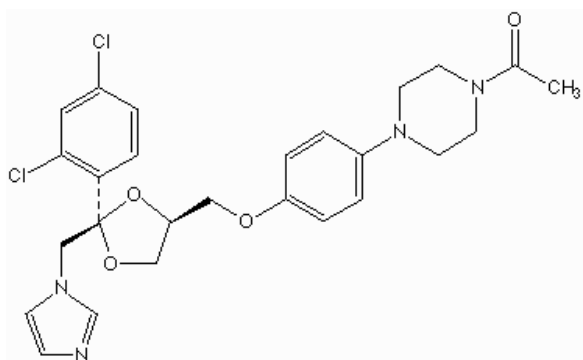
Rifampicina:



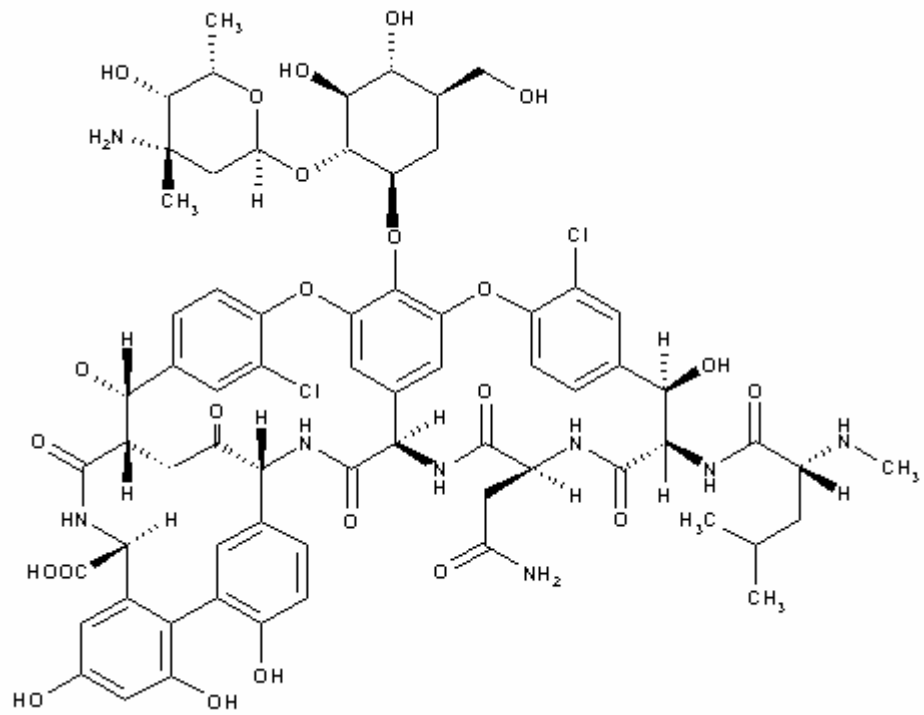
Norfloxacin:



Cetoconazol:



Vancomicina:



ANEXO 2. Espectros de UV e IV da bleomicina.