

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Tese de Doutorado

**PERFIL FARMACOLÓGICO E TOXICOLÓGICO DE PRODUTOS
BIOATIVOS OBTIDOS DE *Streptomyces* spp ISOLADOS DO LEITO
DE RIOS DO ESTADO DA PARAÍBA**

THOMPSON LOPES DE OLIVEIRA

Recife - PE
JANEIRO/2009

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Tese de Doutorado

**PERFIL FARMACOLÓGICO E TOXICOLÓGICO DE PRODUTOS
BIOATIVOS OBTIDOS DE *Streptomyces* spp ISOLADOS DO LEITO DE RIOS
DO ESTADO DA PARAÍBA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Avaliação e Obtenção de Produtos Naturais e Bioativos.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza, UFPE.

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, UFPB.

Thompson Lopes de Oliveira

Recife - PE
2009

Oliveira, Thompson Lopes

Perfil Farmacológico e Toxicológico de Produtos Bioativos Obtidos de *Streptomyces* spp Isolados do Leito de Rios do Estado da Paraíba / Thompson Lopes de Oliveira. Recife: O Autor, 2009.

Vii + 146 folhas: ll., fig., graf e tab.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde - Ciências Farmacêuticas, 2009.

Inclui bibliografia e anexos

1. *Streptomyces* 2. Solo 3. Metabólitos bioativos 4. Atividade 5.
Paraíba **I. Título**

579.873

CDU (2.ed)

UFPE

589.92

CDU (22.ed.)

CCS2009-016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Recife, 28 de janeiro de 2009.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de janeiro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof^a. Dr^a. Ivone Antonia de Souza
(Dept^o de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Ivone Antonia de Souza

EXAMINADOR INTERNO: Prof^a. Dr^a. Maria Nelly Caetano Pisciotano
(Dept^o de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Maria Nelly Caetano

EXAMINADOR INTERNO: Prof^a. Dr^a. Jane Sheila Higino
(Dept^o de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Jane Sheila Higino

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Henrique Douglas Coutinho
(Dept^o de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri - URCA)

Assinatura: Henrique Douglas Coutinho

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
(Dept^o de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

Assinatura: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Tese de Doutorado

Reitor

Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-Reitor

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Francisco Aniso

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

José Thadeu Pinheiro

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefia do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Jane Sheila Higino

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Samuel Daniel de Souza Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pedro José Rolim Neto

Vice-Coordenador de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Beaty Saegesser Santos

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Tese de Doutorado

**PERFIL FARMACOLÓGICO E TOXICOLÓGICO DE PRODUTOS
BIOATIVOS OBTIDOS DE *Streptomyces* spp ISOLADOS DO LEITO DE RIOS
DO ESTADO DA PARAÍBA**

BANCA EXAMINADORA:

Membro(s) Externo(s) Titular(es)

Dr. Henrique Douglas Coutinho
Dr. Evandro Leite de Souza

Membro(s) Interno(s) Titular(es)

Dra. Ivone Antonia de Souza
Dra. Maria Nely Caetano Pisciotano
Dra. Jane Sheila Higino

Membro(s) Suplentes

Dra. Elba Lúcia Cavalcanti Amorim
Dra. Falba Bernadete Ramos dos Anjos

Ao meu Deus sabedoria suprema e infinita;

A Jesus Cristo Nosso Senhor;

A Nossa Senhora Mãe de Jesus,

Meu eterno obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pai celestial supremo! Ao meu Senhor Jesus Cristo por revigorar minhas forças, na luta pelos ideais, sonhos e confortar nas horas difíceis. Obrigado a minha Mãe por sempre me cobrir com teu manto protetor, me conduzindo pelo caminho certo me ajudando a superar todos os obstáculos de vida. Ao meu Espírito Santo pela luz, discernimento e fé.

Muito obrigado por tudo na minha vida!

A minha mãe Salônia Lopes de Oliveira espelho de vida, que sempre me estimulou a lutar pelos objetivos e jamais se afastou do meu lado. Mãe essa vitória também é sua;

A minha noiva, Priscila Farias por todo incentivo e dedicação de vida nestes anos ao meu lado, meu amor esse parabéns é nosso, obrigado!

Ao meu pai, meu irmão e minha irmã pela confiança sempre;

A Prof.^a Edeltrudes de Oliveira Lima pela orientação, ensinamentos, amizade, exemplo de dedicação e seriedade em tudo que faz;

A Prof.^a Ivone Antonia de Souza pela orientação, aprendizado, parceria, confiança e amizade;

Ao Prof. Luiz Zaror e Prof. Victor Silva pela valorosa colaboração;

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade da realização do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ANEXOS	IV
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1.0 Introdução	01
2.0 Objetivos	07
2.1 Geral	08
2.2 Específicos	08
3.0 Revisão de Literatura	10
3.1 O Solo	11
3.2 <i>Streptomyces</i>	12
3.3 Metabólitos	15
3.4 Características genéticas de cepas de <i>Streptomyces</i> sp.	20
3.5 Geografia do Estado da Paraíba	20
4.0 Capítulo 04 - Avaliação da atividade antitumoral, antiinflamatória e toxicidade aguda de extratos obtidos de <i>Streptomyces</i> spp isolados de solos paraibanos	26
5.0 Capítulo 05 - Atividade antifúngica sobre leveduras e cinética de morte microbiana de extratos isolados de <i>Streptomyces</i> obtidos em solos paraibanos.	45
6.0 Capítulo 06 - Caracterização química do extrato etanólico isolado de <i>Streptomyces</i> spp. de solo paraibano	63

7.0 Capítulo 07 - Considerações finais	81
8.0 Capítulo 08 - Referências	83
9.0 ANEXOS	133

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Proporção da pesquisa realizada por Empresas, Universidades e Centros de Pesquisa, para obtenção de metabólitos secundários de interesse econômico produzidos por *Streptomyces*. Adaptado de Manfio e Lemos (2001). **06**

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Desenho de cepa de *Streptomyces* spp. ilustrando o micélio aéreo e o micélio do substrato. **16**

Figura 2 - Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (Chater e Merrick, 1979). **19**

Figura 3 - Bacias hidrográficas de rios de domínio estadual da Paraíba. **23**

Figura 4 - Distribuição da mesorregiões do Estado da Paraíba. **24**

Figura 5 - Tipos de solos do Estado da Paraíba. **25**

ARTIGO IV

Figura 1 - Percentagem de inibição da média dos pesos dos tumores em animais tratados com os extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces*, administrados por via intraperitoneal sobre o modelo experimental Sarcoma 180 em camundongos. Os valores representam à média \pm desvio padrão. * $p < 0,01$ comparado os grupos tratados com o controle que recebeu solução salina a 0,9 %. ANOVA - Bonferronis (n = 5/grupo). **41**

Figura 2 - Percentagem de inibição da média dos pesos dos tumores em animais tratados com os extratos Sp-1 e Sp-3, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental Carcinoma de Ehrlich em camundongos. $p > 0,05$. O controle recebeu solução salina a 0,9%. ANOVA - Bonferronis (n = 5/grupo). **42**

ARTIGO V

Figura 1 - Curva de morte microbiana (Log UFC/mL x tempo) da cepa *Candida albicans* ATCC 13803, sob ação dos extratos Sp-1 e Sp-3 (156,25 μ g/mL), e da droga padrão cetoconazol 50 μ g/mL. Controle sol. Salina a 0,9%. ($p < 0,05$)*. **61**

Figura 2 - Curva de morte microbiana (Log UFC/mL x tempo) da cepa *Candida tropicalis* LM 37, sob ação dos extratos Sp-1 (625 μ g/mL), Sp-3 (1250 μ g/mL) e da droga padrão cetoconazol 50 μ g/mL. Controle sol. Salina a 0,9%. ($p < 0,05$)*. **62**

ARTIGO VI

Figura 1 - Espectro RMN ^1H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona.	72
Figura 2 - Expansão do espectro RMN H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona, na região entre 8,5 e 8,8 ppm.	73
Figura 3 - Expansão do espectro RMN H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona, na região entre 7,1 e 8,2 ppm.	74
Figura 4 - Expansão do espectro RMN H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona, na região entre 3,9 e 4,3 ppm.	75
Figura 5 - Espectro RMN ^{13}C (500 MHz) de sp-1/09 em acetona	76
Figura 6 - Espectro RMN ^{13}C (500 MHz) de sp-1/09 em acetona	77
Figura 7 - Espectro RMN ^{13}C (500 MHz) de sp-1/09 em acetona	78
Figura 8 - Cromatograma da fração sp-1/09 no comprimento de onda na faixa de UV 200-400nm	79
Figura 9 - Cromatograma da fração sp-1/09 20 $\mu\text{g/mL}$	80

ANEXO I

Figura 1 - Cores da macromorfologia dos estreptomicetos isolados do solo paraibano.	93
Figura 2 - Antagonismo entre amostra de <i>Streptomyces</i> spp. em bloco de agar frente a cepa de <i>Staphylococcus epidermidis</i> SSL-1.	94
Figura 3 - Antagonismo entre amostra de <i>Streptomyces</i> spp. em bloco de agar frente a cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	94

ANEXO II

Figura 1 - Colônias granulosas e empoeiradas de *Streptomyces* spp. isolado de solo paraibano. **107**

Figura 2 - Macromorfologia das colônias de *Streptomyces* spp. isoladas de solo paraibano com liberação de exopigmento. **108**

Figura 3 - Micromorfologia de *Streptomyces* spp. isolados de solo Chileno. **108**

Figura 4 - Efeito antagônico de cepas de *Streptomyces* spp. isolados de solo paraibano contra espécie de *S. aureus* ATCC 6538. **109**

ANEXO III

Figura 1 - Efeito dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* e da droga Cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. niger* LM 05 e *A. fumigatus* ATCC 0406. ANOVA - Bonferronis ($p < 0.05$). **131**

Figura 2 - Efeito dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* e da droga Cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *T. inkin* LM 067 e *T. rubrum* ATCC 1683. ANOVA - Bonferronis ($p < 0.01$), para *T. inkin* LM 067. **132**

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Distribuição de antibióticos produzidos por diferentes gêneros de <i>Actinomycetes</i> .	05
--	-----------

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - <i>Actinomycetes</i> por grama de solo de acordo com diferentes profundidades.	13
--	-----------

Tabela 2 - General features of the chromossome.	20
--	-----------

Tabela 3 - Tipos de solos encontrados no Estado da Paraíba.	22
--	-----------

ARTIGO IV

Tabela 1 - Efeitos farmacológicos dos ensaios preliminares de toxicidade dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de <i>Streptomyces</i> spp. administrados por via intraperit	43
--	-----------

Tabela 2 - Efeitos farmacológicos dos ensaios preliminares de toxicidade dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de <i>Streptomyces</i> spp. administrados por via oral	44
--	-----------

ARTIGO V

Tabela 1 - Atividade antifúngica dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de <i>Streptomyces</i> spp. contra leveduras.	59
---	-----------

Tabela 2 - Atividade antifúngica em placas de microdiluição dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de <i>Streptomyces</i> spp contra espécies de <i>Candida</i> spp.	60
--	-----------

ANEXO I

Tabela 1 - Quantificação dos Estreptomicetos isolados de mesorregiões da Paraíba.	93
--	-----------

ANEXO III

Tabela 1 - Atividade antifúngica dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de <i>Streptomyces</i> spp. contra fungos filamentosos.	129
---	------------

Tabela 2 - Ensaio antifúngico em placas de microdiluição dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de <i>Streptomyces</i> spp. contra fungos filamentosos.	130
---	------------

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Atividade antibacteriana produzida por estreptomicetos isolados de solos paraibanos. Publicado na Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança, v.05, n.01, jul. 2007.	90
ANEXO II - Importância biotecnológica de <i>Streptomyces</i> spp isolados de solos paraibanos. Publicado na Revista de Ciências da Saúde Santa Maria, v.05, n.01, out. 2008.	97
ANEXO III - Atividade Antifúngica e Cinética Microbiana de Extratos Obtidos de <i>Streptomyces</i> spp Isolados de Solos Paraibanos. Aceito para publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia nov/2008.	115
ANEXO IV - Mapas, fotos, imagens, e documentos correlacionados à realização da pesquisa.	133

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA - Análise de Variância
ASD - Agar Sabouraud Dextrose
Av - Avenida
ATCC - *America Type Culture Colletion*
BOD - Estufa Bacteriológica
° C - Graus Celsius
CC - Cromatografia em Coluna
CCDA - Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CEEA - Comitê de Ética Experimental com Animais
CIM - Concentração Inibitória Mínima
cm - Centímetros
CLAE - *Cromatografia Líquida de Alta Resolução*
DF - Distrito Federal
DL₅₀ - Dose Letal
ELISA - *Ensaio do Imunoabsorvente Ligado à Enzima*
g - Gramas
ICBM - Instituto de Ciências Biológicas e Microbiológicas
IP - Intraperitoneal
ISP-2 - Agar Extrato de Levedura-Extrato de Malte
IV - Infravermelho
LM - Laboratório de Micologia
Log - Logarítimo
mm - Milímetros
mg - Miligramas
ml - Mililitros
mμ - Micrômetros
μL - Microlitros
μg - Microgramas
Kg - Kilogramas
NCCLS - *National Centers Comitee Laboratory Standarzing*

PB - Paraíba
PE - Pernambuco
RJ - Rio de Janeiro
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RPM - Rotação por Minuto
S/n - Sem número
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNC - Sistema Nervoso Central
Sp - Extrato seco etanólico de espécie de *Streptomyces* spp
SP - Espécie de *Streptomyces* spp
UFC - Unidade Formadora de Colônia
UFPB - Universidade Federal da Paraíba
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
Vf - Volume Final
Vi - Volume Inicial
VO - Via oral
V/V - Volume/volume
% - Percentagem

RESUMO

Objetivou-se a pesquisa de espécies do gênero *Streptomyces* isolados de mesorregiões da Paraíba produtores de metabólitos bioativos com atividade farmacológica, avaliando os níveis de toxicidade dos extratos e sua composição química. 49 espécies do gênero *Streptomyces* foram isolados a partir de 68 amostras de solo em leito dos principais rios nas diferentes mesoregiões do Estado da Paraíba-Brasil. Os *Streptomyces* foram obtidos através da suspensão da amostra de solo em solução salina (0,89%) e estriada em placa de Petri. A identificação foi realizada através de análises macromorfológicas, micromorfológicas e testes fisiológicos. A triagem antimicrobiana foi determinada através da técnica em blocos de agar, e os extratos secos etanólicos preparados a partir das espécies que evidenciaram os melhores resultados, respectivamente cepas SP1 e SP3. A avaliação do antagonismo foi realizada através das técnicas de difusão com discos em meio sólido, microdiluição e determinação da curva de morte microbiana. Os ensaios de atividade antiinflamatória, antitumoral e toxicidade aguda foram realizados segundo literatura específica, utilizando modelos animais previamente aprovados em comitê. A caracterização química foi feita através de ensaios cromatográficos e de espectroscopia. Os resultados caracterizam um potencial antimicrobiano dos extratos sp-1 e sp-3 frente às espécies de leveduras do gênero *Candida* spp., gênero *Aspergillus* sp., gênero *Trichophyton* sp e amostras de *Staphylococcus* spp de origem clínica e de coleção. A inibição tumoral foi observada em ambos os extratos frente ao tumor Sarcoma 180 com redução em até 73% do peso da massa tumoral. Não foi evidenciada nenhuma ação antiinflamatória dos extratos sp-1 e sp-3. Os extratos apresentaram efeitos estimulantes do SNC nas primeiras horas e depressores na continuidade do teste de toxicidade aguda, não evidenciando mortes, sendo assim, não sendo possível caracterizar a dose letal para cada extrato. A caracterização química revelou a partir do extrato sp-1, a reunião de 13 frações, onde após recristalização foi evidenciado o composto sp-1/09. Além deste outras frações encontram-se em fase de purificação para a elucidação. Tornar-se oportuno e compensador a realização de novas coletas de solo das mais diversas regiões paraibanas revelando o estudo dos *Streptomyces* spp. como uma importante fonte biotecnológica para a obtenção de novos compostos bioativos.

Palavras-chave: *Streptomyces*, produtos naturais, solo, actinomicetos.

ABSTRACT

Aimed to search for species of *Streptomyces* isolated from mesoregions of Paraíba producers of bioactive metabolites with pharmacological activity, assessing the levels of toxicity of extracts and their chemical composition. 49 species of the genus *Streptomyces* were isolated from 68 samples of soil bed in the main rivers in different mesoregiões the state of Paraíba-Brazil. The *Streptomyces* were obtained through the suspension of soil in saline (0.89%) and striated in the Petri dish. The identification was done through analysis macromorfológic, micromorfológic and physiological tests. The antimicrobial screening was determined by the technique in blocks of agar, and the dried ethanolic extracts prepared from the species that showed the best results, respectively strains SP1 and SP3. The evaluation of the antagonism was performed through the techniques of disc diffusion in solid medium, microdilution and determination of the curve of microbial death. Tests of anti-inflammatory activity, acute toxicity and antitumour were conducted under specific literature, using animal models previously approved in Committee. The chemical characterization was done by chromatographic and spectroscopic tests. The results characterize a potential antimicrobial extracts of sp-1 and sp-3 in front of the yeast species of the genus *Candida* spp., genus *Aspergillus* sp., gender and *Trichophyton* sp samples of *Staphylococcus* spp in clinical and home collection. The tumor inhibition was observed in both extracts against the tumor Sarcoma 180 with up to 73% reduction in the weight of the tumor mass. There was no apparent anti-inflammatory action of extracts sp-1 and sp-3. The extracts showed effects of SNC stimulants and depressants in the first hours of the continuing acute toxicity test, showing no deaths, so it is not possible to characterize the lethal dose for each statement. The chemical characterization showed the extract from the sp-1, the meeting of 13 fractions, which was evidenced after recrystallization the compound sp-1/09. Besides the other fractions are at the stage of purification for elucidation. Become timely and rewarding the performance of new samples of soil from various regions paraibanas revealing the study of *Streptomyces* spp. biotechnology as an important source to obtain new bioactive compounds.

Keywords: *Streptomyces*, products natural, soil, *actinomycetes*.

INTRODUÇÃO

01



1. Introdução

O uso de plantas medicinais, bem como, o isolamento de substâncias biologicamente ativas oriundas de outras fontes como fungos e bactérias vêm ganhando destaque em toda prática científica, contribuindo em parte ou até mesmo na totalidade, na elaboração de novos medicamentos com fins terapêuticos e experimentais (FETROW, 2000).

Os fármacos podem ter origem sintética ou natural; onde a fonte natural pressupõe origem não só a partir de plantas, como também, de fungos, bactérias, outros microrganismos, animais ou minerais (VIEGAS JR, 2006). Apesar da maioria dos medicamentos utilizados hoje ter origem sintética, a terapêutica moderna composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais. Autores estimam que até um terço do total dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. Exemplo típico observado entre as drogas antitumorais e antibióticas em cerca de 70 % (YUNES, 2001).

A variedade e a complexidade das macromoléculas que constituem os metabólitos secundários elaborados pelos organismos ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI, 2001).

O solo, um dos maiores representantes naturais, apresenta-se como um meio rico e complexo comportando-se como uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas (RANGASWAMI, 1967), que podem ser encontradas em um habitat

microscópico formado por milhares de bactérias, fungos, algas e protozoários, potencialmente produtores de substâncias de interesse clínico (BLACK, 2002).

As vastas diferenças existentes na composição dos solos, junto com as diferenças físicas e as práticas agrícolas neles aplicadas, resultam em diferenças igualmente grandes, no tamanho da população microbiana, assim como, nos tipos de microrganismos que constituem essa população (TORTORA et al., 2000).

Entre os microrganismos as bactérias exercem um papel muito importante no solo atuando como agentes biogeoquímicos na mineralização de compostos orgânicos, decompondo-os e devolvendo-os ao solo (ATALAN, 2000). Em algumas situações, estes organismos podem elaborar produtos bioativos, denominados *metabólitos primários e/ou secundários* de interesse comercial e terapêutico, tais como: substâncias antibióticas, imunossupressoras, antiinflamatórias, pigmentos, fungicidas e antitumorais, largamente empregados na prática terapêutica e biotecnológica (GARCIA, 1996; GARCIA-QUINTANA et al., 1997; DUANYUM et al., 2001; OUHDOUCH, 2001).

As bactérias do solo excedem a população de todos os outros grupos de microrganismos, tanto em número quanto em diversidade. Nos solos secos e quentes existe um relevante número de actinomicetos, na ordem de milhões por grama de solo e os gêneros predominantes são *Nocardia*, *Streptomyces* e *Micromonospora*. Estes são capazes de degradar muitas substâncias químicas complexas, representando, pois, importante papel como habitante do solo (PELCZAR et al., 1981).

Dentre os representantes, destaca-se como um dos principais gêneros produtores de moléculas bioativas os *Streptomyces* apresentando-se como bactérias Gram-positivas, filamentosas, pertencentes à ordem dos *Actinomycetales* e a família *Streptomyceae* que incluem mais de 500 espécies, habitando a água e o solo por excelência (VIEIRA et al., 2002). Muitas dessas espécies são responsáveis pela

degradação do material orgânico do solo, contribuindo em parte para o “cheiro da terra”, através da produção de metabólitos voláteis denominados geosminas (CONNELL, 2001).

Pesquisas realizadas nos mais diversos habitats do mundo para isolamento de novas cepas de *Actinomycetales* potencialmente produtoras de substâncias bioativas, revelam que sua abundância é maior no solo (SEMÊDO, 2001), sendo ainda, mais freqüentes em solos secos, quentes, cultivados, profundos, aerados, ricos em matéria orgânica e em torno dos trópicos (GARCIA-QUINTANA, 1997; DIAZ-CORRALES et al., 1997).

A importância econômica e industrial dos *Streptomyces* é destacada por sua versatilidade na produção de metabólitos primários e secundários, cujas aplicações biotecnológicas enquadram nas mais diversas áreas (VINING, 1990). Dentre estes metabólitos, destacam-se os antibióticos pertencentes a diferentes classes com mecanismos distintos de ação (Figura 1), (OMURA et al., 1979).

Os *Streptomyces* lideram a produção de antibióticos e moléculas farmacologicamente ativas (Tabela 1). Há uma grande diversidade de moléculas produzidas pelos *Streptomyces* muito elevado quando comparado a outros gêneros da família *Actinomycetales*. Dentre estas moléculas destacam-se as classes: aminoglicosídeo, macrolídeo, ansamacrolídeo, beta-lactâmico, peptídeo, glicopeptídeo, antraciclina, tetraciclina, nucleosídeo, polieno e quinona (MANFIO e LEMOS, 2001).

Todavia, novas estruturas também têm sido isoladas de outros gêneros representantes de solo fértil, principalmente *Actinomadura*, *Actinoplanes* e *Micromonospora*, difundindo as opções em estudo de microrganismos de solo (LAZZARINI et al., 2002).

Dessa forma, os produtos de origem natural têm desempenhado relevante papel na descoberta de novos fármacos, sendo necessário um amplo e detalhado estudo para se conseguir novos produtos, ampliando as opções de drogas na terapêutica, melhorando a qualidade de vida da população (NASCIMENTO et al., 2000).

Tabela 1. Distribuição de antibióticos produzidos por diferentes gêneros de *Actinomycetes*.

Gênero	Ano de produção					
	1980		1984		1988	
	n	%	n	%	n	%
<i>Streptomyces</i>	2784	89,20	3477	83,66	4876	79,26
<i>Micromonospora</i>	129	4,13	269	6,47	398	6,47
<i>Nocardia</i>	74	2,37	107	2,57	262	4,26
<i>Actinomadura</i>	16	0,51	51	1,23	164	2,67
<i>Actinoplanes</i>	40	1,28	95	2,29	146	2,37
<i>Streptoverticillium</i> (a)	41	1,31	64	1,54	138	2,24
<i>Streptosporangium</i>	20	0,64	26	0,63	39	0,63
<i>Dactylosporangium</i>	4	0,13	19	0,46	31	0,50
<i>Microbispora</i>	6	0,20	6	0,14	10	0,16
<i>Saccharopolyspora</i>	4	0,13	33	0,79	44	0,72
<i>Actinosynnema</i>	-	-	5	0,12	14	0,23
<i>Streptoalloteichus</i>	3	0,10	4	0,10	12	0,20
<i>Kitasatosporia</i> (a)	-	-	-	-	11	0,18
<i>Kibdelosporangium</i>	-	-	-	-	7	0,11
Total	3121	100,0	4156	100,0	6152	100,00

(*) Adaptado de MANFIO e LEMOS (2001) e GOODFELLOW e O'DONNELL (1989).

(a) Os gêneros *Kitasatosporia* e *Streptoverticillium* são atualmente considerados sinônimos de *Streptomyces*.

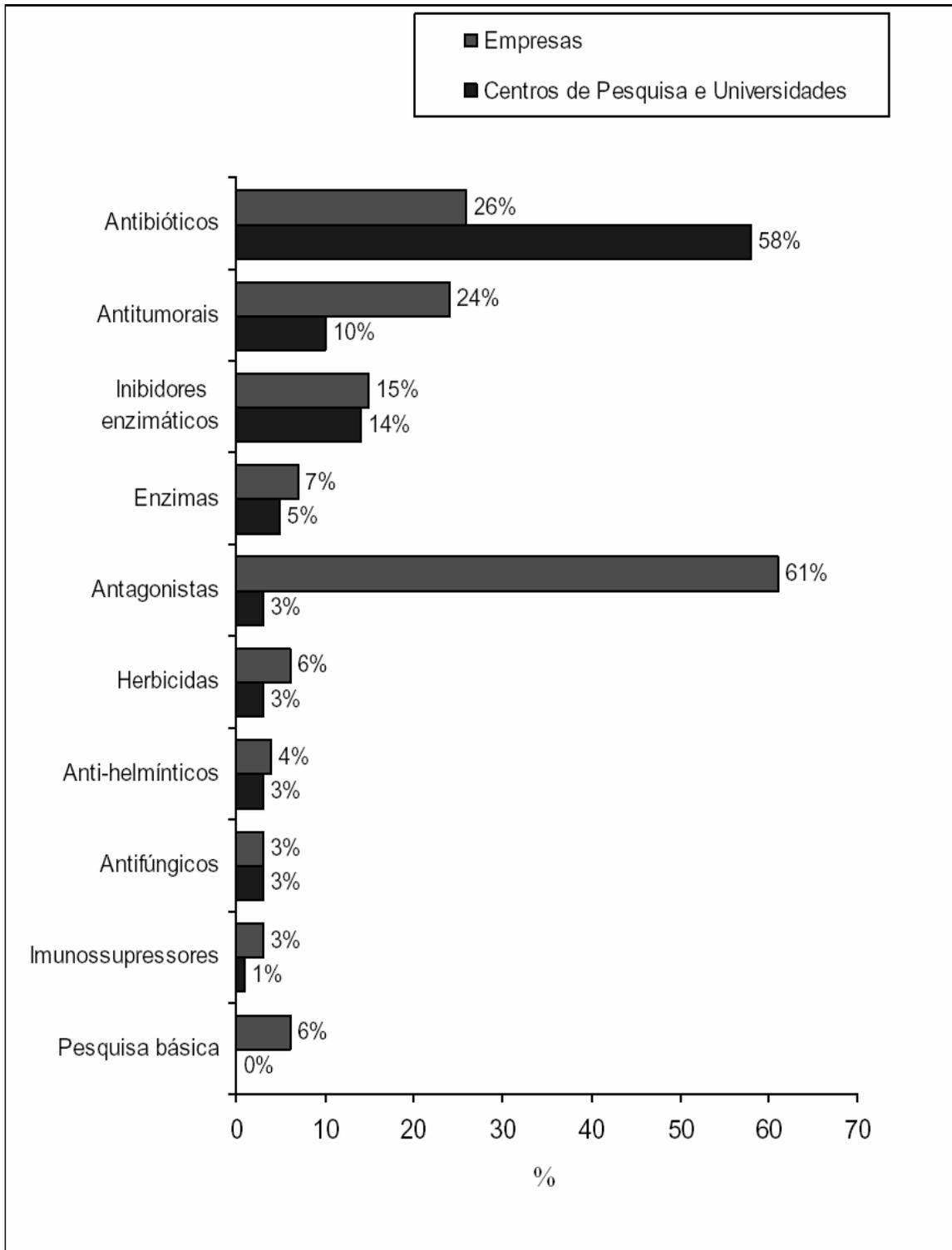


Figura 1. Proporção da pesquisa realizada por Empresas, Universidades e Centros de Pesquisa para obtenção de metabólitos secundários de interesse econômico produzidos por *Streptomyces*. Adaptado de Manfio e Lemos (2001).

OBJETIVOS

02



2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a pesquisa de substâncias biologicamente ativas a partir de amostras de *Streptomyces* spp. isoladas do leito de rios do Estado da Paraíba.

2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar cepas de *Streptomyces* spp do leito de rios do Estado da Paraíba;
- Obtenção de extratos a partir de amostras de *Streptomyces* spp;
- Estudar os efeitos toxicológicos dos produtos isolados de *Streptomyces* spp;
- Avaliar a atividade antiinflamatória e antitumoral dos extratos;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos de *Streptomyces* spp, contra cepas de bactérias e fungos patogênicos com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e cinética de morte microbiana com cepas de fungos filamentosos e leveduras potencialmente patogênicas;
- Caracterização química dos extratos com atividade satisfatória.

Para uma melhor compreensão sugerimos após os objetivos prosseguir a leitura da seguinte maneira:

- REVISÃO DE LITERATURA

- **CAPÍTULO IV** (Artigo 04)
- **CAPÍTULO V** (Artigo 05)
- **CAPÍTULO VI** (Artigo 06)

CAPÍTULO VII (Considerações finais)

CAPÍTULO VIII (Referências)

- ANEXO I**
 - ANEXO II**
 - ANEXO III**
- } Artigos 01, 02 e 03, trabalhos publicados.

ANEXOS - Informações complementares relacionadas à pesquisa.

REVISÃO DA LITERATURA

03



3.1 O solo

O solo é um vasto reservatório de microrganismos, onde grande parte destes encontram-se na rizosfera que pode conter até duas toneladas de organismos por hectare (NWOSU, 2001).

O papel mais importante dos microrganismos no solo é a função como agentes biogeoquímicos na mineralização do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e outros compostos. Este processo é essencial para a manutenção da vida neste planeta. Deve-se compreender que a Terra possui quantidade finita desses elementos e, assim, em face da continuidade da vida, eles devem ser usados e reutilizados; são os microrganismos que realizam as modificações necessárias a esta finalidade (PELCZAR et al., 1981; TORTORA et al., 2000).

As bactérias representam uma das mais diversas formas de vida da Terra e podem consistir em mais de um milhão de espécies (KENNEDY, 1999). Em solos agrícolas fertilizados elas chegam a 10^6 g e em solos de florestas podem atingir valores superiores a 10^9 g (NWOSU, 2001). A literatura sugere que o maior grupo e promissor de microrganismos capaz de produzir substâncias antibióticas são os actinomicetos (SANGLIER et al., 1993).

Todavia, no solo são encontradas bactérias pertencentes a todas as ordens que formam a classe *Bacteriaceae*, sendo hoje universalmente empregado para sua classificação, o sistema de Bergey (HOLT, 1994). As bactérias do solo incluem formas esporuladas e não esporuladas de bacilos, cocos, vibriões e espirilos, variando consideravelmente de tamanho e forma, de respiração aeróbica e anaeróbica e de nutrição autotrófica e heterotrófica (PELCZAR et al., 1981).

Em solos férteis, principalmente aqueles selvagens, destacam-se os actinomicetos em grande prevalência, especialmente em solos neutros ou alcalinos com teor de umidade aumentado (WILLIAMS, 1978).

3.2 *Streptomyces*

Os *Actinomycetes* constituem de 10 % a 15 % da microbiota total do solo, podendo atingir proporções de 95% em condições especiais. Estas espécies compreendem um extenso e diverso grupo Gram-positivo, aeróbio, formadores de micélio, com importância extrema na realização dos ciclos do solo. Muitos deles têm importância econômica pela produção de substâncias biologicamente ativas como os antibióticos, vitaminas e enzimas (MC CARTHY, 1992; SANGLIER et al., 1996; LAZZARINI et al., 2002).

A distribuição e o quantitativo dos actinomicetos nos solos estão intimamente ligados às condições do ambiente como pH, temperatura e até mesmo o tipo de vegetação existente (Tabela 1). Dentro dos *Actinomycetes* do solo, o gênero *Streptomyces* é o que predomina, em volume e diversidade, constituindo até 70 % das colônias de *Actinomycetes* isoladas (TORTORA et al., 2000).

As bactérias do gênero *Streptomyces* pertencem à família *Streptomycetaceae*, Gram-positivas, filamentosas, aeróbias estritas, com mais de 500 espécies. Apresentam ciclo de vida complexo e caracterizam-se por apresentarem micélio substratal vegetativo e hifas aéreas (THEILLEUX, 2000). A maioria das espécies de *Streptomyces* cresce em pH neutro ou medianamente alcalino. No entanto, muitos relatos mostram que algumas linhagens crescem em pH ácido (3,5) ou alcalino (8,0 a 11,5) (SHREMPF, 1999).

Tabela 1. *Actinomycetes* por grama de solo de acordo com diferentes profundidades*.

Profundidade (cm)	Número por grama
3-8	9.750.000
20-25	2.179.000
35-40	570.000
65-75	11.000
135-145	1.400
3500-4500	100

(*) Adaptado de ALEXANDER (1991).

Streptomyces (do grego - *streptos*, curvado ou retorcido e *myces* - fungo) pertencentes à ordem dos *Actinomycetales* e à família *Streptomycetaceae*, caracterizam-se por apresentar hifas vegetativas com 0,5 a 2,0 micrômetros (μm) de diâmetro e por formar micélio ramificado de rara fragmentação (Figura 1). Produzem esporos ou conídios imóveis por septação regular do micélio aéreo, os quais se dispõem de forma retilínea, curvilínea ou espiralada, com colônias resistentes de textura lisa, peluda ou espiculada. Estes microrganismos são capazes de produzir uma variedade de pigmentos responsáveis pela cor do micélio vegetativo e aéreo (PRESCOTT et al., 1999; TORTORA et al., 2000).

Quando cultivados em laboratório e em meios de cultura favoráveis, o crescimento de *Streptomyces* spp. se inicia com a formação de um tubo germinativo que se ramifica, originando o micélio vegetativo, fortemente aderido ao substrato sólido, seguido pela formação do micélio aéreo, que se diferencia na cadeia de esporos (CHATER e HOPWOOD, 1993).

O processo de esporulação começa com a formação simultânea de septos na hifa aérea e termina com a liberação de esporos, onde cada esporo contém um único cromossomo linear fechando assim, o ciclo de vida (Figura 3), (LANCINI, 1993; FLARDH, 2003).

A síntese de inúmeros compostos de interesse biotecnológico segundo Chater e Merrick (1979), pode estar correlacionada com a diferenciação celular, não apenas na formação do micélio aéreo e na produção de antibióticos, mas também no controle genético dos dois processos que estão intimamente correlacionados como foi demonstrado pelos estudos realizados com *S. coelicolor* (WOHLLEBEN et al., 1993).

A fragmentação do micélio do substrato é rara e esporos em pouca frequência são produzidos na hifa do substrato (SHIRLING, 1976). A hifa aérea geralmente possui longas cadeias de esporos, em quantidade superior a 50, mas em certas espécies, pequenas cadeias de esporos também podem ocorrer (SHIRLING, 1968), (Figura 2).

3.3 Metabólitos

A partir de 10.000 cepas de *Actinomycetes*, 2.500 foram capazes de produzir antibiótico, destas, 10 produziram antibióticos novos e apenas um teve aplicação clínica, pois cumpria as condições necessárias para a terapêutica como apresentar uma toxicidade seletiva, boa atividade e espectro de ação para sua aplicação na Medicina. No entanto, mais da metade dos antibióticos utilizados na terapêutica é produzido por espécies de *Streptomyces* (IWAI, 1992; PACHECO, 1994).

Desde o descobrimento de que os *Streptomyces* do solo eram fontes de antibióticos, a atenção dos pesquisadores foi dirigida para este gênero. Dessa forma, iniciou uma intensa busca de antibiótico a partir de amostras de solo em todas as partes do mundo. Foram analisadas milhares de cepas distintas dos mais remotos lugares da Terra. Em 1948, Chater e Merrick, isolaram amostra de solo de Missouri nos Estados Unidos, uma cepa de *Streptomyces* spp. que produzia uma substância antibiótica cor de ouro a qual foi denominada aureomicina.

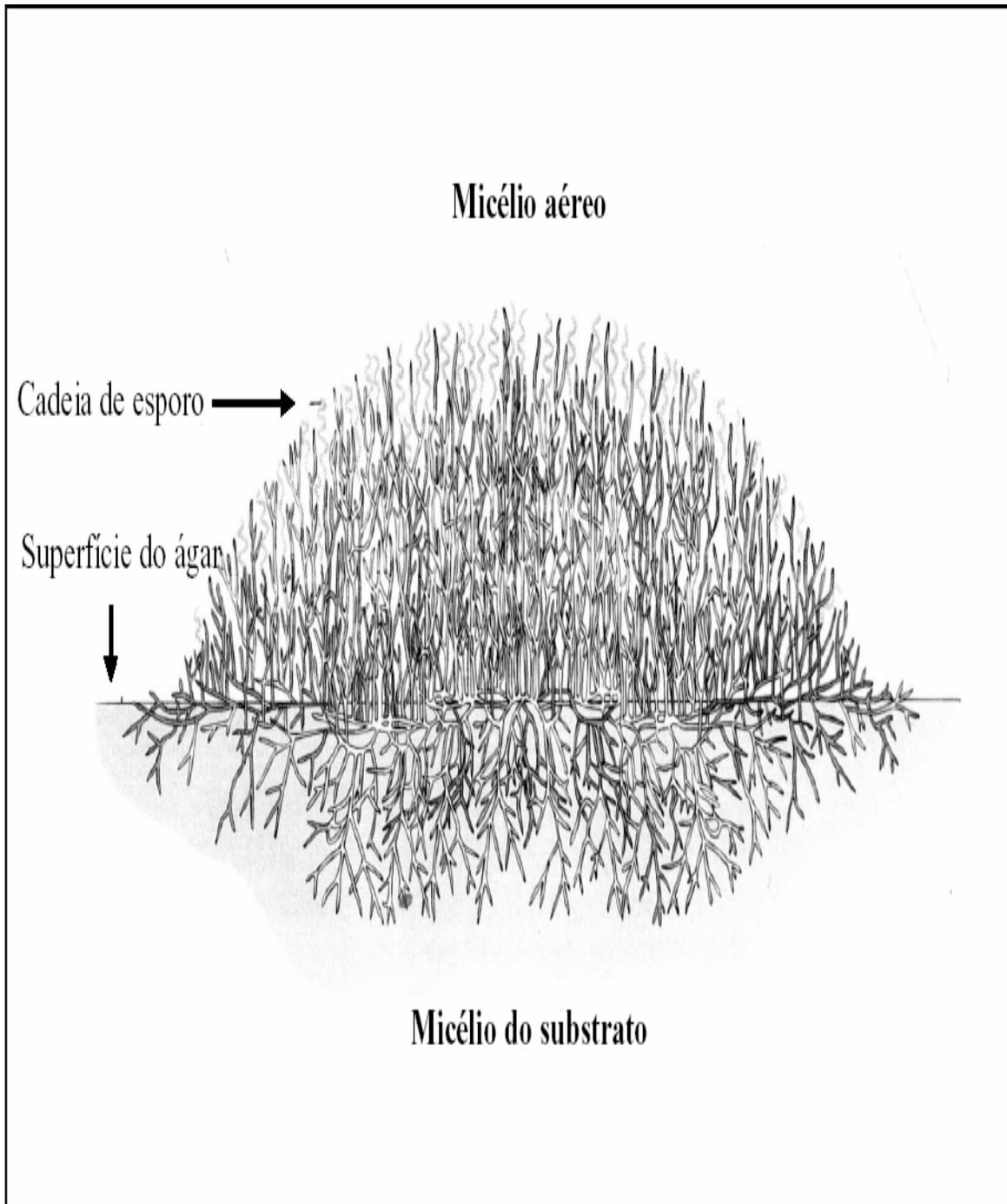


Figura 1. Desenho de cepa de *Streptomyces* spp. ilustrando o micélio aéreo e o micélio do substrato. Adaptado de Prescott et al., 1999.

Em 1948, pesquisadores da Companhia Parke Davis descobriram em uma amostra de solo de Caracas na Venezuela, o *Streptomyces venezuelae* produtor do cloranfenicol. Assim começava o trabalho de isolamento de microrganismos a partir de fontes naturais (GOTTLIEB, 1973; ALMEIDA et al., 1975; ALEXANDER, 1991).

Diaz Corrales et al., (1997), isolaram 35 cepas de *Actinomycetes* na Venezuela, 66% das amostras foram identificadas como *Streptomyces* spp. e 30% dessas cepas apresentaram atividade antimicrobiana. No mesmo ano, Garcia-Quintana et al., (1997), relataram o efeito antibiótico de cepas de *Streptomyces* silvestres isoladas de solo de 148 regiões do Sul do Chile, isolando-se 542 amostras de *Streptomyces* spp, onde 266 apresentaram atividade antimicrobiana. Dois anos depois, na Jordânia, Saadoun (1999), isolou 90 *Streptomyces* spp. de 36 amostras de solo, onde 54% deles apresentaram efeito antagonista sobre várias bactérias, como *Bacillus subtilis* (57%), *S. aureus* (47%), *E. coli* (24%), *Klebsiella* spp. (16%) e *Shigella* spp. (12%). Ouhdouch et al., (2001), isolaram 320 *Actinomycetes*, dos quais 32 (10%) apresentaram grande atividade contra fungos e bactérias.

Recentemente, mais antibióticos foram obtidos de linhagens de *Streptomyces* como as celastramicinas A e B, produzidas por *Streptomyces* MaB-QuH-8, que apresentaram antagonismo para bactérias como *Mycobacterium vaccae* e *Bacillus subtilis* (PULLEN et al., 2003); as mumumbicinas, isoladas de *Streptomyces* NRRL 30562, com largo espectro contra bactérias Gram-positivas, como *B. anthracis*, e contra *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente e *Plasmodium falciparum*. As kakadumicinas, isoladas de *Streptomyces* sp. NRRL 30566 apresentaram atividade antimalárica e antimicrobiana para bactérias Gram-positivas (CASTILLO et al., 2002).

Enquanto as coronamicinas, antibióticos peptídicos produzidos por *Streptomyces* sp. MSU-2110, também revelaram atividade antimalárica, além de antifúngica (EZRA

et al., 2004). No trabalho desenvolvido por Shimizu et al., (2004), a linhagem *Streptomyces* sp. R-5, identificada como *Streptomyces galbus*, produziu duas substâncias denominadas actinomicinas X₂ e fungicrominas, ativas contra *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

No Brasil, a pesquisa de *Actinomycetes* e *Streptomyces* com ação antimicrobiana tem sido realizada em alguns Estados. Em Recife-Pernambuco, um Instituto foi criado com esta finalidade em 1952, o Instituto de Antibióticos de Pernambuco. Semêdo e colaboradores (2001) isolaram e caracterizaram *Actinomycetes* do solo brasileiro. As amostras de solo foram coletadas da região típica do Cerrado de Brasília - DF e de duas Florestas do Rio de Janeiro - RJ, isolando-se 18 colônias com atividade antimicrobiana, sendo 16 delas, caracterizadas como *Streptomyces*.

Em Araraquara, Bachiega et al., (2005), isolaram 64 cepas de estreptomicetos, das quais 34 apresentaram atividade antimicrobiana e uma resultou na caracterização de um antibiótico antifúngico. Em várias amostras de solo do Brasil foram isolados antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos em meios experimentais (UJIKAWA, 2003).

No Estado da Paraíba, Vieira et al., (2002), avaliou as propriedades antimicrobianas de 133 cepas de *Streptomyces* spp., isolados de solos, evidenciando o antagonismo entre as cepas de *Streptomyces* silvestres e amostras bacterianas como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

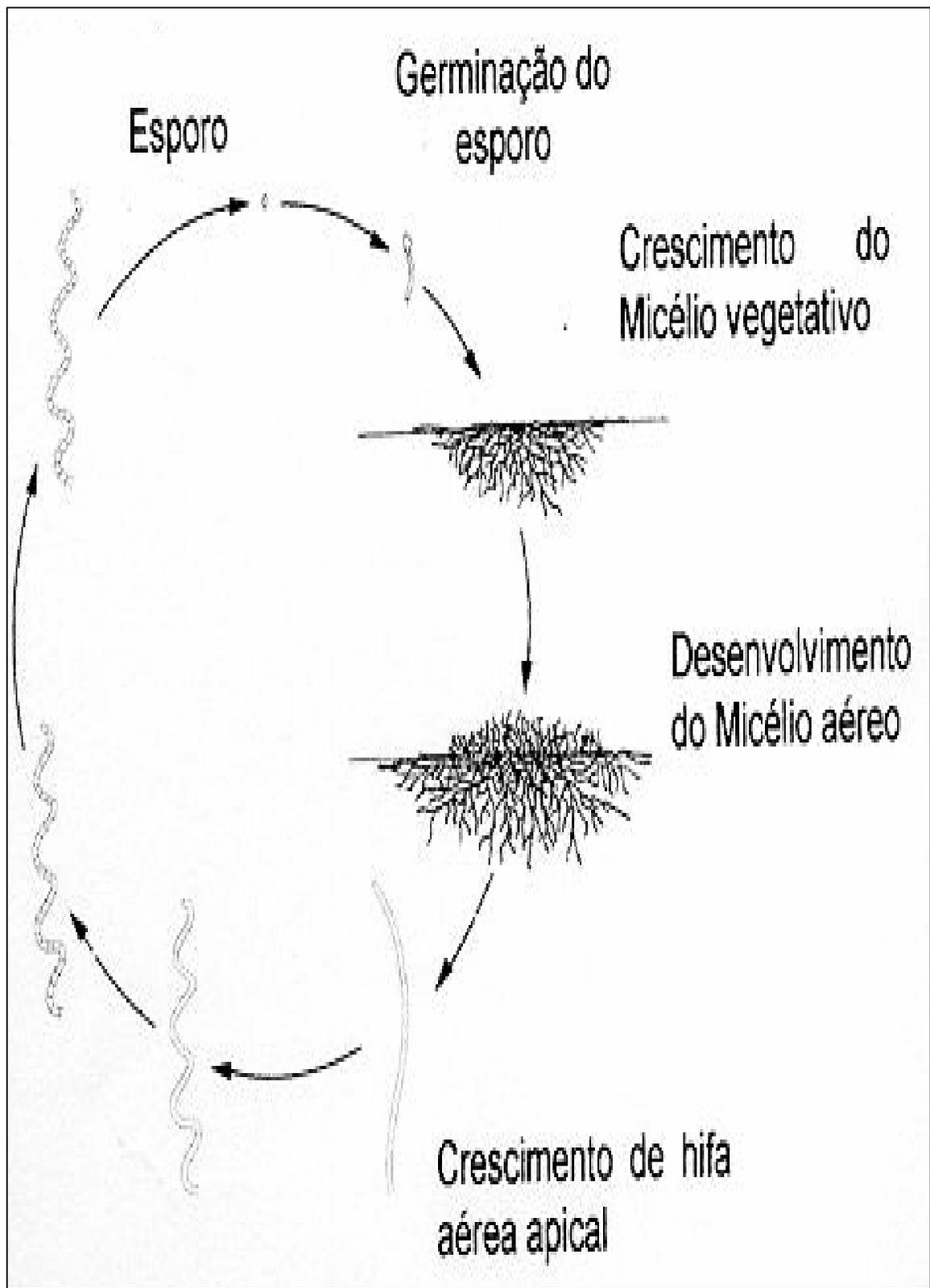


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (CHATER, MERRICK, 1979).

3.4 Características genéticas de cepas de *Streptomyces* sp.

Mediante análises dos fragmentos de restrição, eletroforese e de cromossomas diferentes espécies de *Streptomyces* como *S. coelicolor* (KIESER, 1992; LIN, 1993), *S. ambofaciens* (LEBLOND, 1990), *S. lividans* (LEBLOND, 1993), *S. griseus* (LEZHAVA, 1995) e o *S. rimosus* (PANDZA, 1997), apresentaram linearidade em relação ao seu genoma (LIN; 1993), assim com um tamanho aproximado de 08 Mb.

Pensava-se que o tamanho do genoma das espécies de *Streptomyces* spp. não pudessem apresentar nem grande número de regiões codificantes (ROBINSON, 1981), como também, de repetições em seu ADN (SHREMPF, 1999). Foi verificada também a presença de seqüências repetidas e invertidas nas extremidades dos cromossomos muito instáveis podendo facilmente induzir a formações de inverções e deleções, permitindo assim a codificação aleatória ou não para formação de novos compostos (REDENBACH, 1996). Bentley (2002) apresentou o completo sequenciamento do genoma do *S. coelicolor* A3(2) com 8.667.507 pares de bases, elucidando suposições propostas em vários estudos relacionados a este actinomiceto (Tabela 2).

Tabela 2. General features of the chromosome

Component of chromosome	Property
Total size	8,667,507 bp
Terminal inverted repeat	21,653 bp
G + C content	72.12%
Coding sequences	7,825
...of which pseudogenes	55
Coding density	88.9%
Average gene length	991 bp
Ribosomal RNAs	6 × (16S–23S–5S)
Transfer RNAs	63
Other stable RNAs	3

Fonte: Bentley (2002).

3.5 Geografia do Estado da Paraíba

A Paraíba é uma das 27 unidades federativas do Brasil. Está situada a leste da região Nordeste e tem como limites o estado do Rio Grande do Norte ao norte, o Oceano Atlântico a leste, Pernambuco ao sul e o Ceará a oeste, ocupando uma área de 56.439 km². A capital é João Pessoa e outras cidades importantes são Campina Grande, Santa Rita, Guarabira, Patos, Sousa, Cajazeiras e Cabedelo. O relevo é modesto, mas não muito baixo, 66% do território se encontra entre 300 e 900 m de altitude (RODRIGUES, 2004).

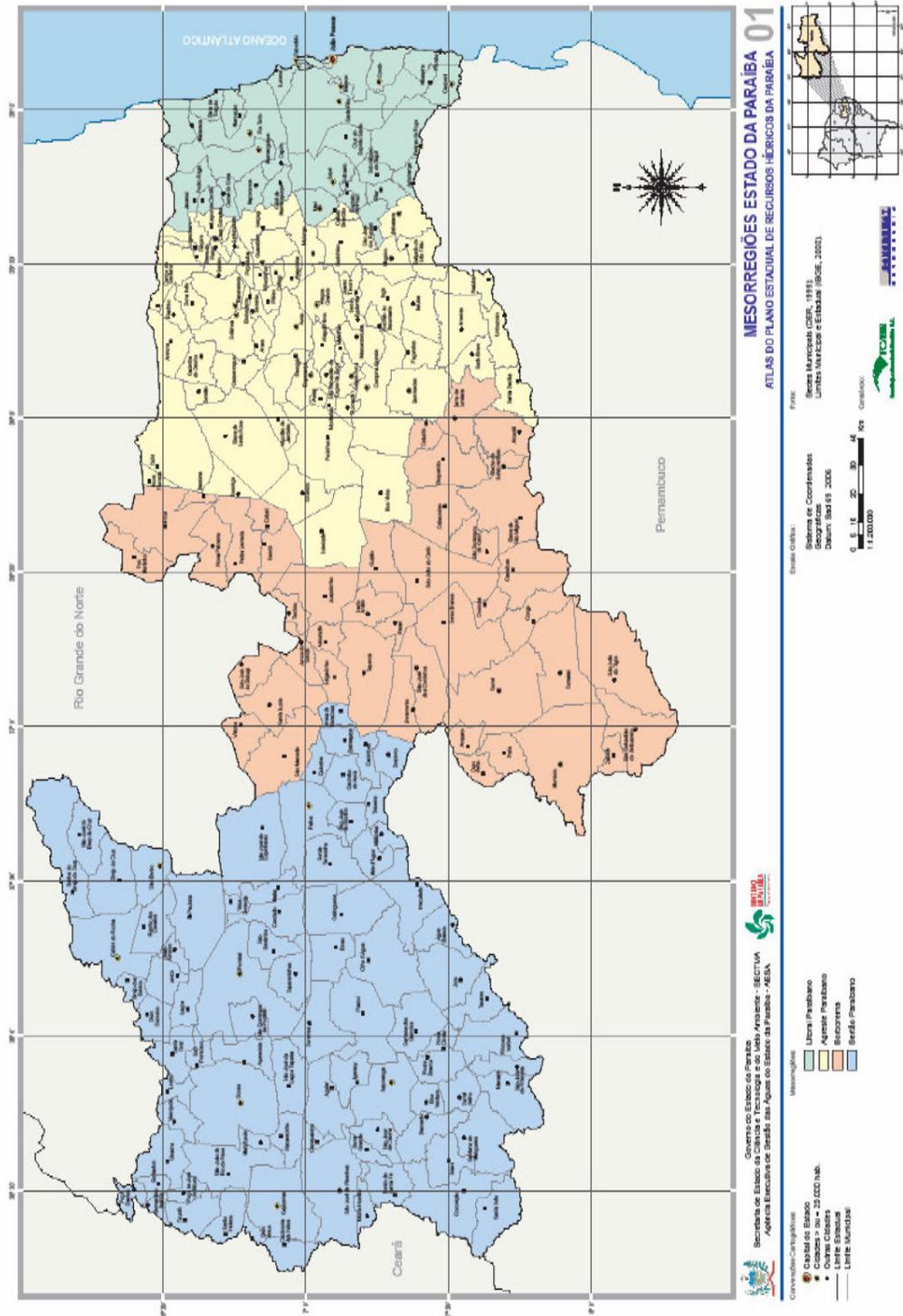
Na Paraíba situa-se o ponto mais oriental das Américas, conhecido como a Ponta do Seixas, em João Pessoa, devido a sua localização geográfica privilegiada (extremo oriental das Américas). A economia do estado é baseada na agricultura (cana-de-açúcar, abacaxi, mandioca etc), na indústria (alimentícia, têxtil, sucroalcooleira), na pecuária e no turismo (NASCIMENTO, 2006).

Seus principais rios são o Paraíba, Piranhas, Taperoá, Mamanguape, Curimataú, Gramame, Espinharas, Paraíba e Sanhauá (Figura 3). Alguns destes rios cortam o estado em diferentes mesorregiões (Litoral Paraibano, Agreste Paraibano, Borborema e Sertão Paraibano), (Figura 4), modificando não só o curso como o tipo de solo e a caracterização geográfica. Segundo Atecel, (2002), os tipos de solos encontrados no Estado da Paraíba estão apresentadas na (Figura 5), gerada a partir do uso de imagens Landsat (escala 1:100.000) com apoio de fotografias aéreas (1:70.000) e trabalho de campo. Essas classes e suas áreas de abrangência estão relacionadas na Tabela 2. de acordo com (NASCIMENTO, 2006).

Tabela 3. Tipos de solos encontrados no Estado da Paraíba

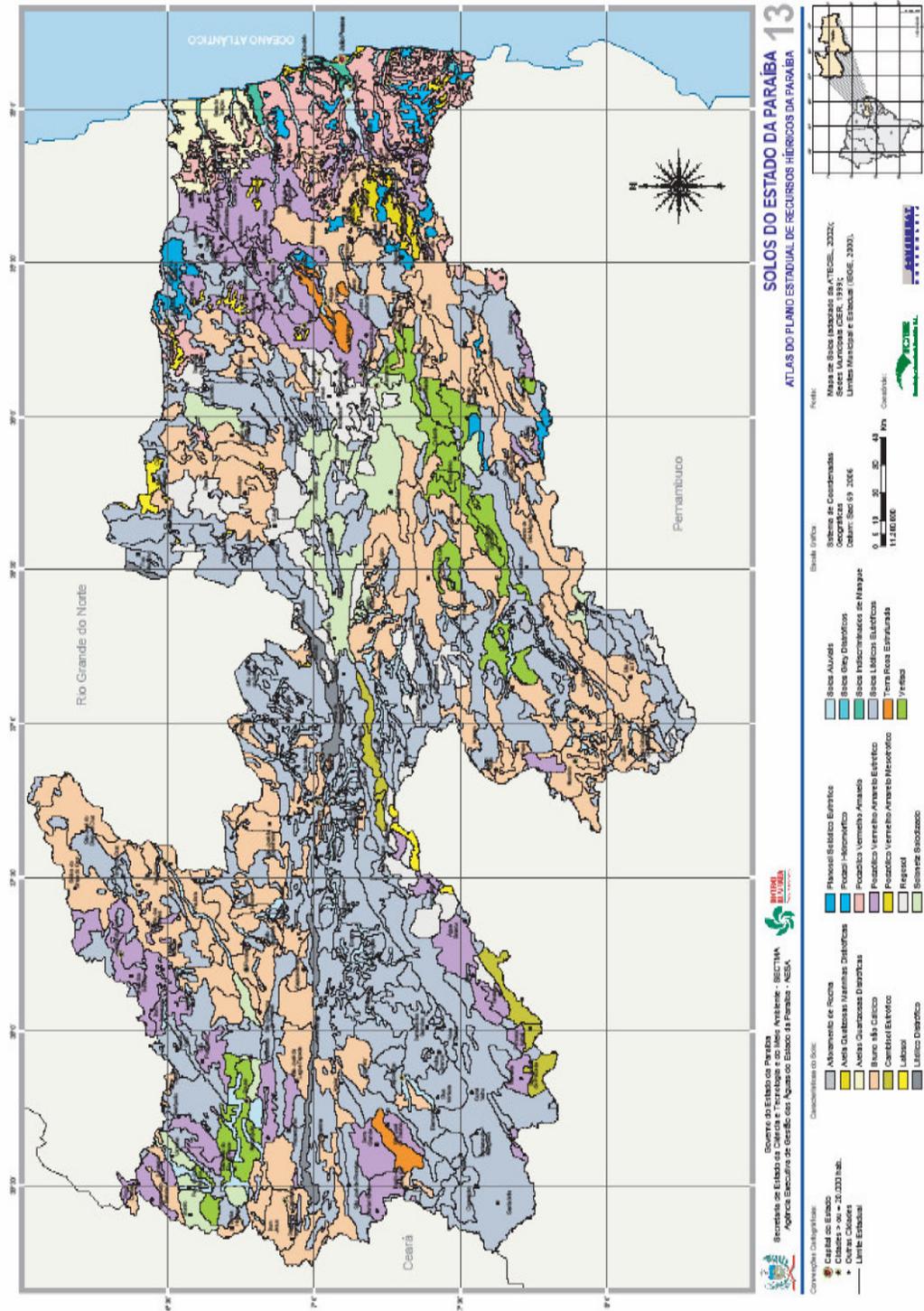
Classes de Solos	Área Total (km ²)	Participação (%)
Afloramento de Rocha	144,96	0,26
Areias Quartzosas	661,21	1,17
Bruno não Cálcico	14.645,40	25,95
Cambissolo	476,39	0,84
Latossolo	335,93	0,60
Litólico	22.074,96	39,11
Planossolo	486,25	0,86
Podzol Hidromórfico	278,03	0,49
Podzólico Vermelho Amarelo	8.105,56	14,36
Regossolo	2.694,17	4,77
Solonetz Solodizado	2.244,46	3,98
Solos Aluviais	1.905,63	3,38
Solos Gley Distróficos	23,78	0,04
Solos Indiscriminados de Mangue	144,96	0,26
Terra Roxa Estruturada	302,67	0,54
Vertissolo	1.915,49	3,39
Total Geral	56.439,84	100,00

Fonte: ATECEL, (2002).



Fonte: ATECEL, (2002).

Figura 4. Distribuição das mesorregiões do Estado da Paraíba.



Fonte: ATECEL, (2002).

Figura 5. Tipos de solos do Estado da Paraíba.

ARTIGO 04

Avaliação da atividade antitumoral, antiinflamatória e toxicidade aguda de extratos obtidos de *Streptomyces* spp. isolados de solos paraibanos.

04



**Avaliação da atividade antitumoral, antiinflamatória e toxicidade
aguda de extratos obtidos de *Streptomyces* spp isolados de solos
paraibanos**

*Thompson Lopes de Oliveira¹, Edeltrudes de Oliveira Lima², Ivone Antonia de Souza³,
Luis Conrado Z. Cornejo⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Av. Arthur de Sá, s/n,
Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB, Av. Castelo Branco, s/n, Cidade
Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

³Departamento de Antibióticos, UFPE, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia (ICBM) - Facultad de Medicina - Universidad de Chile,
A, da Independencia 1027, Santiago, Chile.

RESUMO: Metabólitos bioativos produzidos por *Streptomyces* spp. comumente apresentam uma diversidade farmacológica com propriedades antibiótica, antitumoral, enzimática e anti-helmíntica. O estudo avaliou o possível efeito antitumoral, antiinflamatório e o grau da toxicidade dos extratos isolados de *Streptomyces* em modelos experimentais com animais. Os extratos Sp-1 e Sp-3, não apresentaram nenhum efeito antiinflamatório. No modelo Sarcoma 180 os efeitos dos extratos Sp-1 e Sp-3 foram significativos com uma diminuição na média dos pesos dos tumores na dose de 10 mg. kg¹, com redução em até 73% do peso inicial do tumor implantado. Para tumores de Carcinoma de Ehrlich, as doses administradas não revelaram efeito significativo sobre o peso médio dos tumores. Efeitos estimulantes, tais como exoftalmia, agitação, reação de fuga, irritabilidade, tremores e dermatites foram observadas após 1 hora das administrações, reações depressivas foram observadas,

como: prostração e diminuição da frequência respiratória no mesmo intervalo, e não foram evidenciados óbitos.

Unitermos: *Streptomyces*, extratos, atividade, toxicidade, antitumoral.

ABSTRACT: “**Evaluation of activity anti-tumour, anti-inflammatory and the acute toxicity of the extracts obtained from *Streptomyces* spp isolated from paraibano soils**”. Bioactive metabolites produced by *Streptomyces* spp. commonly exhibit variety pharmacological properties with antibiotic, antitumor, enzyme and anti-helminth. The study evaluated the possible effect of anti-tumor, anti-inflammatory and degree of toxicity of extracts isolated from *Streptomyces* in experimental models with animals. The extracts Sp-1 and Sp-3 did not have anti-inflammatory effect. In Sarcoma 180 model the effects of the extracts Sp-1 and Sp-3 were significant with a decrease in the average weights of the tumors in the dose of 10 mg. kg¹, with a reduction of up to 73% of initial weight of the implanted tumor. For tumors of Ehrlich Carcinoma, the doses revealed no significant effect on the average weight of tumors. Stimulant effects, such as exophthalmia, agitation, reaction of escape, irritability, tremors and dermatitis were observed after 1 hour of administrations, depressive reactions were observed, such as: prostration and decreased respiratory rate, and no deaths were highlighted.

Key-words: *Streptomyces*, extract, activity, toxicity, antitumour.

INTRODUÇÃO

O câncer é considerado a segunda principal causa de morte humana no mundo ocidental (Otto, 2002). A incidência média desta enfermidade é de aproximadamente 10 milhões de casos por ano, com 05 milhões de óbitos. Estima-se que mais de 15 milhões de novos casos irão existir até 2020 em todo o planeta, com uma variabilidade de lesões ainda maior. No Brasil, em 2006, foi computado quase meio milhão de casos entre homens e mulheres acometidos em diferentes sítios anatômicos (Otto, 2002; Cozzi, 2003; Who, 2005; Inca, 2007).

Câncer é a denominação genérica para as neoplasias malignas. Neoplasia, por sua vez, significa “crescimento novo” e define condições de proliferação celular anormal, encontrada nos tumores benignos e malignos (Nakagawa, 2000).

O câncer é mais freqüentemente diagnosticado e mais prevalente nos indivíduos mais velhos. A maioria dos casos é diagnosticada após os 65 anos. Todavia, a incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados com múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição à carcinógenos ambientais (Brasil, 2002).

Entre os *Actinomycetos* microrganismos de solo que em condições especiais podem atingir até 95 % da população, os *Streptomyces* destacam-se por sua versatilidade na produção de metabólitos secundários, cujas aplicações biotecnológicas enquadram nas mais diversas áreas (Vinning, 1990).

Entre as substâncias elaboradas pelos *Streptomyces* estão os antibióticos, enzimas, inibidores enzimáticos, substâncias antihelmínticas, antifúngicas, imunomoduladores e os antibióticos antitumorais como a daunorrubicina e doxirrubicina, largamente empregadas no tratamento quimioterápico de diversos tipos de tumores, com o inconveniente de apresentarem um elevado nível de toxicidade e um alto custo na produção (Monneret, 2001).

O ciclo de vida dos *Streptomyces* é atípico iniciando com o processo de germinação dos esporos, originando um micélio formado por hifas ramificadas que penetram no substrato metabolizando fontes orgânicas através das enzimas extracelulares (Padilla, 1998).

Durante a diferenciação morfológica das hifas aéreas, é ativado o metabolismo secundário iniciando a produção de metabólitos bioativos principalmente antibióticos e enzimas (BIBB, 1996). Dessa forma, tanto os metabólitos primários (fase de crescimento) quanto os secundários produzidos por *Streptomyces* apresentam grande importância econômica, industrial e biotecnológica.

Qualquer que seja a razão ecológica para a produção de antibióticos pelos *Streptomyces*, provavelmente para minimizar a competição entre outros microrganismos, a espécie humana tem colhido os benefícios deste processo e eles têm revolucionado a terapêutica médica (Madigan et al., 1996). Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral, antiinflamatória e o grau de toxicidade de extratos obtidos a partir dos *Streptomyces* de solos do Estado da Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e isolamento de colônias de *Streptomyces* spp

Foram coletadas 68 amostras de solo do leito dos principais rios que formam as bacias hidrográficas no Estado da Paraíba, distribuídos nas seguintes mesorregiões: Litoral Paraibano, Agreste Paraibano, Borborema e Sertão Paraibano. Utilizando-se recipientes estéreis retirou-se cerca de 300 g de amostra do solo entre 1-9 cm de profundidade. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir de 10 g de cada amostra homogeneizada até 10^{-7} diluição em solução fisiológica estéril. Após 15 minutos de agitação em vortex, foram semeadas as três últimas diluições em alíquotas, 0,1 mL do sobrenadante em meio de cultivo Kuster-Willians (1964). Posterior a incubação a 28° C por 05 dias, as colônias com características de *Streptomyces* foram isoladas, e identificadas por meio de microcultivo, testes fisiológicos e ensaios citoquímicos (Serrano, 1992; Garcia-Quintana, 1997).

Preparação dos extratos a partir dos *Streptomyces*

Após triagem antimicrobiana através do método de difusão em meio sólido com bloco de Agar Ichikawa et al., (1971), as cepas SP1 e SP3 apresentaram os melhores resultados entre todas e seguiram na realização dos testes frente a espécies fúngicas. As linhagens foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ISP-2 e incubadas em estufa BOD a 30°C por 05 dias. Após incubação, blocos de gelose (06 mm) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL do meio ISP-2. iniciou-se incubação sob agitação (180 rpm), a 28°C por 48 horas. Posteriormente,

10% (v/v) deste pré-inóculo para cada linhagem foi transferido para Fernbach, contendo cada 300 mL do meio ISP-2 e cultivados por 48 horas sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Após fermentação foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para a separação do líquido fermentado da massa celular.

Para a extração dos princípios ativos de cada líquido fermentado foi utilizado como solvente o etanol. Utilizou-se uma proporção de 1:2 dos líquidos fermentados, seguido da agitação durante 20 minutos em *shaker*. Foi realizada a separação das fases, uma orgânica composta pelo solvente com o princípio ativo extraído, e outra aquosa que consistiu na fase aquosa do líquido esgotado. Em seguida, as fases de cada cepa teste com os princípios ativos foram concentradas em evaporador rotatório, e mantidas em dessecador.

Animais

Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, sob o número 23076.021019/2008-77.

Atividade antiinflamatória

O ensaio foi realizado segundo o método de Winter et al., (1962). Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus navegicus*) com 60 a 90 dias, com peso entre 250 ± 50 g. Os animais, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas

claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), foram privados de alimento por um período de 12 horas antes do experimento, recebendo água *ad libitum*.

O edema foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar da pata esquerda posterior dos animais pertencentes aos grupos controle, padrão e tratados. Trinta minutos antes da injeção de carragenina os animais do grupo tratado receberam doses dos extratos Sp-1 e Sp-3 nas concentrações de 10, 15 e 20 e 25 mg. Kg⁻¹, o grupo padrão foi tratado com a indometacina 10 mg. Kg⁻¹ e o grupo controle, com solução salina a 0,9%, todos por via oral. Em seguida, em cada hora foram quantificados os volumes das patas com edema, perfazendo um total de 6 horas de observação. Os resultados foram expressos com a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (Vf) e o volume inicial (Vi), representados pela fórmula Vf-Vi.

Atividade antitumoral

A implantação de tumores sólidos de Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich foi realizada conforme a técnica descrita por Stock et al (1954), e modificada por Komiyama (1992). O tratamento iniciou 48 horas após o implante com a administração intraperitoneal dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* nas concentrações de 2,5 mg, 5,0 mg e 10 mg. Kg⁻¹ nos grupos tratados, Metotrexato (10 mg. Kg⁻¹) no grupo padrão e solução salina a 0,9 % nos grupos controle. As doses foram administradas via IP e os pesos dos animais foram mensurados diariamente durante um período de oito dias.

No nono dia, os animais foram pesados, eutanasiados e os tumores extirpados. A inibição do crescimento tumoral foi calculada em comparação ao grupo controle após pesagem dos tumores.

Toxicidade aguda e Determinação da DL₅₀

Para avaliar a toxicidade aguda dos extratos etanólicos Sp-1 e Sp-3, foram utilizados camundongos fêmeas albinos Swiss (*Mus musculus*), com idade entre 60- 90 dias e peso variando entre 25 a 35 g, divididos em grupos de seis animais por gaiola. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, recebendo água *ad libitum*, obedecendo às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). As doses administradas dos extratos foram nas doses de: 2,5, 5,0, 10, 15 e 20 mg. Kg⁻¹ por via intraperitoneal e oral, nas mesmas concentrações. Os animais foram observados por um período de 48 horas após as administrações das doses e, os óbitos neste período foram contabilizados para o cálculo da DL₅₀, segundo o método preconizado por Karber, (1964).

Triagem Farmacológica

Realizaram-se também triagens farmacológicas dos efeitos gerais de cada dose administrada com a finalidade de correlacionar tais efeitos comportamentais a uma ação sobre Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Após os tratamentos, os animais foram observados em um período de 60 minutos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA - Bonferroni, e considerados significativos com $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da toxicidade aguda com extratos Sp-1 e Sp-3, em doses que variaram entre 2,5 e 20 mg. Kg⁻¹ pelas vias I.P e V.O, não houve registro de óbitos e, desta forma, não foi possível determinar a DL₅₀. Na triagem farmacológica com os extratos Sp-1 e Sp-3 pela via intraperitoneal observar-se em ambos uma atividade exacerbada em nível de Sistema Nervoso Central, sendo descritos comportamentos estimulantes em escala máxima na primeira hora como: piloereção, movimentos estereotipados, reação de fuga, aumento da frequência respiratória, contorções abdominais e agressividade (Tabela 1 e 2). Na via oral observaram-se comportamentos semelhantes comparando com a via intraperitoneal, evidenciando apenas a diminuição de algumas reações comportamentais como a postura de ataque e número de convulsões (Tabela 2).

Comparando-se os extratos Sp-1 e Sp-3, quanto ao efeito estimulador, o Sp-3 apresentou-se menos excitante quando comparado ao Sp-1. Todavia, sugere-se que extratos possuam uma ação estimulante seguido por uma ação depressora sobre o Sistema Nervoso Central.

Na determinação da possível atividade antiinflamatória, não foram evidenciados resultados para os extratos Sp-1 e Sp-3, onde ambos não conseguiram diminuir os níveis inflamatórios induzidos nos grupos de animais, caracterizando desta forma para a constituição química dos extratos a possibilidade de inexistência ou ineficácia de grupamentos com fins antiinflamatórios.

Na atividade antitumoral com o modelo Sarcoma 180, evidenciamos dados confortantes a partir dos testes com os extratos Sp-1 e Sp-3 em doses de 10 mg. kg¹, onde estes apresentaram valores significativos com redução na média do peso dos tumores em até 73 % do tumor implantado, comparando com o grupo controle (Gráfico 1). Para o grupo controle tratado apenas com salina a 0.9 % os tumores apresentaram crescimento esperado, e para o grupo padrão tratado com a droga Metrotexato a 2,5 mg.kg¹, os valores encontrados foram esperados segundo literatura. Na análise macroscópica dos animais do grupo tratado com os extratos Sp-1 e Sp-3, foram evidenciadas alterações importantes como hepato-esplenomegalia e ascite.

No ensaio com o modelo de tumor Carcinoma de Ehrlich os extratos etanólicos Sp-1 e Sp-3, não apresentaram valores de inibição significativos na média dos pesos dos tumores dos grupos tratados em relação ao grupo controle (Gráfico 2). Após análises macroscópicas, observou-se a presença de esplenomegalia e hepatomegalia. A atividade antitumoral evidenciada no ensaio frente ao modelo Sarcoma 180, revela a presença de possíveis constituintes, ou grupamento químico relacionados à atividade antitumoral. Segundo Asfora et al., (1972), ensaios frente ao Carcinoma Sarcoma de Walker 256 e Sarcoma de Yoshida, o grupo antraciclina isolado de *Streptomyces* mostrou-se ser um forte grupo inibidor de neoplasias em até 79 % na média do peso dos tumores. Asfora et

al., (1972), avaliou a atividade da retamicina como opção no tratamento anti-leucêmico, demonstrando um efeito na redução da patologia, em termos de melhora do estado do paciente e regressão nos sintomas. Caracterizou quimicamente o complexo retamicina por meio de cromatografia a fim de identificar grupamentos mais ativos e menos tóxicos. A maioria das frações apresentou elevada toxicidade e inibição tumoral de até 70 % sobre os modelos (Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich e Carcinosarcoma de Yoshiba) (Asfora et al., 1972). Outros trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de encontrar novas rotas, novas drogas ou melhoramento na obtenção do complexo antraciclina-retamicina a partir de estreptomicetos (Pamboukiam; Martins et al., Guimarães et al., 2004).

Em geral, os metabólitos bioativos a partir de *Streptomyces* apresentam o inconveniente do baixo rendimento na produção e o alto nível de toxicidade. A continuidade desta pesquisa visa complementar através de elucidação química os possíveis grupamentos responsáveis pela redução tumoral do Sarcoma 180, estabelecer ensaios frente a outros tumores, bem como, definir formas de purificar os extratos e melhorar o rendimento.

REFERÊNCIAS

Asfora, JJ, Santana, CF, and Lima, OG, 1972. Primeiras observações com o uso da Retamicina em pacientes portadores de leucemias agudas. *Revista do Instituto de Antibióticos*, vol. 12, pag. 89-99.

Bibb, M 1996. The regulation of antibiotic production of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology*, v.142, p.1335-1344.

BRASIL, 2002. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Ações de Enfermagem para o Controle do Câncer: Uma proposta para integração ensino-serviço*. 2 ed. Rio de Janeiro: 340p.

Cozzi, P 2003. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. *II Farmaco*. v. 58, n.3, p. 213-220.

Garcia-Quitana, H, Zaror, CL, Leiva, PS 1997. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. *Rev. Med. Chile*, v.125, p.1157-1164.

Guimarães, LM, Furlan, RLA, Garrido, LM, Ventura, A, Padilla, G, Faciotti, MCR 2004. Effect of pH on the production of the antimumor the antibiotic retamycim by *Streptomyces olindensis*. *Biotech. Appl. Biochem.*, 40 (1), 101-107.

INCA 2007. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: Acesso em janeiro de 2008.

Ichikawa T, Ishikura T, Osaki A 1971. Improvement of kasugamycin - Producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* v.16, n.3, p. 218-224.

Kaber, G.e Behrens, B 1964. *Statistical methods in biological assays*. London: Griffin
Ch. An C.

Kuster, E, Williams, ST 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*.
Nature (London), v. 202, p.928-929.

Komiyama K, Funayama S 1992. Antitumor agents. In: Omura S. (edt). The search for
bioactive compounds from microorganisms. *Spriger-Verlag* pag: 79-97.

Madigan, TM, Martinho, JM, Parquer, J 1996. *Biology of microorganisms*. New Jersey:
Prentice-Hall.

Martins, RA, Guimarães, LM, Pamboukiam, CR, Tonso, A, Faciotti, MCR, Schimidell,
W, 2004. The effect of dissolved oxygen concentration control on cell growyh and
antibiotic retamycim production in *Streptomyces olindensis* So20 fermentatioons. *Braz.*
J. Chem. Eng., 21(2), 185-192.

Monneret, C, 2001. Recente developments in the filder antitumor Antracyclines.
Europen Journal of Medical Chemistry. .36, n.06, p.483-493.

Nakagawa, WT, Lopes, A 2000. Conceitos Básicos em Oncologia. In: AYOUB, A.;
FRIAS, M.; BARROS, M, KOBAYASHI, R. *Bases da Enfermagem em Quimioterapia*,
São Paulo: LEMAR, p.1-19.

Otto, S 2002. *Enfermagem Prática: Oncologia*. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso,
p.526.

Padilla, G 1998. Biologia Molecular de *Streptomyces* e Aplicações Industriais. In: Melo, IS, Azevedo JL. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna EMBRAPA CNPMA.

Pamboukiam, CRD, Faciotti, MCR, 2004. Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of the *Streptomyces olindensis*. *Process Biochem.* 39, 2249-2255.

Serrano, JA, Sandoval, H 1992. Técnicas para el aislamiento y diagnóstico de los *Actinomycetales*. *Manual de Laboratorio*. Valdivia: Facultad de Medicina U.A.L

Stock, CC, Sugiura, K, 1954. The Effect of Phosphoramides on the Growth of a Variety of Mouse and Rats Tumors. *Cancer Research* 2: 38-50.

Vining, LC. 1990. Functions of secondary metabolites. *Annual Review Microbiology*. v.44, p. 395-427.

Winter, CA, Risley, EA, Nuss, GW, 1962. Carrageenan-Induced O Edema In Hind Paw Of The Rat As An Assay For Anti-Inflammatory Drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*, V. 111, P. 544 – 547.

WHO - World Health Organization 2005. *Cancer*. Disponível em: www.who.int/cancer/en/ acesso em janeiro de 2006.

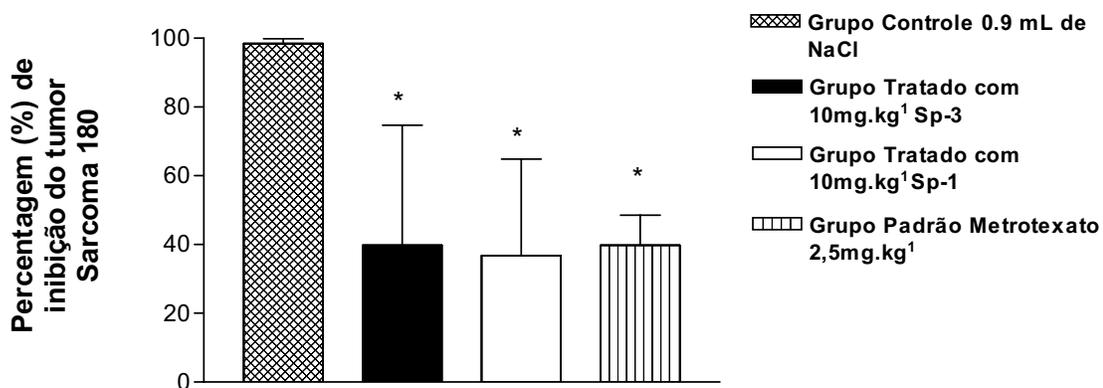


Gráfico 1. Percentagem de inibição da média dos pesos dos tumores em animais tratados com os extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* administrados por via intraperitoneal sobre o modelo experimental Sarcoma 180 em camundongos. Os valores representam à média \pm desvio padrão. * $p < 0,01$ comparado os grupos tratados com o controle que recebeu solução salina a 0,9 %. ANOVA - Bonferronis ($n = 2/\text{grupo}$).

Legenda

mL - mililitro

mg - miligrama

Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos

Kg - kilogramas

% - percentagem

NaCl - Cloreto de sódio

n - número da amostra

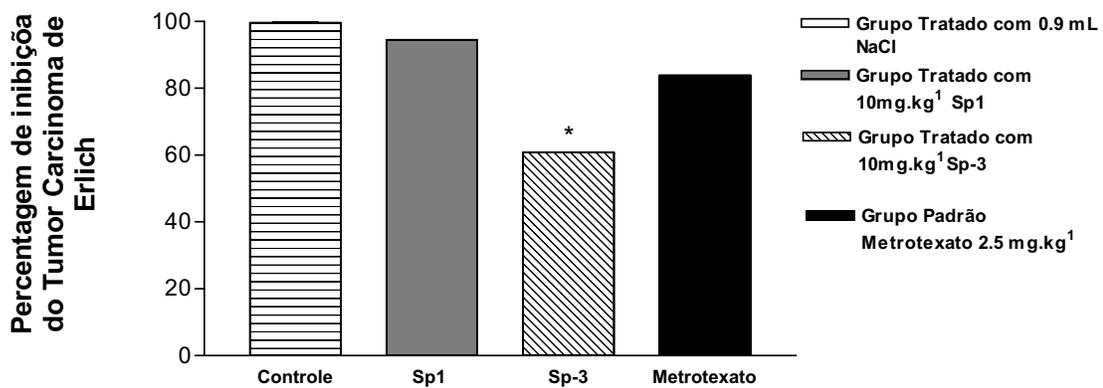


Gráfico 2. Percentagem de inibição da média dos pesos dos tumores em animais tratados com os extratos Sp-1 e Sp-3, administrados por via intraperitoneal, sobre o modelo experimental Carcinoma de Ehrlich em camundongos. $p < 0.05^*$. O controle recebeu solução salina a 0,9%. ANOVA - Bonferronis ($n = 2/\text{grupo}$).

Legenda

- mL - mililitro
- mg - miligrama
- Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos
- Kg - kilogramas
- % - percentagem
- NaCl - Cloreto de sódio
- n - número da amostra

Tabela 1. Efeitos farmacológicos dos ensaios preliminares de toxicidade dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp, administrados por via intraperitoneal. (n=5/grupo)

Extratos	Sp-1					Sp-3					
	Ação Farmacológica/Dose mg.kg ¹ Via - IP	2,5	5,0	10	15	20	2,5	5,0	10	15	20
Efeitos Estimulantes											
Aumento da Frequência Respiratória	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Piloereção	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	
Movimentos Estereotipados	+++	+++	++	++	++	+	++	++	+++	+++	
Convulsão	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postura de Ataque	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Agitação	+++	+++	++	++	++	+++	+	+	+	+	
Movimento de Vibrissas	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Exoftalmia	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Efeitos Depressores											
Alteração de Marcha	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Diminuição da Frequência Respiratória	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sonolência	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sistema Nervoso Autônomo											
Diarréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cianose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Salivação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Micção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lacrimejamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Contorções abdominais	+	++	++	+	+++	+	+	++	++	++	
Agressividade	++	+	++	++	++	+	+	++	++	+	
Diurese	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Outros											
Dermatites	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	
Reação de Fuga	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	++	
Espasmos	+++	+++	+	+	++	+	++	++	++	++	

+++ Efeito intenso; ++ Efeito moderado; + Efeito leve; - Ausência de efeito. (Malone, 1977).

IP - intraperitoneal

Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos

mg - miligramas

kg - kilogramas

Tabela 2. Efeitos farmacológicos dos ensaios preliminares de toxicidade dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp, administrados por via oral. (n=5/grupo).

Extratos	Sp-1					Sp-3					
	Ação Farmacológica/Dose mg.kg ¹ VO	2,5	5,0	10	15	20	2,5	5,0	10	15	20
Efeitos Estimulantes											
Aumento da Frequência Respiratória		++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
Piloereção		+++	+++	+++	++	+++	+	+	+	++	++
Movimentos Estereotipados		+++	++	++	++	++	+	++	++	+++	+++
Convulsão		++	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Postura de Ataque		++	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Agitação		+++	++	++	++	+++	+	+	++	++	++
Movimento de Vibrissas		-	-	-	-	++	-	+	-	-	-
Exoftalmia		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Efeitos Depressores											
Alteração de Marcha		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diminuição da Frequência Respiratória		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sonolência		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sistema Nervoso Autônomo											
Diarréia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cianose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salivação		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Micção		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções abdominais		+++	+++	+++	++	+++	+	++	++	++	++
Agressividade		+	+	+	++	++	+	+	++	+	+
Diurese		+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Outros											
Dermatites		+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++
Reação de Fuga		++	++	++	++	+++	+	+	++	++	++
Espasmos		++	++	++	++	++	-	+	+	+	+++

+++ Efeito intenso; ++ Efeito moderado; + Efeito leve; - Ausência de efeito. (Malone, 1977).

VO - via oral

Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos

mg - miligramas

kg - kilogramas

ARTIGO 05

Atividade antifúngica sobre leveduras e cinética de morte microbiana de extratos isolados de *Streptomyces* spp. obtidos em solos paraibanos

05



Atividade antifúngica sobre leveduras e cinética de morte microbiana de extratos isolados de *Streptomyces* spp obtidos em solos paraibanos

**Thompson Lopes de Oliveira¹, Edeltrudes de Oliveira Lima², Ivone Antonia de Souza³, Luis Conrado Z. Cornejo⁴*

^{1,5}Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Av. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB, Av. Castelo Branco, s/n, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

³Departamento de Antibióticos, UFPE, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia (ICBM) - Facultad de Medicina - Universidad de Chile, A, da Independencia 1027, Santiago, Chile.

RESUMO: Após *screening* antimicrobiano por meio da técnica de difusão em meio sólido com blocos de Agar, foram preparados extratos a partir de espécies de *Streptomyces* spp produtores de metabólitos bioativos, respectivamente cepa SP1 e SP3, isoladas de solos paraibanos. Os ensaios avaliaram a atividade antifúngica frente a espécies de leveduras de coleção e de origem clínica por meio das técnicas de difusão com discos em meio sólido e microdiluição, bem como, cinética de morte microbiana para duas cepas testes. Os halos de inibição obtidos a partir dos extratos Sp-1 e Sp-3 apresentaram efeito inibitório com valores superior aos halos de inibição promovidos pela droga padrão. As concentrações inibitórias mínimas na microdiluição foram expressivas com valores fungicidas variando entre 10 mg e 0,15625 mg. Na cinética de morte microbiana, as atividades dos extratos Sp-1 e Sp-3 resultaram em dados estatisticamente significativos frente às cepas testes.

Unitermos: Extratos, atividade antifúngica, leveduras.

ABSTRACT: “Antifungal activity on yeasts and kinetics of microbial death of extracts isolated from *Streptomyces* spp of soil paraibano”. After screening antimicrobial through technical means of dissemination in with solid blocks of agar, were prepared in extracts the species the *Streptomyces* micro producers of bioactive metabolites, respectively SP1 and SP3, paraibano isolated from soil. The tests evaluated the antifungal activity against species of yeasts collection of home and clinic, using through testing of diffusion disc in solid medium, microdilution and kinetics of microbial death of tests for two strains. The halos of inhibition obtained from extracts of Sp-1 and Sp-3 showed inhibitory effect with values greater than the halos of inhibition promoted by the drugs patterns. The minimum inhibitory concentrations in expressive with microdilution were fungicides values ranging from 10 mg and 0.15625 mg. In the kinetics of microbial death, the activities of the extracts Sp-1 and Sp-3 resulted in statistically significant data front of strains tested.

Key-words: Extract, antifungic activity, yeast.

INTRODUÇÃO

Os fungos podem se apresentar como patógenos primários, capazes de causar infecção sem fatores predisponentes, como também como patógenos oportunistas, manifestando seu potencial em hospedeiros imunologicamente ou fisiologicamente comprometido, características estas inclusas as leveduras do gênero *Candida* spp (Haynes, 2001). Algumas espécies de *Candida* spp. compõe a microbiota normal da pele, cavidade bucal, trato digestório, secreções brônquicas e trato genitourinário vivendo como organismos comensais. Todavia, em situações ocasionais estes

microrganismos comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções, desde lesão em mucosas superficiais até disseminações sistêmicas e invasivas (Lacaz, 2002).

Drogas azólicas e antibióticos poliênicos constituem os recursos terapêuticos mais comumente empregados no tratamento das candidíases (Galle, 2004). Entretanto, constantes recidivas de manifestações de *Candida* na boca, pele e outros sítios, inclusive em portadores da AIDS veêm despertando a busca por novas drogas (Lee, 2002).

As substâncias antibióticas são exemplos de metabólitos secundários produzidos por certos microrganismos que possuem a capacidade de inibir o crescimento de seres microbiológicos, quando utilizados em baixas concentrações (Nolan, 1988).

Do grande número de antibióticos conhecidos de origem microbiana, somente 123 são produzidos atualmente por fermentação. Além disto, mais de 50 antibióticos são produzidos como compostos semi-sintéticos e 03 antibióticos são sinteticamente produzidos. Entre as bactérias, a maior variedade em estruturas e número de antibióticos é encontrada nos actinomicetos, especialmente no gênero *Streptomyces* (Furlan, 1997; Sant' Ana, 2002).

O isolamento de novos actinomicetos, principalmente *Streptomyces*, com atividade antifúngica tem sido apontado com grande entusiasmo no descobrimento de novos agentes antifúngicos com potencial de emprego terapêutico. Este isolamento está intimamente associado a técnicas clássicas que promovem a seleção por meio de técnica

de diluição e inoculação em Agar com posterior utilização de fungos como alvos de seleção (Martin, 1986).

O estudo teve como objetivo determinar a atividade antifúngica de extratos obtidos de espécies nativas de *Streptomyces* spp, isolados dos solos de mesoregiões do Estado da Paraíba, contra leveduras do gênero *Candida* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e isolamento de colônias de *Streptomyces* spp

Foram coletadas 68 amostras de solo do leito dos principais rios que formam as bacias hidrográficas no Estado da Paraíba, distribuídos nas seguintes mesoregiões: Litoral Paraibano, Agreste Paraibano, Borborema e Sertão Paraibano. Utilizando-se recipientes estéreis retirou-se cerca de 300 g de amostra do solo entre 1-9 cm de profundidade. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir de 10 g de cada amostra homogeneizada até 10^{-7} diluição em solução fisiológica estéril. Após 15 minutos de agitação em vortex, foram semeadas as três últimas diluições em alíquotas, 0,1 mL do sobrenadante em meio de cultivo Kuster-Willians (1964). Posterior a incubação a 28° C por 05 dias, as colônias com características de *Streptomyces* foram isoladas, e identificadas por meio de microcultivo, testes fisiológicos e ensaios citoquímicos (Serrano, 1992; Garcia-Quintana et al., 1997).

Preparação dos extratos a partir dos *Streptomyces*

Após triagem antimicrobiana através do método de difusão em meio sólido com bloco de Agar Ichikawa et al., (1971), as cepas SP1 e SP3 apresentaram os melhores resultados entre todas e seguiram na realização dos testes frente a espécies fúngicas. As linhagens foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ISP-2 e incubadas em estufa BOD a 30°C por 05 dias. Após incubação, blocos de gelose (06 mm) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL do meio ISP-2. Em seguida, iniciou-se incubação sob agitação (180 rpm), a 28°C por 48 horas. Posteriormente, 10% (v/v) deste pré-inóculo para cada linhagem foi transferido para Fernbach, contendo cada 300 mL do meio ISP-2 e cultivados por 48 horas sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Após fermentação foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para a separação do líquido fermentado da massa celular.

Para a extração dos princípios ativos de cada líquido fermentado foi utilizado como solvente o etanol. Utilizou-se uma proporção de 1:2 dos líquidos fermentados, seguido da agitação durante 20 minutos em *shaker*. Foi realizada a separação das fases, uma orgânica composta pelo solvente com o princípio ativo extraído, e outra aquosa que consistiu na fase aquosa do líquido esgotado. Em seguida, as fases com os princípios ativos foram concentradas em evaporador rotatório, e mantidas em dessecador.

Microrganismos e meios

As linhagens utilizadas neste estudo foram o *Candida albicans* ATCC 13803, *Candida krusei* LM-12, *Candida tropicalis* LM-37 e *Candida albicans* ATCC 76485. As espécies foram mantidas em meio Sabouraud dextrose (DIFCO) sob refrigeração para os fungos leveduriformes.

Ensaio de atividade antimicrobiana

Foram preparados inóculos em solução salina estéril a 0,89 % das linhagens testes das espécies fúngicas, ajustadas na escala de Mc Farland (01×10^8 UFC/mL), mantidas a temperatura ambiente. A atividade inibitória foi verificada pelas técnicas difusão com discos em meio sólido (Bauer et al., 1966) e microdiluição (Nccls, 2002). No primeiro ensaio foi adicionado em uma placa de Petri estéril 01 mL de cada microorganismo-teste, seguido de 20 mL do meio Sabouraud dextrose fundido a 45° C. Após solidificação, foram embebidos discos de papel de filtro com 30 µL de cada extrato em uma concentração de 10 mg/mL e colocados sobre a superfície do meio de cultura contendo os microrganismos-testes. As placas foram incubadas a 35° C por 48 horas. Após incubação os halos foram medidos e comparados com a droga controle, no caso a cetoconazol 50 µg/mL.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando-se placas de ELISA com 96 poços estéreis. Foram distribuídos 100 µL de caldo Sabouraud dextrose nos orifícios das placas, exceto na linha 10. Em seguida, foram dispensados 100 µL de cada extrato em

cada placa em uma concentração de 20 mg/mL nas cavidades da primeira linha, resultando em uma concentração de 10mg/mL. Seguindo o processo de diluição seriada, foi retirada 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Nos orifícios de cada coluna foram dispensados 10 µL do inóculo correspondente a cada cepa ensaiada. A linha 11 foi reservada para o controle negativo (caldo Sabouraud inoculado com cetoconazol 50 µg/mL), e a linha 12 para o controle positivo (caldo Sabouraud inoculado) com a levedura correspondente. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada extrato, incubados a temperatura de 35° C por 24-48 horas. A leitura e determinação da CIM dos extratos Sp-1 e Sp-3, sobre as cepas testes, foram realizadas através do método visual, observando a formação ou não do aglomerado celular, considerando assim a CIM a menor concentração do produto em teste capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Para a confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias foi utilizado o corante Resazurina (Sigma-Aldrich) em 10 µL (0,01%) para cada cavidade, positivo para a mudança de coloração do azul para o vermelho (Leite et al., 2000; Palomino et al., 2002; Banfi et al., 2003).

Determinação da cinética microbiana

O estudo da interferência das concentrações inibitórias mínimas dos extratos Sp-1 e Sp-3 sobre a viabilidade das cepas fúngicas foi realizado por meio do método de contagem de células viáveis (UFC/mL) para a levedura *Candida albicans* ATCC 13803 e *Candida tropicalis* LM 37 . Os intervalos ensaiados foram de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. Inicialmente 01 mL da suspensão de cada levedura na escala de Mc Farland 01×10^8 UFC/mL, foi inoculado em tubos de ensaios com 04 mL de caldo Sabouraud com concentração ajustada para 10 mL, seguida, de 05 mL das soluções

testes Sp-1 e Sp-3, com concentração determinada a partir da concentração inibitória mínima (CIM). Após incubação nos tempos determinados, uma alíquota de 01 mL de cada suspensão foi diluída seriadamente em salina estéril até a 10^{-5} , e uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo ágar Sabouraud dextrose incubando-se a 35° C por 48 horas. O controle com crescimento livre da droga padrão, onde a solução dos produtos testes foram substituídas por 05 mL de salina estéril, adicionada de 0,04 de Tween 80. Realizou-se o controle com o antifúngico cetoconazol 50 µg/mL para possibilitar a comparação entre os resultados obtidos pela ação dos extratos e o antifúngico sintético. Os ensaios foram realizados em triplicata (Rasooli, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos resultados da atividade antifúngica, que foi realizada por meio de duas técnicas obtivemos os seguintes dados. No ensaio de difusão com discos em meio sólido, o extrato Sp-1 apresentou atividade antifúngica com halos de inibição entre 23-32 mm. Comportamento semelhante foi observado com extrato Sp-3 com halos de inibição variando de 23-29 mm. Observar-se na Tabela 1. que a atividade inibitória da droga controle foi inferior aos extratos testados, expressos através dos halos de inibição, droga esta, utilizada comumente na terapia antifúngica, ressaltando a eficácia do efeito antagônico promovido pelos extratos. Estes resultados são concordantes com a literatura que mostra outros estudos realizados com cepas nativas de *Streptomyces* spp, a partir de solos no Brasil com atividades antifúngicas (Schlingmann et al., 1999; Bachiega et al., 2005).

Na microdiluição os extratos Sp-1 e Sp-3 apresentaram atividade inibitória em concentrações diferenciadas. O Sp-1 apresentou efeito antagônico em concentração inibitória mínima (CIM) de 0,15625 mg contra a espécie de *Candida tropicalis* LM 37 de origem clínica, bem como, em concentrações de 0,625 mg frente à *Candida albicans* ATCC 13803, e de maneira geral a concentração mínima de inibição contra todas as espécies foi de 1,25 mg (Tabela 2). O extrato Sp-3 apresentou valores semelhantes na avaliação do efeito inibitório frente às mesmas espécies de leveduras. Sua concentração inibitória mínima (CIM) contra a espécie de *Candida tropicalis* LM 37 de origem clínica também foi de 0,15625 mg e obteve um perfil de concentração inibitória mínima de 2,5 mg contra as amostras testadas (Tabela 2). Esta atividade antagônica é corroborada por substâncias também de origem natural como os óleos essenciais sobre amostras de *Candida* (Lima et al., 2006).

Nos testes realizados de atividade antifúngica por microdiluição, o grupo controle sem droga inibitória apresentou resultados esperados quanto ao crescimento. Para o controle com a droga antifúngica padrão as cepas de *Candida krusei* LM 12 e *Candida tropicalis* LM 37 tiveram seu crescimento impedido.

No ensaio da cinética de morte microbiana observar-se no gráfico 1. a ação dos extratos Sp-1 e Sp-3 frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 13803 na escala de (Log UFC/mL x tempo). As curvas em ambos os extratos apresentam valores significativos com inibição acentuada na primeira hora do teste, ressaltando uma atividade inibitória relevante dos extratos comparandos-se com o grupo controle. Na avaliação das curvas frente a cepa *Candida tropicalis* LM 37, observar-se para o extrato Sp-1 um efeito inibitório eminente a partir de trinta minutos do início do ensaio com continuidade da

atividade inibitória em escala significativa frente ao controle. Para o extrato Sp-3, os resultados inibitórios significativos são observados nos primeiros minutos do teste, com a formação de uma ligeira constante entre 30-60 minutos, e continuidade do antagonismo, observado pelo declínio da curva no decorrer do ensaio, comparando-se com o grupo controle. Os resultados evidenciam o comportamento majoritário dos *Streptomyces* spp. isolados de solos na produção de metabólitos bioativos, com característica inibitória frente a cepas de microrganismos patogênicos ao homem, apresentando um potencial a ser explorado em pesquisas envolvendo solos do Estado da Paraíba.

REFERÊNCIAS

Bachiega, GL, Vilegas, W, Ujikawa, K 2005. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* V.26, nº1, p. 29-37.

Banfi, E, Scialino, G, Monte-Bragadin 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.52: p. 796-800.

Bauer AW, Kirby MDK, Sheries JC, Truck, M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.

Furlan, RLA 1997. Obtenção e estudo de mutantes com produção alterada do antibiótico retamicina sintetizado por *Streptomyces olindensis*. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Galle LC, 2004. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *Bras Patol Med Lab.* 40 (04): 229-236.

Garcia-Quitana, H, Zaror, CL, Leiva, PS 1997. Efecto antibiotico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. *Rev. Med. Chile.*, v.125, p.1157-1164.

Haynes, K 2001. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology.* 9 (12): 591-596.

Kuster-Williams, ST 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. Nature (London), v.202, p.928-929.

Ichikawa T, Ishikura T, Osaki A 1971. Improvement of kasugamycin - Producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.*v.16, n.3, p.218-224.

Lacaz CS, Porto, E, Martins, JEC, Heins-Vaccari, EM, Melo, NT 2002. *Tratado de Micologia Médica*, 9ª ed. Savier, São Paulo.

Lee JY, Hwang BK 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 407-417.

Leite, CQF, Beretta, ALR, Anno, IS, Telles, MAS 2000. Standardization of Broth Microdilution method for *Mycobacterium tuberculosis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.1, p.127-129.

Lima, IO, Oliveira, RAG, Lima, EO, Farias, NMP, Souza, EL, 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Farmacog*, v. 16 p. 197-201.

Martin, JF, Liras, P, 1986. Biosynthetic pathways of secondary metabolites in industrial microorganism. In. Rehm, H.J.; Reed, G., (eds). *Biotechnology*. Weinheim, VCH., p.211-233.

Nccls 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Vilanova, *Nccls*. v.17, n. 9 (Document m 27-A2).

Nolan RD, Cross T 1988. Isolation and screening of Actiniomycetes *In*: Cross T (ed) *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London, p. 56-73.

Palomino, JC, Martin, A, Camacho, M, Guerra, H, Swings, Portales, F 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p.2720-22.

Rasooli, I, Mirmosfata, SA 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oil. *Fitoterapia*. 73:244-250.

Sant'Ana PJP, Assad AL 2002. O Contexto brasileiro para a bioprospecção. *Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento* 29: 32-37.

Serrano, JA; Sandoval, H 1992. *Tecnicas para el aislamiento y diagnóstico de los Actinomycetales*. Manual de Laboratorio. Valdivia: Facultad de Medicina U.A.L.

Schlingmann, G, Milne, L, Bordes, DB, Carter, GT 1999. Strevertenes, antifungal pentene macrolides produced by *Streptoverticillium* LL-30F848. *Tetrahedron*, v.55, p.5977-5990.

Tabela 1. Atividade antifúngica dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp. contra leveduras.

Espécies Fúngicas	Método de Difusão com Discos em Meio Sólido		
	Sp-1	Sp-3	Cetoconazol
<i>C. albicans</i> ATCC 13803	25	29	20
<i>C. krusei</i> LM-12	23	27	19
<i>C. tropicalis</i> LM-37	26	23	21
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	32	28	26

Legenda

Halos expressos em mm - milímetros
Cetoconazol 50 µg/mL - droga padrão
Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos
ATCC - America Type Culture Colection
LM - Laboratório de Micologia

Tabela 2. Atividade antifúngica em placas de microdiluição dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp contra espécies de *Candida* spp.

Extratos (mg/mL)	<i>Candida albicans</i> ATCC 13803	<i>Candida albicans</i> ATCC 13803	<i>Candida krusei</i> LM 12	<i>Candida krusei</i> LM 12	<i>Candida tropicalis</i> LM 37	<i>Candida tropicalis</i> LM 37	<i>Candida albicans</i> ATCC 76485	<i>Candida albicans</i> ATCC 6485
	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3
10 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
05 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
1,25 mg	-	-	-	-	-	-	-	+
0,625 mg	-	+	+	+	-	-	+	+
0,31250 mg	+	+	+	+	-	-	+	+
0,15625 mg	+	+	+	+	-	-	+	+
0,078125 mg	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle *	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle +Antifúngico**	+	+	-	-	-	-	+	+

Legenda

Halos expressos em mm - milímetros

**Cetoconazol 50 µg/mL - droga padrão

Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos

ATCC - America Type Culture Colection

LM - Laboratório de Micologia

Caldo Sabouraud + microrganismo* isento de droga

(-) Ausência de crescimento microbiano

(+) Crescimento microbiano

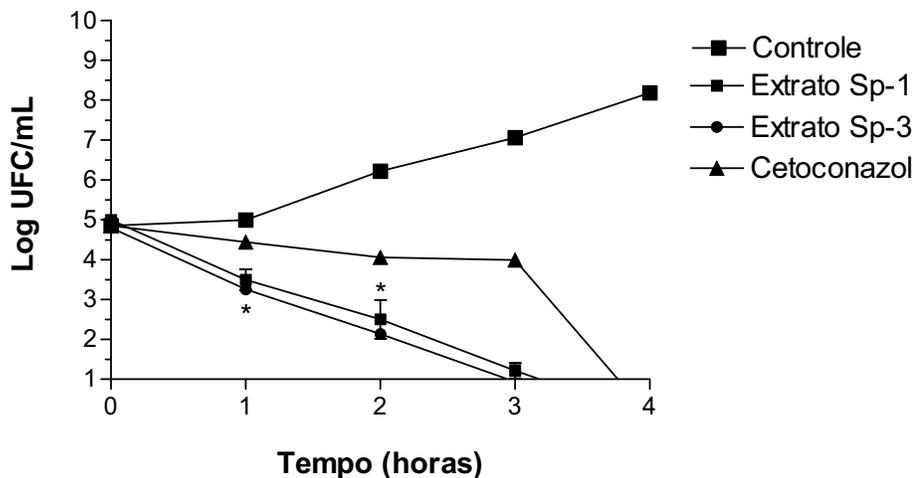


Gráfico 1. Curva de morte microbiana (Log UFC/mL x tempo) da cepa *Candida albicans* ATCC 13803, sob ação dos extratos Sp-1 e Sp-3 (156,25 µg/mL), e da droga padrão cetoconazol 50 µg/mL, controle sol. Salina 0,9%. ($p < 0.05$)*

Legenda

mL - mililitro
 mg - miligrama
 µg - micrograma
 Log - logarítimo
 Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos
 NaCl - Cloreto de sódio
 n - número da amostra

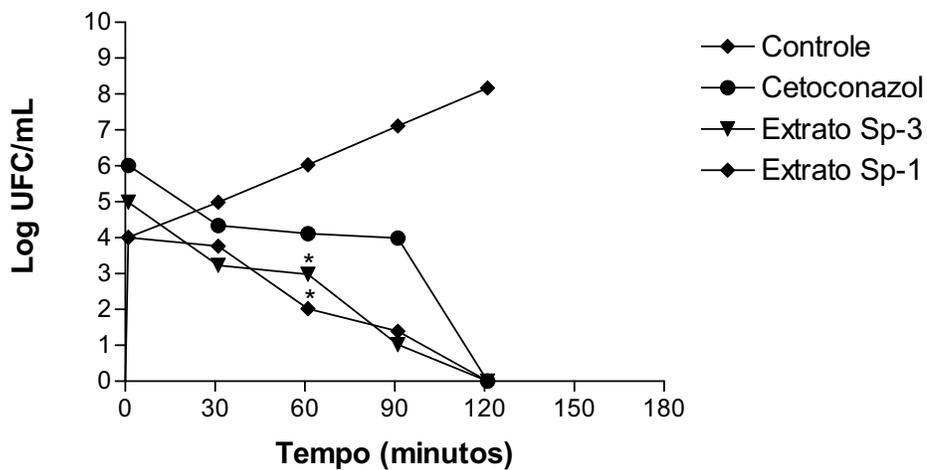


Gráfico 2. Curva de morte microbiana (Log UFC/mL x tempo) da cepa *Candida tropicalis* LM 37, sob ação dos extratos Sp-1 (625 µg/mL), Sp-3 (1250 µg/mL) e a droga padrão cetoconazol 50 µg/mL, controle sol. salina 0,9%. (p<0.05).*

Legenda

mL - mililitro
 mg - miligrama
 µg - micrograma
 Log - logarítimo
 Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos
 NaCl - Cloreto de sódio
 n - número da amostra

ARTIGO 06

Caracterização química do extrato etanólico isolado de *Streptomyces* spp. de solo paraibano

06



**Caracterização química do extrato etanólico isolado de *Streptomyces*
spp de solo paraibano**

**Thompson Lopes de Oliveira¹, Edeltrudes de Oliveira Lima², Ivone Antonia de Souza³, Luis Conrado Z. Cornejo⁴, Marcelo Sobral da Silva², Hellane Fabrícia S. Lucena².*

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Av. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB, Av. Castelo Branco, s/n, Cidade Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

³Departamento de Antibióticos, UFPE, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia (ICBM) - Facultad de Medicina - Universidad de Chile, A, da Independencia 1027, Santiago, Chile.

RESUMO: A cepa SP-1 foi isolada da mesorregião Litoral Paraibano do estado da Paraíba. Após realização de *screening* antimicrobiano, com resultados significativos, foi preparado o extrato da espécie selecionada, respectivamente extrato sp-1, apresentado um bom rendimento. Em seguida, realizou-se a Cromatografia em Coluna com o Sephadex LH-20, obtendo-se 13 frações. As frações foram monitoradas através da CCDA e reunidas a partir dos seus *R_f*s. A fração 09 apresentou um precipitado branco, sendo submetida à recristalização, obtendo-se o composto sp-1/09. Em continuidade, realizou-se a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono, Espectroscopia de Infravermelho, bem como, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a elucidação estrutural.

Unitermos: Extrato, frações, *Streptomyces*.

ABSTRACT: “Chemical characterization of the ethanol extract of *Streptomyces* spp isolated from soil paraibano”. The SP-1 strain was isolated from mesoregion Paraibano coast of the state of Paraíba. After carry out of antimicrobial screening, obtaining significant results, the extract was prepared from species selected; respectively extract sp-1, made a good income. Then there was the Column Chromatography with Sephadex LH-20, yielding 13 fractions. The fractions were monitored by CCDA and gathered from their Rfs. Fraction 09 showed a white precipitate, being subjected to recrystallization, resulting in the compound sp-1/ 09. In continuity, was held on Magnetic Resonance Nuclear Hydrogen and Carbon, Infrared Spectroscopy of, as well as the high performance Liquid Chromatography for the structural elucidation.

Key-words: Extract, fractions, *Streptomyces*.

INTRODUÇÃO

Nutricionalmente, fisicamente e biologicamente o solo é um complexo particular e de grande variação no meio ambiente. Os *Streptomyces* são entre todos, os mais numerosos e ubiqüitários microrganismos presentes no solo (Hodgson, 2000).

A importância dos *Streptomyces* para a ciência resulta na sua atividade metabólica sobre compostos orgânicos no solo, na sua notável capacidade produtiva de vários antibióticos naturais de uso contínuo, bem como, de muitas outras substâncias de uso farmacêutico como os agentes antitumorais e imunossupressores (Cole et al., 2001).

Tanto os metabólitos primários (enzimas produzidas durante a fase de crescimento), como os secundários produzidos por *Streptomyces* apresentam grande importância econômica e industrial. Estes microrganismos têm uma extraordinária capacidade para produzir grandes quantidades de enzimas de uso industrial, sendo as principais: oxiredutases, transferases, hidrolases, isomerases e sintases (Padilla, 1998). No caso dos metabólitos secundários mais de 6000 antibióticos foram descobertos nos últimos anos entre os quais, 65 % a 70 % são produzidos por *Streptomyces* (Araújo, 1998).

Dentre os antibióticos antifúngicos descobertos em anos recentes a partir de espécies de *Streptomyces*, destacam-se os polipeptídeos, macrolídeos, espirofunginas, kitamicinas, oligolicinas A, aminoacetophenone, antibióticos hepataenos e o novo nikomicim (Kim, 2003). O estudo objetivou a caracterização química do extrato sp-1 obtido da cepa *Streptomyces* spp (SP-1), isolada do solo paraibano.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e isolamento de colônias de *Streptomyces* spp

Foram coletadas 68 amostras de solo do leito dos principais rios que formam as bacias hidrográficas no Estado da Paraíba, distribuídos nas seguintes mesorregiões: Litoral Paraibano, Agreste Paraibano, Borborema e Sertão Paraibano. Utilizando-se recipientes estéreis retirou-se cerca de 300 g de amostra do solo entre 1-9 cm de profundidade. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir de 10 g de cada amostra homogeneizada até 10^{-7} diluição em solução fisiológica estéril. Após 15

minutos de agitação em vortex, foram semeadas as três últimas diluições em alíquotas, 0,1 mL do sobrenadante em meio de cultivo Kuster-Willians (1964). Posterior a incubação a 28° C por 05 dias, as colônias com características de *Streptomyces* foram isoladas, e identificadas por meio de microcultivo, testes fisiológicos e ensaios citoquímicos (Serrano, 1992; Garcia-Quintana et al., 1997).

Microrganismos utilizados no *screening* antimicrobiano

Após triagem antimicrobiana através do método de difusão em meio sólido com bloco de Agar Ichikawa et al., (1971), a cepa SP1 seguiu na realização dos ensaios de caracterização química. As linhagens utilizadas na triagem foram: *Aspergillus niger* LM 05, *Aspergillus fumigatus* ATCC 40640, *Trichophyton rubrum* ATCC 1683, *Trichophyton inkin* LM 067, *Candida albicans* ATCC 13803, *Candida krusei* LM-12, *Candida tropicalis* LM-37 e *Candida albicans* ATCC 76485. As espécies foram mantidas em meio Sabouraud dextrose (DIFCO) sob refrigeração para os fungos leveduriformes e a temperatura ambiente para fungos filamentosos.

Preparação dos extratos a partir da cepa *Streptomyces* spp (SP-1)

A linhagem foi semeada em placa de Petri contendo o meio ISP-2 e incubada em estufa BOD a 30°C por 05 dias. Após incubação, blocos de gelose (06 mm) foram transferidos para frasco de Erlenmeyer contendo 50 mL do meio ISP-2. Em seguida, iniciou-se incubação sob agitação (180 rpm), a 28°C por 48 horas. Posteriormente, 10% (v/v) deste pré-inóculo foi transferido para Fernbach, contendo 300 mL do meio ISP-2 e cultivado por 48 horas sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Após

fermentação foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para a separação do líquido fermentado da massa celular.

Para a extração do princípio ativo do líquido fermentado foi utilizado como solvente o etanol. Utilizou-se uma proporção de 1:2 do líquido fermentado, seguido da agitação durante 20 minutos em *shaker*. Foi realizada a separação das fases, uma orgânica composta pelo solvente com o princípio ativo extraído, e outra aquosa que consistiu na fase aquosa do líquido esgotado. Em seguida, a fase com o princípio ativo foi concentrada em evaporador rotatório, e mantida em dessecador.

Obtenção das frações

O processo de fracionamento partiu de 1,5 g do extrato sp-1 solubilizado em metanol. Posteriormente a amostra foi cromatografada em coluna de Sephadex (LH-20) eluída em metanol puro (Komori, 1990). As frações obtidas foram submetidas à análise em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), eluídas em sistemas de solventes em ordem crescente de polaridade e reunidas de acordo com seus *R_f*s.

Foi selecionada uma das frações, a qual foi submetida ao processo de recristalização com acetona por apresentar-se na forma de um precipitado branco. O composto foi submetido à Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ¹H e ¹³C), a Espectroscopia de Infravermelho e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), numa diluição de 20 µg/mL, utilizando o método isocrático (30:70/H₂O:MeOH). Todos os ensaios químicos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - LTF, Universidade Federal da Paraíba Campus I.

RESULTADOS E PERSPECTIVAS

Após o extrato sp-1 ter sido cromatografado foram recolhidas 13 frações em rendimento muito escasso. Pós-monitoramento em CCDA, a fração 09, apresentando-se como um precipitado de cor branca, com grau de pureza destacado, foi recristalizada originando o composto sp-1/09, visando minimizar as impurezas contidas.

Os espectros obtidos a partir dos testes realizados com o composto sp-1/09, apresentam grande complexidade, indicando apresentar uma grande estrutura e possivelmente a presença de impurezas (Pandey et al., 1976).

Após os experimentos químicos com o extrato sp-1, obteve-se frações com substâncias que estão sendo purificadas e submetidas a análise de IV, RMN C e H e Espectrometria em 2D e Massa, visando a elucidação estrutural de moléculas.

REFERÊNCIAS

- Araújo, JM, 1998. Estratégias para o isolamento de actinomicetos. In: MELO IS, AZEVEDO JS. Ecologia Microbiana. Jaguariúna. EMBRAPA CNPMA, p. 351-367.
- Cole, ST. et al., 2001. Massive gene decay in the leprosy *bacillus*. *Nature* 409, 1007-1011.
- Garcia-Quitana, H, Zaror, CL, Leiva, PS 1997. Efecto antibiotico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. *Rev. Med. Chile.*, v.125, p.1157-1164.
- Hodgson, DA, 2000. Primary metabolism and its control in *streptomycetes*: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42, 47–238.
- Kim, BS, & Hwang, BK, 2003. Biofungicides. In *Fungal Biotechnology in Agricultural Food and Environmental Applications*, p.123-133.
- Komori, T, 1990. Trichomycin B, a poliene macrolide from *Streptomyces*. *J Antibiot* 43 (7): 778-82.
- Kuster-Williams, ST 1964. Selection of media for isolation of *Streptomycetes*. *Nature* (London), v.202, p.928-929.

Ichikawa T, Ishikura T, Osaki A 1971. Improvement of kasugamycin - Producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* v.16, n.3, p.218-224.

Padilla, G, 1998. Biología molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: Melo, IS, Azevedo, JL (ed). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna. EMBRAPA; CNPMA, P.327-347.

Pandey, RC, Naramashimari, R, Rinehart, KLJ, Milington, DS 1976. Polyene antibiotics. IV-Structure of chain. *Jam Chem Soc.* 94(12):4306-10.

Serrano, JA; Sandoval, H 1992. *Técnicas para el aislamiento y diagnóstico de los Actinomycetales*. Manual de Laboratorio. Valdivia: Facultad de Medicina U.A.L.

Thompson
Vicente



Sample: Sp1-9
File: home/vnmr1/vnmrSYS/data/Thompson/Sp1-9_s2pul_03.fid

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: acetone
Temp. 30.0 C / 303.1 K
Operator: vnmr1
File: Sp1-9_s2pul_03
VNMR5-500 "varian500.ltf.ufpb.br"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 4.153 sec
Width 8503.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 499.5824594 MHz
DATA PROCESSING
Resol. enhancement -0.0 Hz
Ft size 131072
Total time 1 min, 23 sec

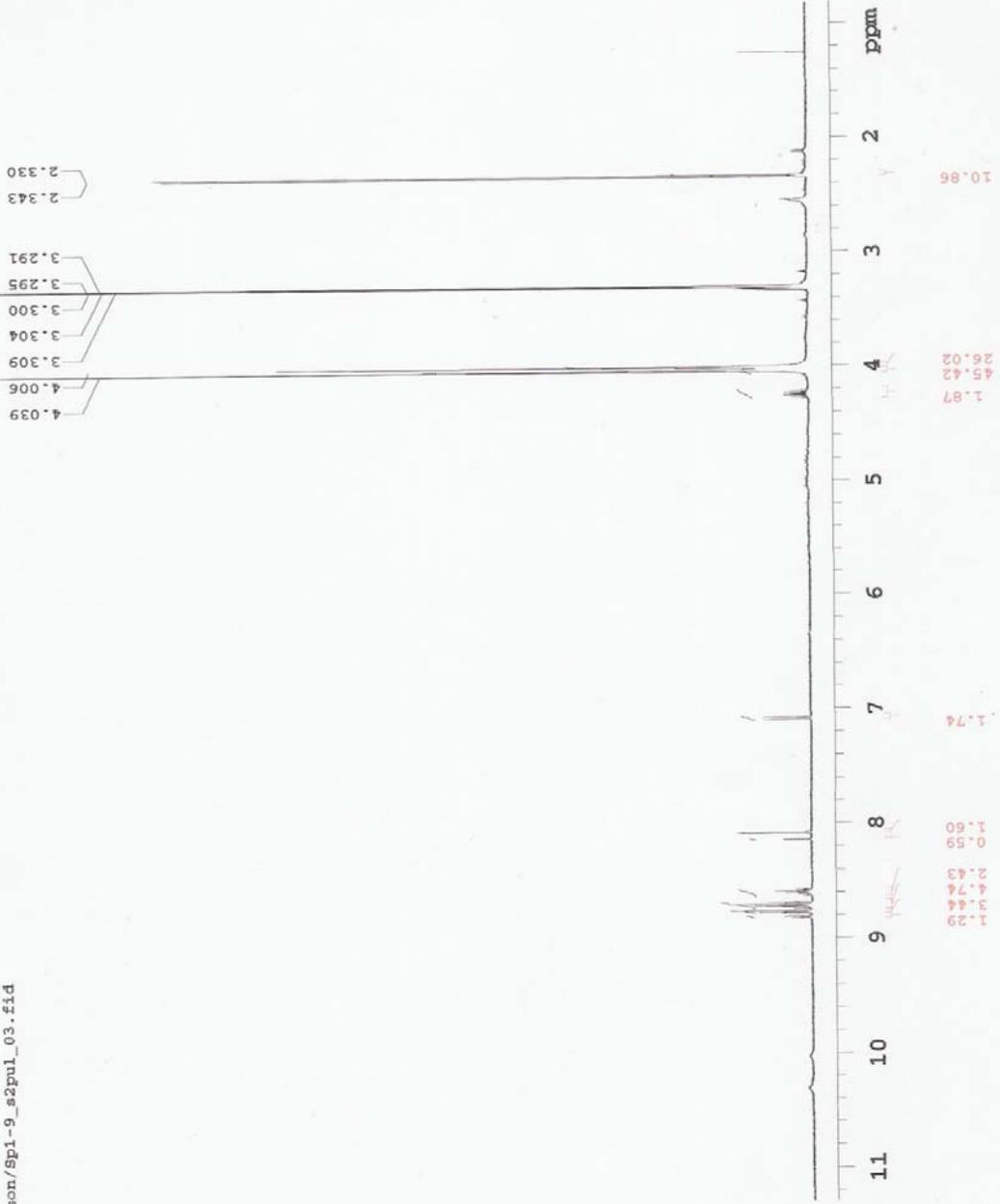


Figura 1. Espectro RMN ¹H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona

Thompson
Vicente



Sample: Sp1-9

File: home/vnmr1/vnmrSYS/data/Thompson/Sp1-9_s2pul_03.fid

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: acetone

Temp. 30.0 C / 303.1 K

Operator: vnmr1

File: Sp1-9_s2pul_03

VNMRS-500 "varian500.ltf.ufpb.br"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 4.153 sec

Width 8503.4 Hz

16 repetitions

OBSERVE H1, 499.5824594 MHz

DATA PROCESSING

Resol. enhancement -0.0 Hz

Ft size 131072

Total time 1 min, 23 sec

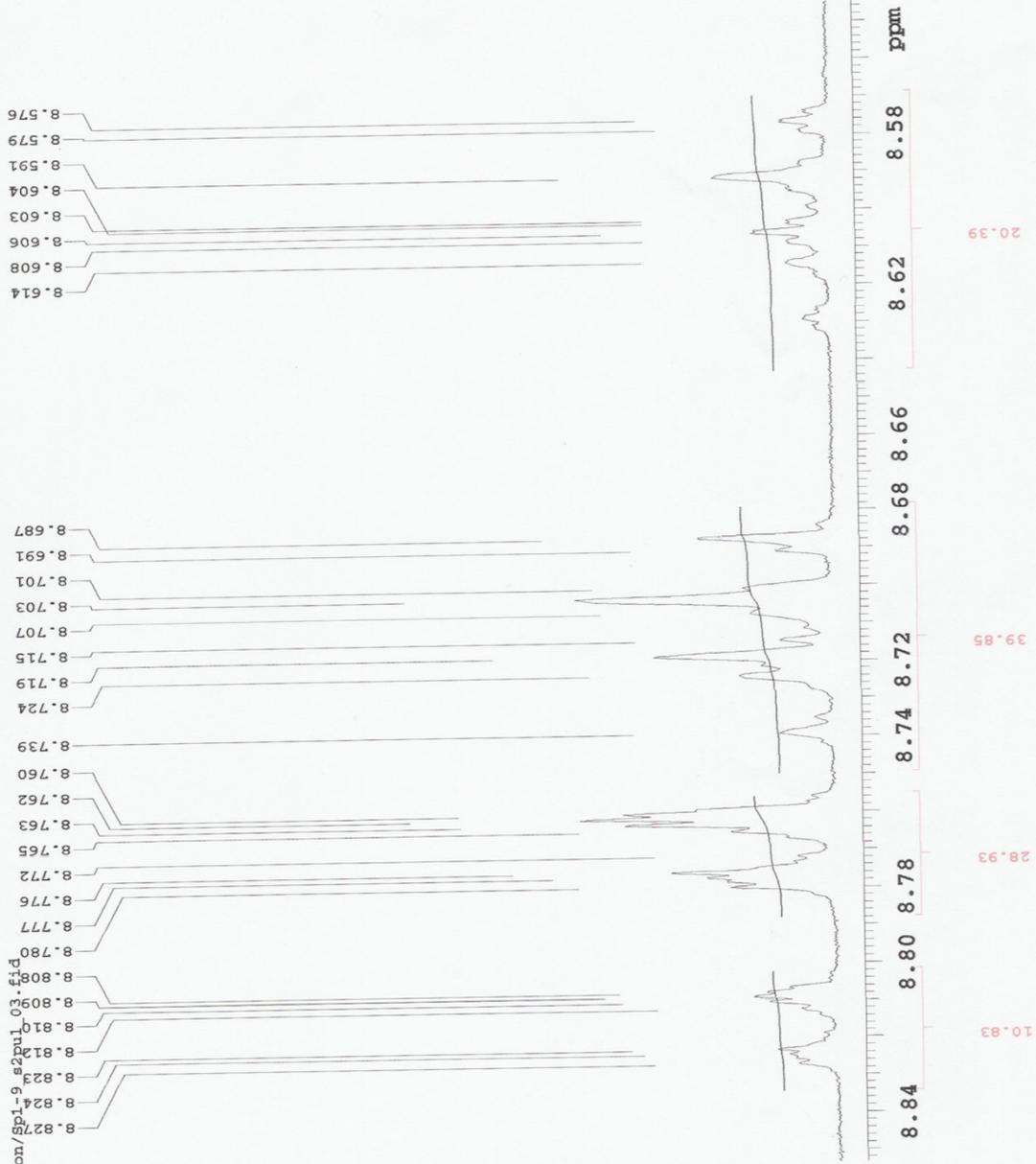


Figura 2. Expansão do espectro RMN H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona, na região entre 8,5 e 8,8 ppm

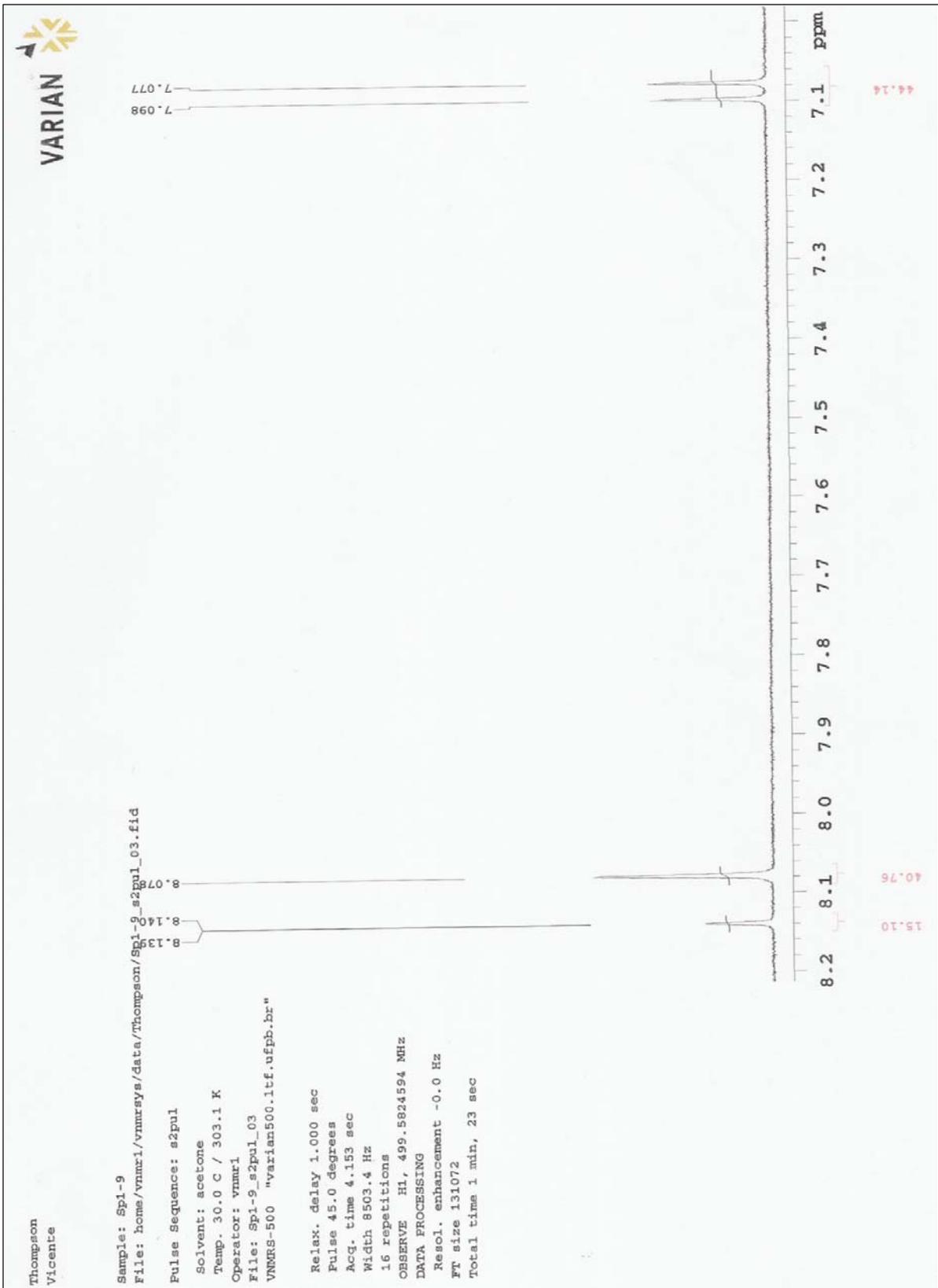


Figura 3. Expansão do espectro RMN H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona, na região entre 7,1 e 8,2 ppm

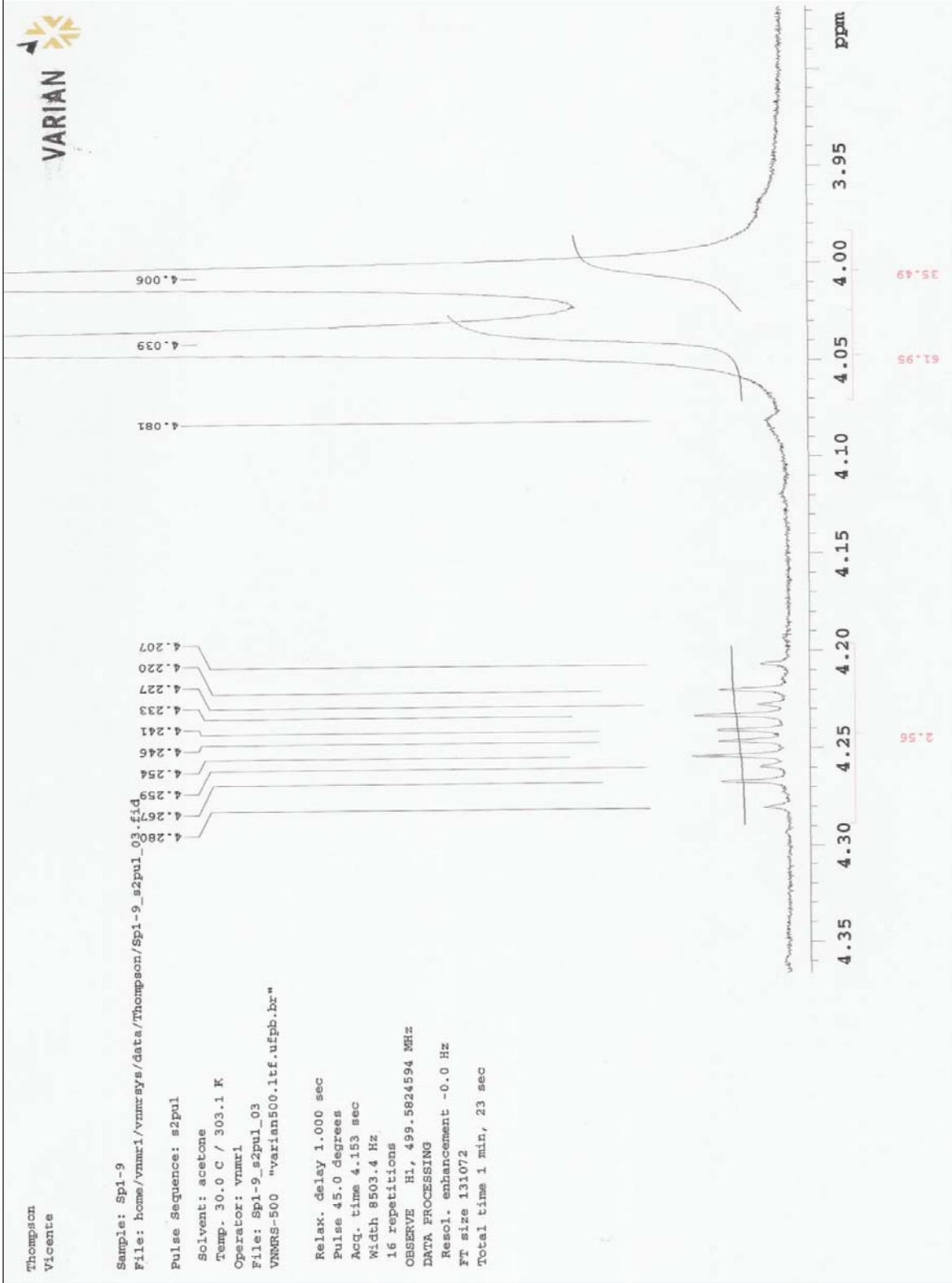


Figura 4. Expansão do espectro RMN H (500 MHz) de sp-1/09 em acetona, na região entre 3,9 e 4,3 ppm

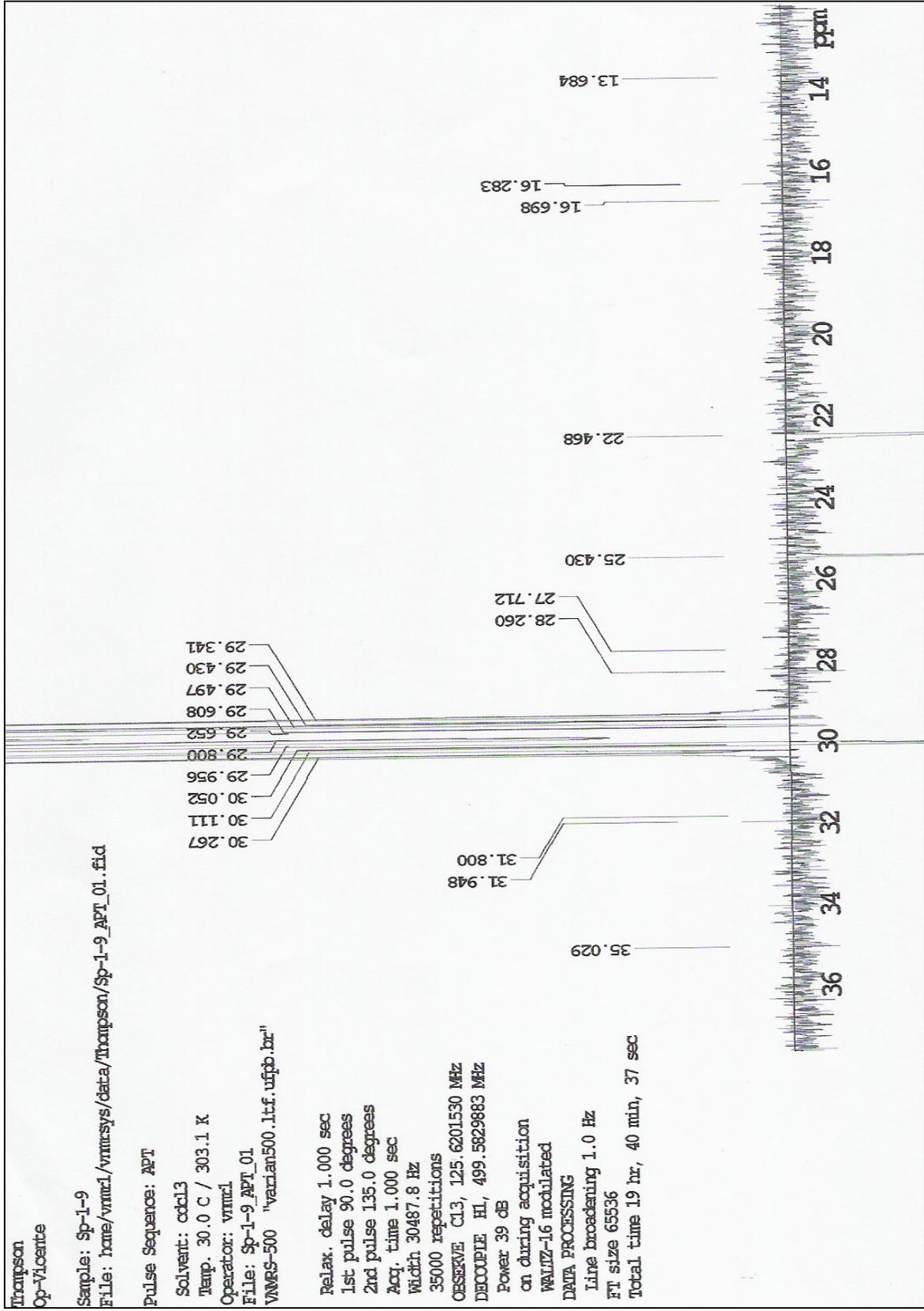


Figura 5. Espectro RMN ¹³C (500 MHz) de sp-1/09 em acetona

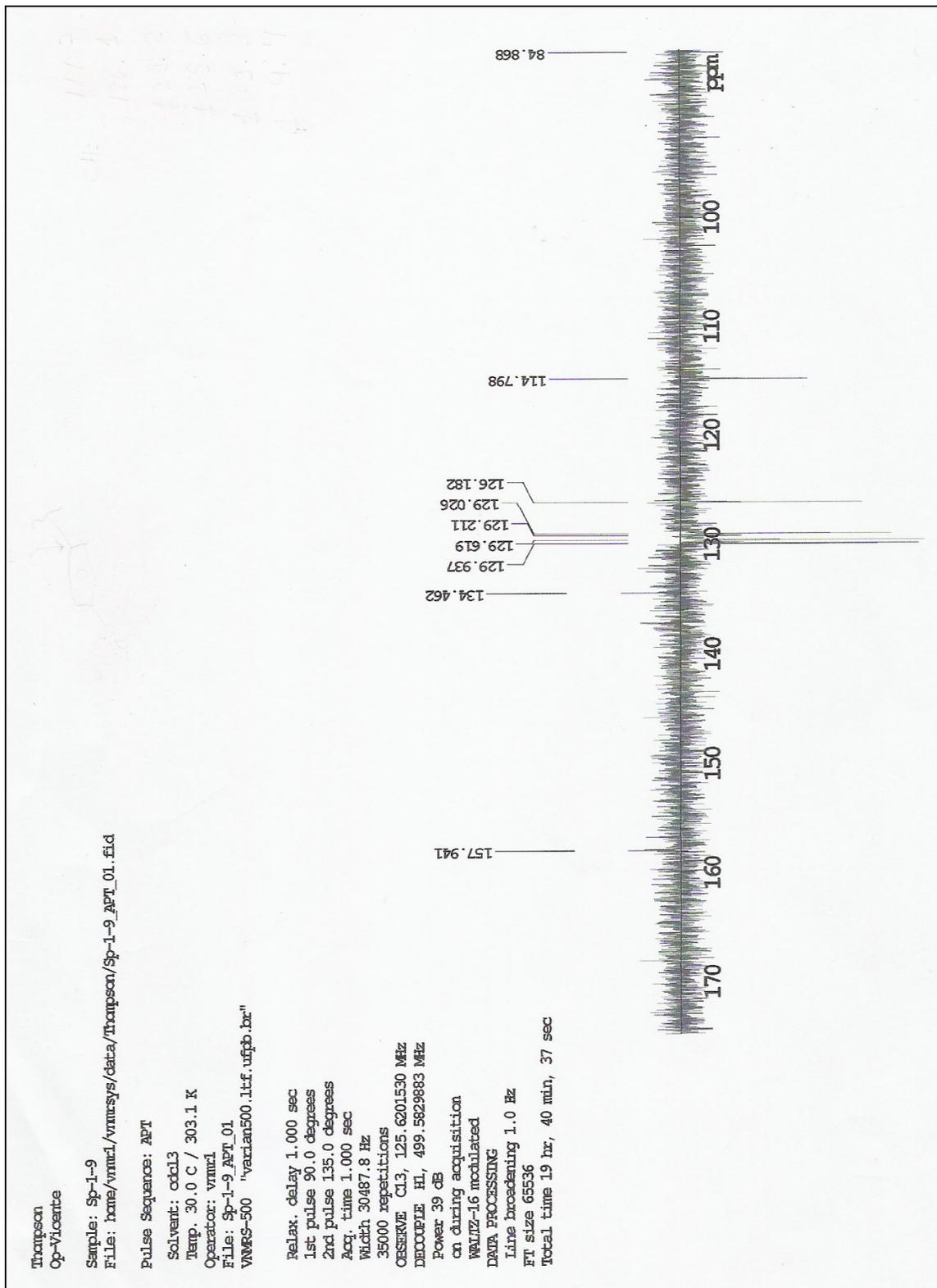


Figura 6. Espectro RMN ¹³C (500 MHz) de sp-1/09 em acetona

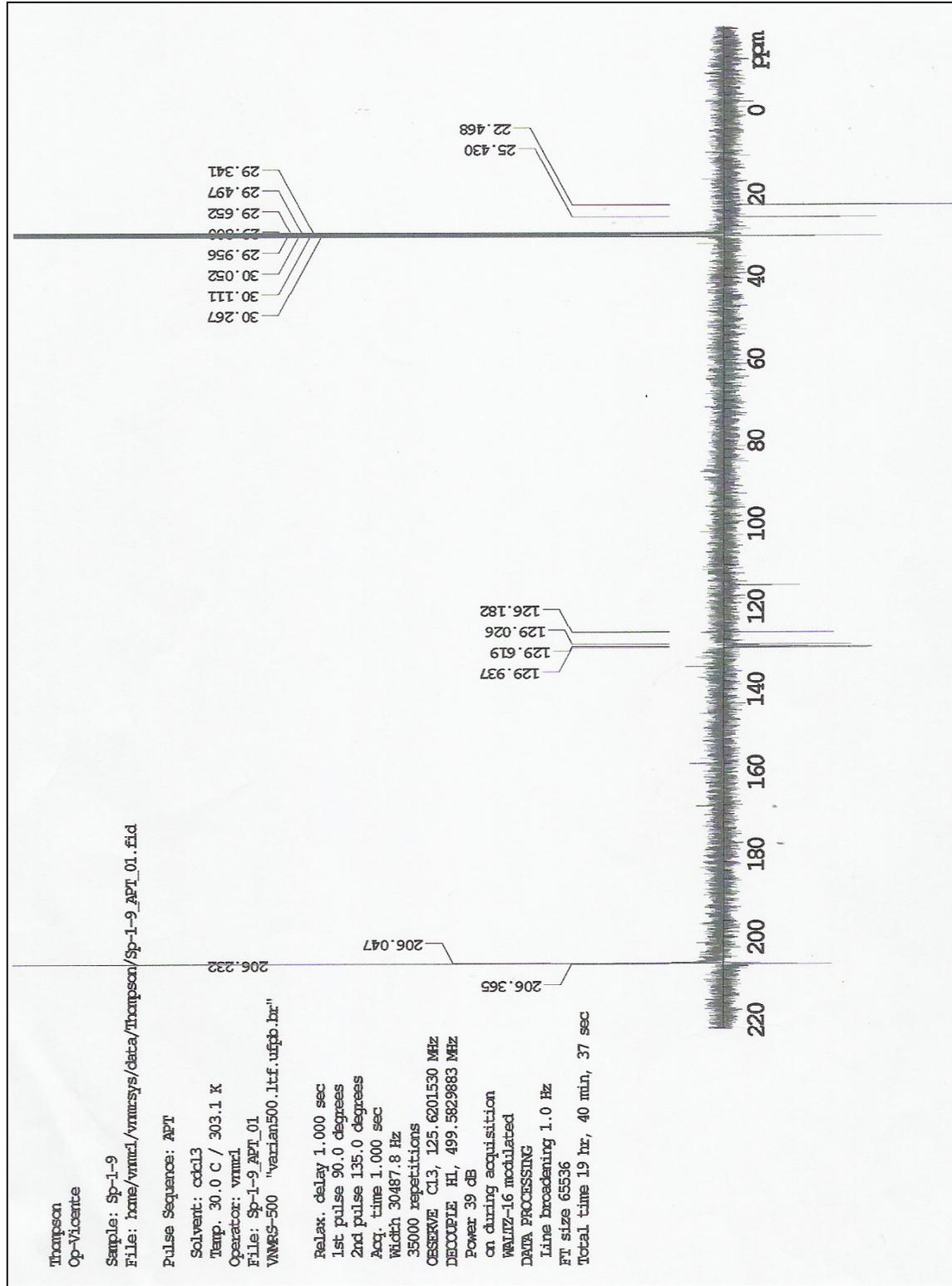


Figura 7. Espectro RMN ^{13}C (500 MHz) de sp-1/09 em acetona

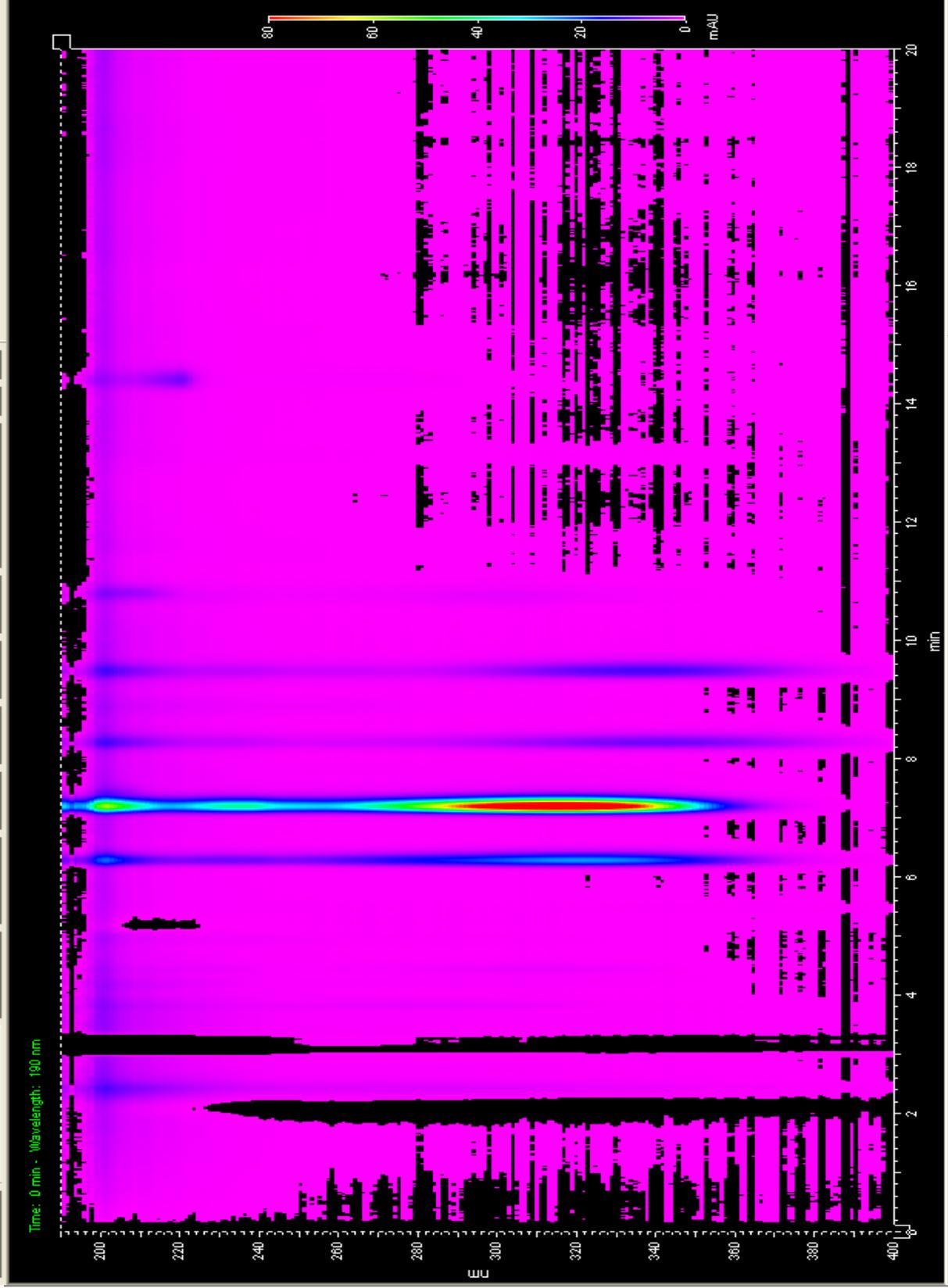


Figura 8. Cromatograma da fração sp-1/09 no comprimento de onda de UV 200-400nm

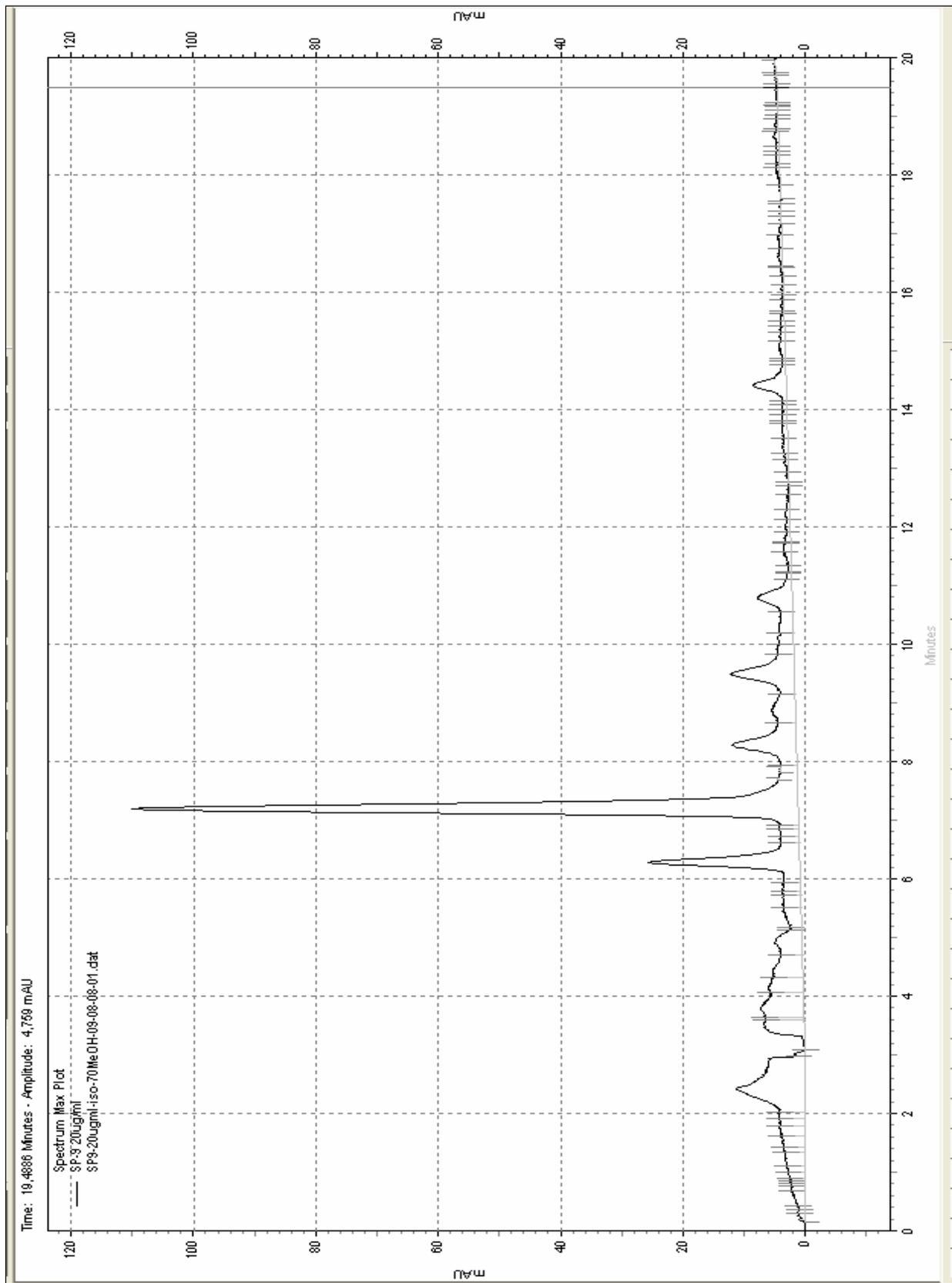


Figura 9. Cromatograma da fração sp-1/09 20µg/mL

CONSIDERAÇÕES

FINAIS

07



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isoladas 49 amostras pertencentes ao gênero *Streptomyces* a partir de 68 coletas em solos de diferentes mesoregiões do Estado da Paraíba. As cepas SP-1 e SP-3 apresentaram os melhores resultados no screening antimicrobiano, destacando a produção de metabólitos bioativos com atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral.

Entre os microorganismos ensaiados, os mais sensíveis aos metabólitos produzidos pelas cepas SP-1 e SP-3 foram espécies do gênero *Candida* spp, gênero *Aspergillus* sp e gênero *Tricophyton* sp. Amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* foram sensíveis as cepas de *Streptomyces* SP-07 e SP-36 através do teste de inibição pela técnica de blocos de agar.

O efeito inibitório dos extratos sp-1 e sp-3, equivalente e até superior à drogas sintéticas como o cetoconazol, revela uma notável propriedade antifúngica dos mesmos.

A inibição tumoral promovida pelos extratos sp-1 e sp-3 sobre o Sarcoma 180, descreve um achado importante neste estudo, quanto à apresentação de mais uma nova propriedade farmacológica dos extratos frente aos animais ensaiados.

Apesar das atividades promovidas pelos extratos sp-1 e sp-3, é destacado o grau de toxicidade apresentado pelos mesmos, sugerindo a formação de novas rotas de produção ou purificação destes metabólitos.

O processo de caracterização química dos extratos sp-1, sp-3 e frações estão em andamento, visando a purificação dos mesmos para uma melhor visualização nos testes de RMN, IV, CCDA, CLAE e MASSA 2D, com o objetivo de elucidar as possíveis moléculas inerentes as atividades descritas.

O leito dos rios em diferentes mesorregiões do Estado da Paraíba explorado apresenta-se como uma nova rota de pesquisa, com biota diversa e potencialmente produtoras de metabólitos bioativos com propriedades a serem estudadas.

REFERÊNCIAS

08



8. REFERÊNCIAS

1. ATECEL/INCRA-PB; Associação Técnico Científica Ernesto Luiz de Oliveira Junior/UFPB/Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária-PB. **Plano Diretor Sócio-Econômico e Ambiental do Estado da Paraíba**. Campina Grande, 2002.
2. ALEXANDER, M. **Introduction to soil Microbiology**. 2.ed. New York: Wiley; 1991.
3. ALMEIDA, V, ACUARONE, E, BORZONI, W. **Tecnologia das fermentações. Biotecnologia**. São Paulo: Edgard Bluchner, v.1. 1975.
4. ATALAN, E. **Biosystematic studies on novel *Streptomyces* from soil**. Antonie van Leeuwenhoek., v.77, p.337-353. 2000.
5. BACHIEGA, G.L; VILEGAS, W; UJIKAWA, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. V.26, nº1, p. 29-37. 2005
6. BENTLEY S.D et al. Complete genoma sequence of the model *Actinomycete Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Nature**. vol. 417. may. 2002.
7. BLACK, G.J. **Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 22. p 574-609. 2002.
8. CASTILLO, U.F; STROBEL, G.A; FORD, E.J; HESS, W.M; PORTER, H; JENSEN, J.B; ALBERT, H; ROBISON, R; CONDRON, M.A.M; TEPLow, D.B; STEVENS, D, YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans* **Microbiology**, v. 148, p. 2675-2685. 2002.
9. CHATER, K.F.; MERRICK, M.J. *Streptomyces*. In: PARISH, J.H. (ed.). **Developmental Biology of Prokaryotes**. Oxford, Blackwell scientific publications, 1979.
10. CHATER, K.F; HOPWOOD, D.A. *Streptomyces*. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. *Bacillus subtilis and others Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. Washington: **American Society for Microbiology**. 1993.
11. CONELL, N.D. **Expressiosn systems for in use *actinomycetes* and related organisms**. *Opin Biotech* 12:446-449. . 2001.
12. DIAZ-CORRALES, F.L; GARCIA, E; SERRANO, J.A. Identificación y producción de antibiosis por *Actinomycetales* aislados del suelo. **Bol. Svm.**, v.17, p.13-18. 1997.
13. DUANYUM, S; ZHONG, D; QUINMIN, X. Two butylated amminooligosaccharides isolated from the culture filter of *Streptomyces luteogriseus*. **Carboydrate Research**. v.7. p. 127-132. 2001.

14. EZRA, D; CASTILLO, U.F; STROBEL, G.A; HESS, W.M; PORTER, H; JENSEN, J.B; CONDRON, A.M; TEPLow, D.B; SEARS; JOSEPH, S; MARANTA, M; HUNTER, M; WEBER, B. Yaver. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, p. 785-793.2004.
15. FETROW, C.W; AVILA, J.R. **Manual de Medicina Alternativa para o Profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.743. 2000.
16. FLARDH, K. Essential role of divIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Molec. Microbiol.**, v. 49, p. 1523-1536. 2003.
17. GARCIA, N.S. Estudos genéticos e de cossíntese em *Streptomyces regensis* da UFPE-M3053 produtor de actinomicina: obtenção e caracterização de mutantes idiotróficos. **Tese de Doutorado da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife. 165p. 1996.
18. GARCIA-QUINTANA, H; ZAROR, C.L, LEIVA, O.S. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. **Rev. Méd. Chile.**, v.125, p.1157- 1164. 1997.
19. GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A.G. **Search and discovery of industrially significant Actinomycetes**. In: BAUMBERG, S.; HUNTER, I.S. e RHODES, P.M. (eds.) *Microbial products: new approaches*. Cambridge University Press: Cambridge, 1989.
20. GOTTLIEB, D. **Actinomycetales: characteristics and practical importance**. London: Academic press. 1973.
21. HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore:Williams & Wilkins. 1994.
22. HOPWOOD, D.A. *Streptomyces* genetics in pure and applied research. In: HERSHBERGER, C.L.; QUEENER, S.W.; HEGEMAN, G. (eds.) **Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms**. Washington: American Society for Microbiology. 1989.
23. IWAI, Y; TAKAHASHI, Y. **Selection microbial sources of bioactive compounds**. pp. 281-303. In: OMURA, S. (ed.) *The search for bioactive compounds from microorganisms* New York: Spring-Verlag. 1992.
24. KENNEDY A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems an Environment**. 74:65-76. 1999.
25. KIESER, H.M; T. KIESER, et al. "A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome." **J. Bacteriol.** 174(17): 5496-5507. 1992.
26. LANCINI, G; LORENZETTI, R. **Biotechnology of Antibiotics and other Bioactive Microbial Metabolites**. New York: Plenum, 235p. 1993.

27. LAZZARINI, A; CAVALETTI, L; TOPPO, G; MARINELLI, F. **Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 78, p. 399-405. 2002.
28. LEBLOND .P. F.X; FRANCOU, et al., "Pulsed-field electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains." **FEMS Microbiol. Lett.** 72: 79-88. 1990.
29. _____ "Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3 (2)." **J. Bacteriol.** 175(11): 3422-3429. 1993.
30. LEZHAVA A; MIZUKAMI T; et al. "Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*." **J. Bacteriol.** 177: 6492-6498. 1995.
31. LIN, Y.S; KIESER H.M, et al. "The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear." **Mol. Microbiol.** 10(5): 923-933. 1993.
32. MANFIO, G.P; LEMOS, M.F. Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. *Microrganismos e aplicações industriais*. 2001. **Disponível em:** <<http://www.bdt.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/4/gilson.html>> **Acesso em:** 24 de setembro 2008.
33. MC CARTHY, A.J; WILLIAMS, S.T. Methods for studying the ecology of *actinomycetes*. In: GRIGOROVA, R.; NORRIS, J. R. **Methods in Microbiology: Techniques in Microbial Ecology**. London: Academic, v. 22. 1992.
34. MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím .Nova**, v.24, n.1, p.105-111, 2001.
35. NASCIMENTO, G.G.F; LOCATELLI, J; FREITAS, P.C; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol**, v. 31, n. 2, p. 247-256. 2000.
36. NASCIMENTO, F.C.R. *Fronteira Móvel: os homens livres pobres e a produção do espaço da Mata Sul da Paraíba (1799-1881)*. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geografia do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)**, 2006.
37. NWOSU, V.C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. **Microbiology**, v. 52, p. 421-30. 2001.
38. OMURA, S; TANAKA, H; OIWA, R; NAGAI, T; KOYAMA, Y; TAKAHASHI, Y. Studies on bacterial cell wall inhibitors. VI Screening methods for the specific inhibitors of peptidoglycan synthesis. **J. Antibiot**, v. 32, p. 978-84. 1979.

39. OUHDOUCH, Y; MUSTAPHA, B; FINANCE, C. *Actinomycetes* of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. **Eur. J. Soil Biol**; v.37, p.69-74. 2001.
40. PACHECO, P.A.Z. **Aislamiento y purificación de principios activos, a partir de cepas de *Streptomyces* spp. Obtenidas de muestras de suelo chileno.** Valdivia: Universidade Austral de Chile. 1994.
41. PANZDA K, PFALZER .G; et al. " Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome." **Appl. Environ. Microbiol.** 143: 1493-1501.1997.
42. PELCZAR, M, REID, R, CHAN, E.C.S. **Microbiologia.** Vol.II São Paulo: Mc Graw-Hill. 1981.
43. PRESCOTT, H.S; HARLEY, P; KLEIN, D.A. **Microbiology.** 4.ed., New York: Mc Graw Hill. 1999.
44. PULLEN, C; SCHMITZ, P; MEURER, K; BAMBERG, D.D.V; LOHMANN, S; FRANÇA, S.C; GROTH, I; SCHLEGEL, B; MOLLMANN, U; GOLLMICK, F; GRAFE, U; LEISTNER, E. **New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*.** *Planta*, v. 216, p. 162-167. 2003.
45. RANGASWAMI, G; OBLISAMI, G. A study of the correlation between the antagonistic *Actinomycetes* and the physical and chemical properties of some soils of south India. **India Phytopathology**, v. 20, p. 280 - 290. 1967.
46. RODRIGUES, J.L. **Atlas Escolar da Paraíba. 2. ed.** João Pessoa: Grafset. 2004.
47. REDENBACH, M; KIESER H.M; et al. "A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome." **Mol. Microbiol.** 21(1): 77-96. 1996.
48. ROBINSON, M; LEWIS E; et al. "Occurrence of reiterated DNA sequences in strains of *Streptomyces* produced by an interspecific protoplast fusion." **Mol. Gen Genet.** 182(2): 336-340. 1981.
49. SAADOUN, I. Isolation, identification and analysis of antibacterial activity of soil *streptomyces* isolates from north. **Jordan. Microbios**, v.100, p.41-46, 1999.
50. SANGLIER, J.J; HAGG, H, HUCK, T.A. Fehr, T. Novel bioactive compounds from *actinomycetes*: a short review (1988-1992). **Rev. Microbiol**, v. 144, p. 633-642. 1993.
51. SEMÊDO, L. Isolation and characterization of *actinomycetes* from Brazilian tropical soils. **Rev. Microbiol.**, v.155, p.291-299. 2001.

52. SHIMIZU M; IGARASHI, Y; FURUMAI, T; ONAKA, H; KUNOH, H. Identification of endophytic *Streptomyces* sp. R-5 and analysis of its antimicrobial metabolites. **Journal General Plant Pathology**, v. 70, p. 66–68. 2004.
53. SHIRLING, E.B; GOTTLIEB, D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II Species descriptions from first study. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.18, p.69-189. 1968.
54. _____ Retrospective evaluation of International *Streptomyces* Project Special Criteria. In: ARAI, T. (ed.) **Actinomycetes: The Boundary Microorganisms**. Tokyo: Toppan Co. 1976.
55. SHREMPF, H. "Genetic instability: amplification, deletion and rearrangement within *Streptomyces* DNA." *Microbiology* - 1985. American Society for Microbiology. 1999.
56. THEILLEUX, J. Los actinomicetos In: LEVEAU, J.Y.; BOUIX, M. **Microbiologia industrial**. Zaragoza: Acribia.p. 418-471. 2000.
57. TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed., Porto Alegre: Artmed. 2000.
58. VIEIRA, K.V.M; LIMA, E.O; FARIAS, M.A.A; CYSNEIROS, C.O. Propriedades antimicrobianas de *Streptomyces* isolados do solo do Estado da Paraíba - Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.6, n.3, p. 249-258. 2002.
59. VIEGAS J.R.C; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v.29, n.2, p.326-337. 2006.
60. VINNING, L.C. Functions of secondary metabolites. **Annual Review Microbiology**. v.44, p. 395-427. 1990.
61. UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos de Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 2, p. 149-158. 2003.
62. WOHLLEBEN, W; MUTH, G; KALINOWSKI, J.O.R.N. **Genetic engineering of Gram positive bacteria**. In: PUNHER, A. (ed.) Genetic engineering of microorganisms, New York: Academic Press. 1993.
63. WILLIAMS, S.T; AND FLOWERS, T.H. The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic *streptomyces*. **Microbios**. 20, 99-106. 1978.
64. YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: ARGOS 523p. 2001.

ANEXOS

09



ANEXO I

Atividade antibacteriana produzida por estreptomicetos isolados de solos paraibanos
Publicado na Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança, v.05, n.01, jul. 2007.

Artigo original

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PRODUZIDA POR ESTREPTOMICETOS ISOLADOS DE SOLOS PARAIBANOS

Thompson Lopes de Oliveira¹
Ivone Antonia de Souza²
Edeltrudes de Oliveira Lima³
Catiana de Oliveira Lima⁴

RESUMO

Com o aumento significativo das infecções bacterianas resistentes e multiresistentes durante as últimas décadas, há a necessidade de pesquisa de novas drogas antibacterianas com qualidade superior às existentes. Dessa forma, o estudo dos *Streptomyces* do solo como fonte de produtos bioativos tem revelado inúmeras substâncias antimicrobianas de diferentes classes e mecanismos ações. Esta pesquisa objetivou o isolamento de estreptomicetos produtores de metabólitos bioativos com efeito antibacteriano. Foram coletadas 68 amostras de solo em mesorregiões da Paraíba, com o isolamento de 49 espécies de estreptomicetos. As cepas de *Streptomyces* foram identificadas através de análises macromorfológicas das colônias semeadas em meio Kuster Williams, e análises micromorfológicas por meio de microcultivos observados em microscópio de campo claro. Os testes de antagonismo seguiram o método de difusão em meio sólido com blocos de ágar frente às espécimes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis*, oriundas de coleção ATCC - (American Type Culture Collection) e de origem clínica. Os halos de inibição variaram de 10 a 20 mm de diâmetro, eminentes para as cepas de bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 e *Staphylococcus epidermidis* SSL-1. Os resultados demonstram o potencial antibiótico dos estreptomicetos existentes no solo paraibano, fecundo para elucidação de novas drogas a serem utilizadas na clínica humana e veterinária. **Palavras-chave:** *Streptomyces*. Solo. Antibiótico.

INTRODUÇÃO

Poucos ambientes na terra fornecem tão grande variedade de microrganismos como o solo fértil. Os microrganismos formam uma coleção microscópica, que pode alcançar um total de bilhões de organismos por grama de solo, sendo a maior proporção nas primeiras camadas de centímetro do solo, diminuindo à medida que se aprofunda (PELCZAR *et al.*, 2000).

A biotecnologia em parceria com a saúde humana e veterinária vem apresentando um expressivo destaque em escala mundial na elucidação e produção de medicamentos

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPE.

E-mail: thompson_oliveira@yahoo.com.br

²Doutora em Toxicologia. Professora do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. E-mail: ias@ufpe.br

³Doutora em Micologia. Professora do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba - UFPB. E-mail: edeolima@yahoo.com.br

⁴Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba-UFPB.

oriundos de plantas e microrganismos. Esse crescimento é estimado em cifras na ordem de 30 bilhões anuais, apresentando uma taxa aproximadamente de 15% anual, frente apenas a 4% dos medicamentos de origem sintética (CALIXTO, 2000; RODRIGUES, 2004).

Dessa forma, a busca por ambientes *in natura*, potencialmente ricos em substâncias bioativas e elementos diversos, direciona ao estudo das populações presentes no solo pelo fato deste comportar-se como um forte representante ambiental com característica rica e complexa, fecundo para o isolamento de substâncias biologicamente ativas (RANGASWAMI e OBLISAMI, 1967).

O solo fértil é formado por um nicho ecológico microscópico composto por milhares de bactérias, fungos, algas e protozoários, potencialmente produtores de substâncias de interesse clínico e agroindustrial, em destaque os mais diversos antibióticos e praguicidas (BLACK, 2002; MURRAY, 2005).

Dentre os microrganismos do solo com um papel econômico e industrial, os *Streptomyces* se apresentam versáteis em produzir metabólitos primários e secundários, cujas aplicações biotecnológicas se enquadram nas mais diversas áreas (VINING, 1979). Entre esses metabólitos, destacam-se as mais diversas substâncias antibióticas pertencentes a diferentes classes com mecanismos distintos de ação (OMURA *et al.*, 1999).

A estrutura, fisiologia e ecologia dos *Streptomyces* spp foram caracterizadas e com isso várias rotas de síntese de produtos bioativos descobertas, as quais apresentam uma larga aplicação em diferentes áreas, desde a clínica humana à agricultura (SASAKI, 2001; THOME e ALDER, 2002).

As substâncias elaboradas pelos *Streptomyces* spp são distribuídas em classes diferenciais como enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores, antiparasíticos, antihelmínticos, antiprotozoários, antivirais, antimicrobianos, além de herbicidas e inseticidas de ampla aplicação (SANGLIER *et al.*, 1993)

As substâncias produzidas por

Streptomyces spp exibem grande diversidade química, contudo, novas estruturas também têm sido isoladas de outros gêneros representantes de solo fértil, principalmente *Actinomadura*, *Actinoplanes* e *Micromonospora* difundindo as opções em estudo de microrganismos de solo (LAZZARINI *et al.*, 2002).

Todavia, os produtos de origem natural têm desempenhado relevante papel na descoberta de novos fármacos, sendo necessário um estudo detalhado para se conseguir novos produtos bioativos a serem aplicados como ferramenta na saúde pública (DAMAIN, 1995).

OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa, foram:

- isolar e identificar estreptomicetos de mesoregiões da Paraíba;
- avaliar a produção de metabólitos bioativos pelos *Streptomyces* sp. através de ensaios de antagonismos;
- realizar o *screening* frente a espécimes de origem clínica e de coleção.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta partiu de aproximadamente 300g do solo isoladamente nas mesoregiões da Paraíba-Brasil. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e enviadas ao laboratório para processamento, segundo Garcia-Quintana (1997). Em seguida, suspendeu-se 1g da amostra em 9 mL de solução salina estéril em tubo de ensaio até a 10⁷ diluição. Homogeneizaram-se as amostras em vortex, deixando-as em repouso por 15 minutos. Posteriormente, foram inoculadas alíquotas de 0,1mL em meio de cultura Kuster Williams, incubando-se a temperatura ambiente por 7 dias a 26° C.

Após crescimento colonial, os estreptomicetos foram caracterizados através de avaliação macromorfológica e técnica de microcultivo. Para a realização

do screening foram selecionadas cepas bacterianas ATCC - American Type Culture Collection e de origem clínica mantidas em estoque em meio Muller Hinton, fornecido pela Difco.

Em seguida foram feitas suspensões dos estreptomicetos em estudo, colocado 1,0 mL em placa de Petri estéril e vertido o meio Kuster Williams para a preparação dos blocos de Agar. Na etapa seguinte foram preparadas suspensões dos microrganismos testes inoculadas em pour plate e pós-solidificação realizado a distribuição dos blocos de agar com os *Streptomyces*. As placas foram incubadas por 24-48 horas em estufa bacteriológica. Após período de incubação, foram realizadas leituras utilizando-se um paquímetro, comparando os dados com a da literatura. Como drogas padrões, foram utilizadas a oxacilina - 1mcg e a gentamicina - 10 mcg.

O estudo foi realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba-Brasil.

Observa-se uma predominância dos estreptomicetos na região da Mata Paraibana, em um quantitativo de 19 amostras isoladas. Essa prevalência decorre em princípio pelo tipo de solo, com característica arenosa e teor de umidade presente. Esses dados assemelham-se com outros encontrados por Ujikawa (2003).

Na mesorregião do Agreste Paraibano foram isoladas 13 amostras de estreptomicetos, seguido da região do Sertão, com 09 espécies, e da Borborema, com 08 espécimes de estreptomicetos isolados e identificados.

A Figura 1 representa as cores observadas na macromorfologia dos estreptomicetos cultivados em meio de cultura Kuster Williams. Observa-se uma maior predominância da cor branca entre os isolados do solo em um percentual de 57%, seguida das cores cinza com 26%, café com 13% e amarela com 4%.

Esse padrão de coloração do micélio aéreo está condizente com espécimes isolados em diferentes tipos de solos do Brasil e do mundo, com uma prevalência da cor branca nas colônias de estreptomicetos isoladas, informação esta observada por Singh e Agrawal (2001).

RESULTADOS

Tabela 1. Quantificação dos Estreptomicetos Isolados de Mesorregiões da Paraíba

MESORREGIÕES	<i>Streptomyces</i>	spp
Mata Paraibana	19	
Sertão	09	
Borborema	08	
Agreste Paraibano	13	
Total	49	

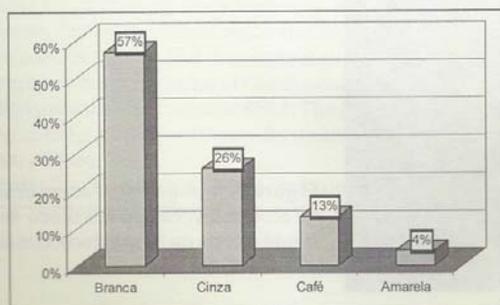


Figura 1. Cores da macromorfologia dos estreptomicetos isolados do solo paraibano.

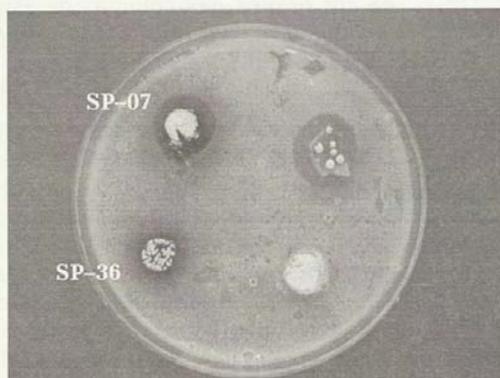
Na Figura 2, observa-se o efeito antagônico dos estreptomicetos isolados de diferentes solos frente à cepa de *Staphylococcus epidermidis* SSL-1. Esse agente, apesar de ser constituinte de microbiota residente humana, tem a capacidade de desenvolver patologias de interesse médico, bem como em estabelecer a formação de biofilmes em cateteres e dispositivos, funcionando como fonte fecunda para a indução de processos infecciosos (PELCZAR, 2000).

Observa-se, na figura 2, o resultado do ensaio de antagonismo, onde o *Streptomyces* SP-36 apresentou um halo de inibição de 11 mm, seguido do estreptomiceto SP-07 com a formação de um halo de inibição superior de 15 mm. Esses dados comprovam a capacidade inibitória das cepas de *Streptomyces* isoladas do solo paraibano produzindo metabólitos secundários e corroboram com outros achados de literatura, conforme Garcia-Quintana

(1997), Ujikawa (2003) e Yanittza (2005). Os halos observados nos ensaios se apresentam semelhantes e até superiores aos encontrados em testes de susceptibilidade padronizados, utilizando-se drogas antimicrobianas como a oxacilina - 1mcg, eficaz *in vitro* para contra o *S. epidermidis*, a partir da formação de halo de 13 mm.

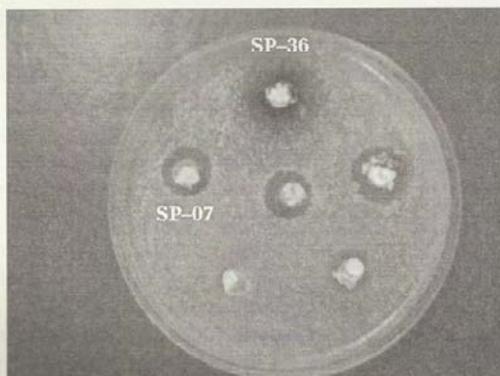
Na Figura 3, observa-se o efeito antagônico dos estreptomicetos isolados de diferentes solos frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC-6538. Esse microrganismo se apresenta como emergente entre os processo de infecção comunitária e de origem hospitalar, apresentando o agravamento em adquirir muito rapidamente um perfil de resistência e até multi-resistência a drogas antimicrobianas usuais (MURRAY, 2005).

Para a espécie de *Streptomyces* SP-36, o halo de inibição foi de 13 mm, já a espécie de estreptomiceto SP-07 apresentou um halo de inibição superior a 14 mm.



Staphylococcus epidermidis SSL-1

Figura 2. Antagonismo entre amostras de *Streptomyces* spp em bloco de agar frente à cepa de *Staphylococcus epidermidis* SSL-1.



Staphylococcus aureus ATCC - 6538

Figura 3. Antagonismo entre amostras de *Streptomyces* spp em bloco de agar frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC-6538.

Esses dados revelam o poder inibitório das cepas de *Streptomyces* isoladas do solo paraibano, e corroboram com outros achados discutidos em literatura conforme Ujikawa (2003) e Yanittza (2005). Os halos observados nos ensaios se apresentam semelhantes aos encontrados em testes de susceptibilidade padronizados, utilizando-se drogas antimicrobianas como a oxacilina - 1mcg, eficaz *in vitro* para contra o *S. aureus*, a partir da formação de halo de 13 mm.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isolados 49 estreptomicetos a partir de 68 coletas realizadas em solo paraibano.

Das quatro mesorregiões estudadas, a Mata Paraibana revelou ser a mais fecunda para a obtenção desses microrganismos produtores de efeitos antagônicos sobre espécies de coleção e de origem hospitalar.

Dos 49 espécimes isolados de estreptomicetos, as espécies *Streptomyces* SP-36 e *Streptomyces* SP-07 apresentaram

relevante efeito antagônico frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC-6538, bem como sobre o *Staphylococcus coagulase-negativo* SSL-1.

A inibição promovida pelas cepas de estreptomicetos SP-36 e SP-07, observada no ensaio *in vitro* frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC-6538, com halos respectivos de 13 mm e 14 mm, creditam valores próximos e até superiores às drogas antimicrobianas usuais na clínica humana e veterinária, como a oxacilina 1mcg eficaz contra o *S. aureus*, a partir da formação de halo de 13 mm.

Os halos de inibição superiores a 10 mm observados entre as cepas de estreptomicetos SP-36 e SP-07, contra o *Staphylococcus epidermidis*, fomentam novas pesquisas com esses microrganismos, na possibilidade de encontrar uma nova substância antimicrobiana eficaz contra as espécies do gênero *Staphylococcus* spp.

Os diferentes tipos de solo paraibano se mostraram fecundos para o isolamento de espécies de *Streptomyces*, potencialmente produtoras de metabólitos bioativos, com características antimicrobianas.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY PRODUCED BY STREPTOMYCETES ISOLATED OF THE PARAIBANOS SOILS

ABSTRACT

With the significant increase in bacterial infections resistant and multiresistant during the last decades, there is an urgent need to screen for new antibacterial drugs possessing some advantages over known ones. Thus, the study of *Streptomyces* ground as a source of products bioactive has revealed innumerable antimicrobial substances of different classes and mechanisms action. This article reports the isolation of streptomycetes producers of bioactive metabolites with antibacterial effect. They were collected 68 samples from ground in region of Paraíba, in the isolation of 49 species of streptomycetes. The strains of *Streptomyces* were identified through macromorphology analyses of colonies sown in the Kuster Williams medium and micromorphology analyses through microcultivations and observed through light microscope. The tests of antimicrobial followed the method of diffusion in solid medium with agar block, facing the specimens of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus epidermidis* from collection ATCC - (American Type Culture Collection) and the original clinic. The inhibition halos varied from 10 to 20 mm diameter, more eminent for the strains of Gram-positive bacteria such the *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 and *Staphylococcus epidermidis* SSL1. The results demonstrate the potential antibiotic of streptomycetes existing in the ground paraibano, fecundity for the elucidation of new drugs to be used in human and veterinary clinic.

Keywords: *Streptomyces*. Ground. Antibiotic.

REFERÊNCIAS

- BLACK, G. J. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 22. p. 574-609.
- CALIXTO, J.B. Biopirataria. **Ciência Hoje**, v. 28, n. 167, p. 37-43, 2000.
- DAMAIN, A. L. Why do microorganisms produce antimicrobials? In: HUNTER, P. A.; DARBY, G. K.; RUSSELL, N. J. (Eds.). **Fifty Years of Antimicrobials: past, prospective and future trends**. Cambridge: University Press, 1995, p. 205-228.
- GARCIA-QUITANA, H.; ZAROR, C.; LEIVA, P.S. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* spp aisladas de suelos chilenos. **Rev. Méd. Chile.**, v. 125, p. 1157 - 1164, 1997.
- LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; TOPPO, G.; MARINELLI, F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 399-405, 2002.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- OMURA, S. *et al.* Isolation and structure of a new antibiotic vridomycin F produced by *Streptomyces* sp. K96-0188. **The Journal of Antibiotics**. V. 52, n. 1, p. 61-64, 1999.
- PELCZAR JR., J. M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Makron Books, 2000, vol. 3.
- RANGASWAMI, G.; OBLISAMI, G. A study of the correlation between the antagonistic actinomycetes and the physical and chemical properties of some soils of south India. **India Phytopatoly**, v. 20, p. 280 - 290, 1967.
- RODRIGUES, G. Fitomedicamentos têm notável expansão mercadológica. **Jornal Phytociência**. v. 1, p.1-2, 2004.
- SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T.A.; FEHR, T. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, v. 144, p. 633-642, 1993.
- SASAKI, T.; *et al.* TPU-0031-A and B, new antibiotics of the novobiocin group produce by *Streptomyces* sp. TP-A0556. **The Journal of Antibiotics**. v. 54, n. 5, p. 441-447, 2001.
- SINGH, D.; AGRAWAL, V.P. **Biodiversity of actinomycetes of Lobouche in Mount Everest I**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinost/Taxonomy>>. Acesso em: 10 ago. 2006.
- THOME, G.M.; ALDER, J. Daptomycin: a novel lipopeptide antibiotic. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 24, n. 5, p. 33-40, 2002.
- UJIKAWA, K.; VILEGAS, W. Antibióticos antifúngicos produzidos actinomicetos no Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Rev. Brasileira Ciências Farmacêuticas**. V. 39, n. 02, 2003.
- VINING, L.C. Secondary metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. v. 4, p. 21-29, 1979.
- YANITTZA, Y.M. M. Atividade antifúngica de *Streptomyces* sobre células leveduriformes. **Rev. Med. Chile**. V. 7, n. 46, 2005.

ANEXO II

Importância Biotecnológica de *Streptomyces* spp Isolados do Solo Paraibano
Publicado na Revista de Ciências da Saúde Santa Maria, v.01, n.01, abr/out 2008.



FACULDADE SANTA MARIA
REVISTA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE SANTA MARIA
BR 230, KM 504, Cajazeiras – PB
CEP 58900-000 – Telefax: (83) 3531-1365

CARTA DE ACEITE

Comunicamos que o artigo intitulado **Importância biotecnológica de *Streptomyces spp* isolados do solo paraibano**, de autoria de Thompson Lopes de Oliveira, Edeltrudes de Oliveira Lima, Ivone Antonia de Souza, Catiana Oliveira Lima e Sâmea Mesquita Bonfim, foi aprovado para ser publicado na Revista de Ciências da Saúde Santa Maria (ISSN 1809-0907).


Josélio Santos
Editor

**IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DE *Streptomyces* spp ISOLADOS DO
SOLO PARAIBANO**

**BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE THE *STREPTOMYCES* spp ISOLATED
OF THE PARAIBANO SOIL**

^IThompson Lopes de Oliveira - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; ^{II}

Edeltrudes de Oliveira Lima - Doutora/UFPB; ^{III} Ivone Antonia de Souza -

Doutora/UFPE ^{IV} Catiana de Oliveira Lima Acadêmica - UFPB.

^I Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPE. R.
Oneida Agra da Nóbrega, 126 Altiplano João Pessoa - PB CEP 58046-200. E-mail:
thompson_oliveira@yahoo.com.br

RESUMO

A utilização de fontes naturais pelo homem para os mais diversos propósitos, parece ser uma atividade atávica da espécie, presente em diversas civilizações proporcionando a descoberta e aquisição de novos conhecimentos biológicos. Desta forma, o estudo dos *Streptomyces* spp. do solo como fonte fecunda para a obtenção de produtos bioativos ao longo dos anos têm revelado a descoberta de inúmeras substâncias ativas com aplicabilidades terapêuticas e biotecnológicas, destacando-se aquelas com atividade antimicrobiana e antitumoral. A caracterização microbiológica de cepas de *Streptomyces* spp. isoladas do solo em diferentes regiões no mundo têm despertado interesses por parte de institutos de pesquisa e de indústrias farmacêuticas, em virtude da capacidade versátil destes microrganismos em se adaptarem a diferentes tipos de solo, bem como, em produzirem substâncias diversificadas com ações diferenciadas como os metabólitos secundários de atividade antibiótica, antitumoral e praguicida. As diferentes metodologias empregadas no isolamento e caracterização dos *Streptomyces*

spp, convergem a fundamentos comuns, entretanto, novas ferramentas a exemplo da biologia molecular têm sido incorporadas com finalidades de identificação real da cepa em estudo. Dentre as substâncias isoladas dos *Streptomyces* spp. do solo inúmeras são comercializadas com diferentes propósitos a exemplo do clorafenicol, estreptomicina e neomicina. Apesar da maioria dos metabólitos secundários produzidos normalmente pelos *Streptomyces* spp. apresentarem efeitos bioativos *in vitro*, a toxicidade e impureza destes, inviabiliza em grande parte a transformação destas substâncias potencialmente terapêuticas em fármacos propriamente dito, obstaculando a inserção de novos medicamentos no mercado. Todavia, torna-se oportuno e compensador a realização de novas coletas de solo das mais diversas regiões do Brasil ampliando o estudo destes microrganismos como uma importante fonte biotecnológica para a obtenção de novos compostos.

Palavras-Chave: *Streptomyces*; Solo; Biotecnológico, Bioativos

ABSTRACT

The use of natural resources by man for many different purposes, appears to be a kind of atavistic activity, present in various civilizations providing the discovery and acquisition of new biological knowledge. Thus, the study of *Streptomyces* sp. fertile soil as a source for obtaining bioactive products over the years have revealed the discovery of several active substances with therapeutic applicability and biotechnology, especially those with antimicrobial activity and antitumour. The characterization of microbial strains of *Streptomyces* sp. isolated from soil in different regions in the world have attracted interest from biotechnology research institutes and pharmaceutical industries,

especially the versatile ability of these organisms to adapt to different soil types, as well as in producing substances with diverse actions as differentiated the secondary metabolites of antibiotic activity, antitumour and pesticides. The various methods employed in isolation and characterization of *Streptomyces* spp, converge to common pleas, however, such new tools of molecular biology have been incorporated for purposes of identification of the actual strain under study. Among the substances isolated from *Streptomyces* spp. soil are marketed under many different purposes such as the clorafenicol, streptomycin and neomycin. Although the majority of secondary metabolites normally produced by *Streptomyces* spp. make bioactive effects in vitro, and the toxicity of this impurity, makes much of the transformation of these substances potentially therapeutic drugs in itself, obstacles to integration of new medicines on the market. Several authors mention that in preliminary screening, the strains of *Streptomyces* the soil show being producers of bioactive substances. However, it is appropriate and rewarding the performance of new samples of soil from various regions of Brazil spreading the study of microorganisms as an important source biotechnology to obtain new compounds.

Key words: *Streptomyces*; soil; biotechnological; bioactive

Introdução

A biotecnologia em parceria com a saúde humana e veterinária, vem apresentando um expressivo destaque em escala mundial na elucidação e produção de medicamentos oriundos de plantas e microrganismos. Este crescimento é estimado em cifras na ordem de 30 bilhões anuais, apresentando uma taxa aproximadamente de 15 %

anual, frente apenas a 4% dos medicamentos de origem sintética (CALIXTO, 2000; RODRIGUES, 2004).

Dessa forma, a busca por ambientes *in natura* potencialmente ricos em substâncias bioativas e elementos diversos direciona ao estudo das populações presentes no solo pelo fato deste comportar-se como um forte representante ambiental com característica rica e complexa, fecundo para o isolamento de substâncias biologicamente ativas (RANGASWAMI e OBLISAMI, 1967, BLACK, 2002; MURRAY, 2005).

Dentre os microrganismos do solo, com um papel econômico e industrial, os *Streptomyces*, apresentam-se versáteis em produzir metabólitos primários e secundários, cujas aplicações biotecnológicas enquadram-se nas mais diversas áreas (Vining, 1979). Entre estes metabólitos, destacam-se as mais diversas substâncias antibióticas pertencentes a diferentes classes com mecanismos distintos de ação (OMURA et al., 1999). A estrutura, fisiologia e ecologia dos *Streptomyces* spp foram caracterizadas, e com isso várias rotas de síntese de produtos bioativos descobertas, as quais apresentam uma larga aplicação em diferentes áreas desde a clínica humana a agricultura (SASAKI, 2001; THOME & ALDER, 2002).

As substâncias elaboradas pelos *Streptomyces* spp são distribuídas entre as mais diversas classes a exemplo de enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores, antiparasíticos, antihelmínticos, antiprotozoários, antivirais, antimicrobianos, além de herbicidas e inseticidas de ampla aplicação na agricultura (SANGLIER et al., 1993; DAMAIN, 1995).

Estas substâncias exibem grande diversidade química, contudo, novas estruturas também têm sido isoladas de outros gêneros representantes de solo fértil, principalmente *Actinomadura*, *Actinoplanes* e *Micromonospora*, difundindo as opções em estudo de microrganismos de solo (LAZZARINI et al., 2002).

Objetivo

Destacar a importância do estudo dos *Streptomyces* spp. isolados de solo, por meio de um levantamento bibliográfico em artigos científicos e sites especializados pertinentes à temática, no período de setembro de 2006 a dezembro de 2007.

O solo

Poucos ambientes na terra fornecem tão grande variedade de microrganismos como o solo fértil. Os microrganismos formam uma coleção microscópica, que pode alcançar um total de bilhões de organismos por grama de solo, sendo a maior proporção nas primeiras camadas de centímetro do solo, diminuindo à medida que se aprofunda (PELCZAR et al., 2000).

Os *Actinomycetes* constituem de 10% a 15% da população total do solo, podendo atingir proporções em até 95% em condições especiais. Dentre os actinomicetos do solo o gênero *Streptomyces* spp. é o que predomina, tanto por seu volume quanto por sua diversidade, constituindo em até 70% das colônias de *Actinomycetes* isoladas (TORTORA et al., 2000).

Pesquisa de antibióticos a partir de *Streptomyces* do solo

Suggar isolou uma amostra de *Streptomyces* do solo de Missouri nos Estados Unidos, cepa esta que produzia uma substância antibiótica cor ouro a qual foi denominada aureomicina. Dessa forma, começou o trabalho de isolamento de microrganismos a partir de fontes naturais diversas, em especial o solo com o propósito de descoberta de novas descobertas (ALEXANDRE, 1991). Sêmedo et al (2001), isolaram e caracterizaram *Actinomycetes* do solo brasileiro, em especial das regiões do Cerrado de Brasília - DF e Rio de Janeiro - RJ destacando 18 cepas com atividade antimicrobiana, sendo 16 delas pertencentes ao gênero *Streptomyces* spp.

Streptomyces

Streptomyces são bactérias aeróbias, esporuladas, Gram-positivas pertencentes à ordem *Actinomycetales* e a família *Streptomycetaceae*, e caracterizam-se por apresentar hifas vegetativas, formação de micélio ramificado com rara fragmentação. Formam esporos ou conídios imóveis por septação regular do micélio aéreo, os quais se dispõem de forma retilínea, curvilínea ou espiralada. Apresentam textura lisa, peluda ou espiculada, capazes de produzir ampla variedade de exopigmento vegetativo e aéreo (PRESCOTT et al., 1999; TORTORA et al., 2000).

Os solos neutros e alcalinos são mais propícios ao desenvolvimento dos *Streptomyces*, porém existe uma maior facilidade em se encontrar estas bactérias em

solos bem drenados como os arenosos ou aqueles cobertos por pedra-calcárea (MADIGAN et al., 1996).

Segundo Chater (1989), a síntese de inúmeros compostos de interesse biotecnológico por *Streptomyces* pode está relacionado com a diferenciação celular e formação do micélio aéreo, intimamente correlacionados como foi demonstrado pelos estudos realizados com o *Streptomyces coelicolor* (HOPWOOD, 1989; WOHLLEBEN et al., 1993).

Importância econômica e industrial dos *Streptomyces*

Os *Streptomyces* destacam-se por sua versatilidade na produção de metabólitos secundários cuja às aplicações biotecnológicas enquadram-se nas mais diversas áreas (VINNINGI, 1979). Segundo Manfio e Lemos (2001), inúmeros Centros de Pesquisas e Empresas apresentam interesse nos estudos dos *Streptomyces*, em especial pela produção de metabólitos primários e secundários com atividade antibiótica e antitumoral.

Os antibióticos são considerados metabólitos secundários assim como pigmentos e alcalóides, e se caracterizam pela grande diversidade de estruturas químicas. O papel biológico dos metabólitos secundários, geralmente é desconhecido e ocorre em diferentes microrganismos (HIROCHIKA et al., 1984).

Os antibióticos são produtos de origem natural tradicionalmente os mais explorados nesta área, contudo outros compostos a partir de *Streptomyces* têm sido investigados em escala de triagem farmacológica industrial, como os agentes

antitumorais, inibidores enzimáticos, imunomoduladores entre outros (MANFIO e LEMOS, 2001).

A aplicação de microrganismos na produção de fármacos teve um desenvolvimento acelerado a partir da descoberta da produção de actinomicina por *Streptomyces antibioticus* Waskman e Woodruff, (1994), despertando um grande interesse da comunidade científica e industrial pelo estudo destes microrganismos.

Os *Actinomycetes* em particular as bactéria do gênero *Streptomyces* são responsáveis pela produção de mais de 4.000 antibióticos (KORN-WENDISCH e KUTZNER, 1992; FURUMAI et al, 2002). Segundo Prescott et al., (1999), 50% de todos os *Streptomyces* isolados têm mostrado serem de produtores de antibióticos das mais diversas classes como: aminoglicosídeo, macrolídeo, beta-lactâmico, glicopeptídeo, tetraciclina, polieno e quinolona.

Aproximadamente 50 antibióticos produzidos por *Streptomyces* têm encontrado aplicação prática na Medicina Humana e Veterinária. Os mais comuns são: anfotericina-B, clindamicina, eritromicina, estreptomicina, novobiocina, nistatina e clorafenicol (OMURA, 1999).

Isolamento a partir do solo

As colônias isoladas de *Streptomyces* do solo variam de 1 a 10 mm de diâmetro. São discretas, duras e coréaceas. Inicialmente, sua superfície é lisa e uniforme, mas depois envolve uma ampla variedade de micélio aéreo que pode apresentar aspecto granuloso, empoeirado, aveludado ou flocoso (GARCIA-QUINTANA, 1997).



Fonte: Oliveira, TL, 2006.

Figura 1. Colônias granulosas e empoeiradas de *Streptomyces* spp. isolado de solo paraibano.

O isolamento dos *Streptomyces* do solo é relativamente fácil por meio de suspensão da amostra do solo em água estéril, diluída e semeada em meio de cultura seletivo contido em placas de Petri, incubadas a 25-30°C (MADIGAN et al., 1996; MACHMAR, 2005).

Para o processo de identificação dos *Streptomyces* spp são preconizados na literatura a realização de estudos macromorfológicos analisando cor, tamanho, aspecto e exopigmento, micromorfológicos com estudo da cadeia dos esporos, testes fisiológicos

de degradação e produção de substâncias, bem como, ensaios citoquímicos realizados para a confirmação dos *Streptomyces* (MADIGAN et al., 1996).



Fonte: Oliveira, TL, 2006.

Figura 2. Macromorfologia das colônias de *Streptomyces* isoladas de solo paraibano com liberação de exopigmento.



Fonte: Machmar, YY, 2005.

Figura 3. Micromorfologia de *Streptomyces* isolados do solo chileno.

A metodologia descrita por Garcia-Quintana et al., (1997) tem apresentado resultados satisfatórios obtendo-se amostras puras de *Streptomyces* spp potencialmente produtoras de substâncias bioativas. Estudos utilizando este método de isolamento apresentaram resultados satisfatórios com a elucidação química e comprovação de substâncias com atividade antifúngica *in vitro* observada na pesquisa desenvolvida em regiões de lagos no Chile por Yanittza Machmar em 2005.

No Estado da Paraíba pesquisas com *Streptomyces* spp., tem revelado metabólitos bioativos com efeito antagônico sobre bactérias como o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa (OLIVEIRA, TL, 2007). Vieira, et al., (2002), avaliou as propriedades antimicrobianas de 133 cepas de *Streptomyces* spp., isolados de solos da Paraíba, evidenciando o antagonismo entre as cepas e amostras bacterianas.

Oliveira et al., (2007), evidenciou 02 cepas entre 68 isoladas de solos em leito de rios paraibanos em diferentes mesorregiões, produtoras de metabólitos bioativos capazes de inibir cepas patogênicas de fungos filamentosos como do gênero *Trichophyton* sp., e cepas leveduriformes como a *Candida albicans*.



Fonte: Oliveira, T. L., 2007.

Figura 4. Efeito antagônico de cepas de *Streptomyces* spp. isoladas de solo paraibano contra espécie de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diferentes tipos de solos paraibanos segundo estudos realizados, apresentam-se fecundos para o isolamento de *Streptomyces* spp. produtores de substâncias bioativas com características antimicrobianas, antitumoral entre outras.

As substâncias bioativas elaboradas pelos *Streptomyces*, apresentam atividades diversas com ação antibacteriana, antifúngica e antitumoral.

A investigação do potencial terapêutico dos produtos bioativos a partir dos *Streptomyces* torna-se cada vez mais necessário frente aos inúmeros relatos de microrganismos resistentes e multiresistentes as drogas antimicrobianas usuais.

Sendo assim, tornar-se oportuno e promissor o estudo dos *Streptomyces* spp como ferramenta biotecnológica na elucidação de novas substâncias, e rotas para produção em escala industrial de futuros fármacos, menos tóxicos e mais acessíveis.

REFERÊNCIAS

1. ALEXANDRE, M. **Introduction to soil Microbiology**. 2 ed. NewYork: Wiley, 1991.
2. BLACK, G. J. **Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 22.p 574-609.
3. CALIXTO, J.B. Biopirataria. **Ciência Hoje**, v.28, n.167, p.37-43, 2000.
4. CHATER, K.F.; MERRIK, M.J *Streptomyces* In: **Development biology of Prokaryotes**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989.
5. DAMAIN, A. L., Why do microorganisms produce antimicrobials? In: HUNTER, P. A.; DARBY, G. K.; RUSSELL, N. J. (eds). **Fifty Years of Antimicrobials: Past, Prospective and Future Trends**. Cambridge: University Press, p. 205-228, 1995.
6. FURUMAI, T., Y. IGARASHI, H. HIGUCHI, N.SATIO, and T. OKI. Kosinostatin, a quinocycline antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. **J. Antibiot.** 55, 128-133, 2002.
7. GARCIA-QUITANA, H.; ZAROR, C.; LEIVA, P.S. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* spp aisladas de suelos chilenos. **Rev. Méd. Chile**, v.125, p. 1157 - 1164, 1997.
8. HIROCHIKA, H.; NAKAMURA, K.; SARA, G.K.A. Linear DNA plamid form *Streptomyces rochei* with and inverted terminal petion of 614 base pairs. **The EMBO Journal**, v.3, p.716-766, 1984.
9. HOPWOOD, DA. **Streptomyces genetics in pure and applied research**. In: **Genetics and Molecular Biology** of Industrial Microorganisms, Washinton: American Society for Microbiology, 1989.

10. KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, HJ. The family *Streptomycetaceae*. In: BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN. **The prokariots. A handbook on the biology of bacterias: ecophysiology, isolation, identificacion, applications**. Vol. I, 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1992.
11. KUSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature** (London), v.202, p.928-929, 1964.
12. LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; TOPPO, G.; MARINELLI, F. Rare genera of *Actinomycetes* as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 399-405, 2002.
13. MACHMAR, Y.Y. Actividad antifungica de *Streptomyces* spp. sobre hongos levaduriformes obtenidas de muestra de suelo chileno. Tese de Doutorado Valdivia: Universidade Austral do Chile, 2005.
14. MADIGAN, T.M.; MARTINHO, J.M.; PARQUER. J. **Biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996.
15. MANFIO, G.P.; LEMOS M.F. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Microrganismos e aplicações industriais**. Acesso em 24 de setembro de 2001.
16. MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K.SPFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 5ª ed. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.
17. OLIVEIRA, T. L., et al. Atividade antibacteriana produzida por estreptomicetos isolados de solos paraibanos. **Rev. de Ciências da Saúde Nova Esperança**. 5 (1) 87-92, 2007.
18. PELCZAR Jr., Joseph Michael. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, vol. 3, 3 ed., São Paulo: Editora Makron Books, 2000.

19. PRESCOTT, H.S.; HARLEY, P.; KLEIN, D.A. **Microbiology**. 4 ed., New York: Mc Graw Hill, 1999.
20. RANGASWAMI, G.; OBLISAMI, G. A study of the correlation between the antagonistic *Actinomycetes* and the physical and chemical properties of some soils of south India. **India Phytopathology**, v. 20, p. 280 - 290, 1967.
21. RODRIGUES, G. Fitomedicamentos têm notável expansão mercadológica. **Jornal Phytociência** v.1, p.1-2, 2004.
22. SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T.A.; FEHR, T. Novel bioactive compounds from *Actinomycetes*: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, v. 144, p. 633-642, 1993.
23. SÊMEDO, L. et al. Isolation and characterization of *Actinomycetes* from Brazilian tropical soils. **Microbiol. Res.**, v.155, p291, 2001.
24. THOME, G.M.; ALDER, J. Daptomycin: a novel lipopeptide antibiotic. **Clinical Microbiology Newsletter**.v. 24. n.5. p.33-40, 2002.
25. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2000.
26. VIEIRA, K.V.M.; OLIVEIRA, E.L.; FARIAS, M.A.A.; CYSNEIROS, C.O. Propriedades antimicrobianas de *Streptomyces* isolados de solos do Estado da Paraíba-Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 6. n.3. p:249-258.
27. VINING, L.C. Secondary metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. (ed) **Biotechnology**. v. 4, p.21-29, 1979.
28. WASKMAN, S.A.; WOODRUFF, H.B. *Actinomyces* antibioticus, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Journal of Bacteriology**, 42.p231-249, 1994.

29. WOHLLEBEN, W.; MUTH, G.; KLINOWSKI, JORN. Genetic engineering of Gram-positive bacteria. In: PUNHER, A. (ed) **Genetic engineering**, New York: Academic Press, 1993.

ANEXO III

Atividade Antifúngica e Cinética de Morte Microbiana de Extratos Obtidos de
Streptomyces spp Isolados de Solos Paraibanos.

Aceito para publicação - Revista Brasileira de Farmacognosia em 24/11/08

**Atividade Antifúngica e Cinética de Morte Microbiana de Extratos
Obtidos de *Streptomyces* spp Isolados de Solos Paraibanos**

**Thompson Lopes de Oliveira¹, Edeltrudes de Oliveira Lima², Ivone Antonia de
Souza³, Luis Conrado Z. Cornejo⁴*

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPE, Av. Arthur de Sá, s/n,
Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB, Av. Castelo Branco, s/n, Cidade
Universitária 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

³Departamento de Antibióticos, UFPE, 50740-521, Recife, PE, Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia (ICBM) - Facultad de Medicina - Universidad de Chile,
A, da Independencia 1027, Santiago, Chile.

RESUMO: Foram coletadas 68 amostras em diferentes solos paraibanos, com o isolamento de 49 cepas de *Streptomyces* spp. Após triagem antimicrobiana por meio da técnica de difusão em meio sólido com blocos de agar, foram preparados os extratos dos microrganismos produtores de metabólitos bioativos, respectivamente cepas SP1 e SP3, e em seguida avaliados quanto a atividade antifúngica frente a espécies de fungos filamentosos de origem clínica e ATCC. O antagonismo foi determinado através dos ensaios de difusão com discos em meio sólido, microdiluição e cinética de morte microbiana. Os halos de inibição obtidos a partir dos extratos Sp-1 e Sp-3 apresentaram efeito antagônico com valores superior aos halos de inibição promovida pela droga controle, usualmente utilizada na terapêutica antifúngica. Os resultados das concentrações inibitórias mínimas na microdiluição foram expressivos com valores fungicidas variando entre 10 mg e 0,078125 mg. Na cinética de morte microbiana, as atividades dos extratos Sp-1 e Sp-3 resultaram em dados estatisticamente significativos frente às cepas testes.

Unitermos: *Streptomyces*, extratos, atividade antifúngica, cinética.

ABSTRACT: “**Antifungal activity and kinetics of microbial death of extracts obtained from *Streptomyces* spp isolated from soils paraibano**”. 68 samples were collected in different soils of Paraiba, with the isolation of 49 strains of *Streptomyces* sp. After screening antimicrobial followed the method of diffusion in solid medium with agar block, the extracts were prepared from microorganism producers of bioactive metabolites, respectively strains SP1 and SP3, and then evaluated for antifungal activity against strains of filamentous fungi of origin clinical and ATCC. The antagonism was determined through testing of diffusion disc in solid medium, microdilution and kinetics of microbial death. The inhibition zones obtained from extracts of Sp-1 and Sp-3 showed antagonistic effect with values greater than the halos of inhibition promoted by the drug control, often used in antifungal therapy. The results of minimum inhibitory concentrations in microdilution were significant with fungicide values ranging between 10 mg and 0.078125 mg. In the kinetics of microbial death, the activities of the extracts Sp-1 and Sp-3 resulted in statistically significant data front of strains tested.

Key-words: *Streptomyces*, extract, antifungic activity, kinectics.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado e prolongado de drogas antimicrobianas sintéticas tem levado à seleção de microrganismos patogênicos cada vez mais resistentes, com perfis de multiresistência. Este problema é intensificado em países como o Brasil, onde a população tem por hábito a automedicação, utilizando de maneira indevida os antibióticos, em dosagens e posologia (Tresoldi et al., 2000). Em consideração à crescente importância clínica, laboratorial e terapêutica dispensada às infecções

fúngicas e bacterianas, inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas no sentido de obter novos fármacos naturais ou sintéticos, que sejam menos tóxicos e apresentem atividade contra cepas de microrganismos resistentes (Lima et al., 1995).

Dessa forma, a pesquisa com organismos produtores de metabólitos ativos com efeito antagônico contra cepas de fungos e bactérias está sendo cada vez mais difundida em todo o mundo. Cerca de, 84% dos antibióticos de origem natural encontrados são produzidos por microrganismos do solo em especial os *Streptomyces* spp com resultados extremamente eficazes (Sanches-Marroquin, 1985). Os *Streptomyces*, dentre os *Actinomycetes*, lideram a produção de antibióticos e moléculas farmacologicamente ativas, enquadradas em uma diversidade de classes, como: aminoglicosídeo, macrolídeo, ansamacrolídeo, beta-lactâmico, peptídeo, glicopeptídeo, antraciclina, tetraciclina, nucleosídeo, polieno e quinona (Garcia-Quintana, 1997).

Desta forma, a utilização da ecologia na prospecção de microrganismos de interesse biotecnológico isolados de solos e de plantas medicinais, tornou-se mais freqüente e vem mostrando a descoberta de novos metabólitos bioativos (Strobel e Daisy, 2003; Wiyakrutta et al., 2004; Li et al., 2005).

Portanto, julgou-se oportuno a realização desta pesquisa com objetivo de avaliar a capacidade de antagonismo através da produção de metabólitos bioativos pelas cepas nativas de *Streptomyces* spp isoladas de solos paraibano e cepas fúngicas de origem clínica e ATCC.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e isolamento de colônias de *Streptomyces* spp

Foram coletadas 68 amostras de solo do leito dos principais rios que formam as bacias hidrográficas no Estado da Paraíba, distribuídos nas seguintes mesorregiões: Litoral Paraibano, Agreste Paraibano, Borborema e Sertão Paraibano. Utilizando-se recipientes estéreis retirou-se cerca de 300 g de amostra do solo entre 1-9 cm de profundidade. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir de 10 g de cada amostra homogeneizada até 10^{-7} diluição em solução fisiológica estéril. Após 15 minutos de agitação em vortex, foram semeadas as três últimas diluições em alíquotas, 0,1 mL do sobrenadante em meio de cultivo Kuster-Willians. Posterior a incubação a 28° C por 05 dias, as colônias com características de *Streptomyces* foram isoladas, e identificadas por meio de microcultivo, testes fisiológicos e ensaios citoquímicos (Serrano e Sandoval, 1992; Garcia-Quintana, 1997).

Preparação dos extratos a partir dos *Streptomyces*

Após triagem antimicrobiana através do método de difusão em meio sólido com bloco de agar Ichikawa et al., (1971), as cepas SP1 e SP3 apresentaram os melhores resultados entre todas e seguiram na realização dos testes frente a espécies fúngicas. As linhagens foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ISP-2 e incubadas em estufa BOD a 30°C por 05 dias. Após incubação, blocos de gelose (06 mm) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL do meio ISP-2. Em seguida, iniciou-se incubação sob agitação (180 rpm), a 28°C por 48 horas.

Posteriormente, 10% (v/v) deste pré-inóculo para cada linhagem foi transferido para Fernbach, contendo cada 300 mL do meio ISP-2 e cultivados por 48 horas sob as mesmas condições de temperatura e agitação. Após fermentação foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para a separação do líquido fermentado da massa celular.

Para a extração dos princípios ativos de cada líquido fermentado foi utilizado como solvente o etanol. Utilizou-se uma proporção de 1:2 dos líquidos fermentados, seguido da agitação durante 20 minutos em *shaker*. Foi realizada a separação das fases, uma orgânica composta pelo solvente com o princípio ativo extraído, e outra aquosa que consistiu na fase aquosa do líquido esgotado. Em seguida, as fases com os princípios ativos foram concentradas em evaporador rotatório, e mantidas em dessecador.

Microrganismos e meios

As linhagens selecionadas para a realização dos testes de antagonismo pós triagem antimicrobiana foram o *Aspergillus niger* LM 05, *Aspergillus fumigatus* ATCC 40640, *Trichophyton rubrum* ATCC 1683 e *Trichophyton inkin* LM 067. As espécies foram mantidas em meio Sabouraud dextrose (DIFCO) por 14 dias a temperatura ambiente.

Ensaio de atividade antimicrobiana

Foram preparados inóculos em solução salina estéril a 0,89 % das linhagens testes ajustadas na escala de Mc Farland (01×10^8 UFC/mL), mantidas a temperatura ambiente. A atividade inibitória foi verificada pelas técnicas difusão com discos em

meio sólido (Bauer et al., 1966) e microdiluição (Nccls, 2002). No ensaio de difusão com discos, foi adicionado em uma placa de Petri estéril 01 mL de cada microrganismo-teste, seguido de 20 mL do meio Sabouraud dextrose fundido a 45° C. Após solidificação, foram embebidos discos de papel de filtro com 30 µL de cada extrato em uma concentração de 10 mg/mL e colocados sobre a superfície do meio de cultura contendo os microrganismos-testes. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 14 dias. Após incubação os halos foram medidos e comparados com a droga controle, cetoconazol 50 µg/mL. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi realizada através da microdiluição, em placas de ELISA com 96 poços estéreis. Foram distribuídos 100 µL de caldo Sabouraud dextrose nos orifícios das placas, exceto na linha 10. Em seguida, foram dispensados 100 µL de cada extrato em cada placa em uma concentração de 20 mg/mL nas cavidades da primeira linha. Seguindo o processo de diluição seriada, foi retirada 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Nos orifícios de cada coluna foram dispensados 10 µL do inóculo correspondente a cada cepa ensaiada. A linha 11 foi reservada para o controle negativo com o caldo e a linha 12 para o controle positivo com a droga cetoconazol 50 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada extrato, incubados a temperatura ambiente por até 14 dias. A leitura de determinação da CIM dos extratos Sp-1 e Sp-3, sobre as cepas testes, foram realizadas através do método visual, observando a formação ou não do aglomerado celular, considerando como CIM a menor concentração do produto em teste.

Determinação da cinética de morte microbiana

O estudo da interferência das concentrações inibitórias mínimas dos extratos Sp-1 e Sp-3 sobre a viabilidade das cepas fúngicas foi realizado através da avaliação do crescimento radial das colônias em mm dos fungos filamentosos em intervalos de (0, 2, 4, 6, 8, 10,12 e 14 dias) em triplicata. Inicialmente, inoculou-se em placas de Petri estéreis 09 mL de meio Sabouraud acrescido de 01 mL de cada extrato em concentrações estabelecidas a partir do valor da CIM, homogeneizando até resfriamento. Em seguida, retiraram-se fragmentos de aproximadamente 02 mm de cada cepa fúngica ensaiada, colocando-os no centro da placa, incubando a temperatura ambiente por 14 dias. No controle positivo foi utilizado (09 mL do meio + 01 mL) de cetoconazol na concentração de 50 µg/mL e o controle negativo (09 mL do meio + 1 mL de salina estéril (Thyagara & Hosono, 1996, Adam et al., 1998, Daferera et al., 2000 Rasooli e Mirmostafa, 2002).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA - Bonferroni, e considerados significativos com $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação dos resultados da atividade antifúngica através do teste de difusão com discos em meio sólido o extrato Sp-1 apresentou inibição fúngica com halos entre

21-31 mm frente às espécies testes. O extrato Sp-3 apresentou efeito antagônico com halos de inibição superior ao extrato Sp-1, 24 mm contra o *T. rubrum* ATCC 1683 e 35 mm frente ao *A. fumigatus* ATCC 0406. Na Tabela 1 pode-se observar todos estes dados, bem como, os valores inibitórios da droga controle, inferior aos extratos testados, droga esta, comumente utilizada na terapia antifúngica. Os resultados apresentados pelo efeito dos extratos são relevantes e podem ser comparados com outras literaturas que apresentam estudos realizados com cepas nativas de *Streptomyces* spp, com atividade antifúngica, a partir de solos no Brasil (Schlingmann et al., 1999, Bachiega et al., 2005).

Na Tabela 2. observar-se os dados de inibição em concentrações diferenciadas dos extratos Sp-1 e Sp-3 frente as amostras de fungos filamentosos. Na concentração inibitória mínima (CIM) de 0,078125 mg os extratos Sp-3 e Sp-1 apresentaram o mesmo resultado frente à cepa de *T. inkin* LM 067. Na concentração inibitória mínima (CIM) de 0,15625 mg o extrato Sp-1 mostrou-se eficaz em seu efeito antagônico contra o *A. niger* LM 05, *T. inkin* LM 067 e *A. fumigatus* ATCC 0406. O Sp-3 inibiu em mesma concentração as espécies *A. niger* LM 05, *T. inkin* LM 067 e *T. rubrum* ATCC 1683. Estes dados de inibição são corroborados por outras literaturas que também realizaram pesquisa de novos compostos antimicrobianos através de triagem clássica de produtos naturais (Groll et al., 1998, Ujikawa, 2003). Na microdiluição, o grupo controle sem droga inibitória apresentou o resultado esperado com crescimento para todas as espécies, e o controle com a droga antifúngica padrão cetoconazol 50 µg/mL inibiu o crescimento das cepas *T. inkin* LM 067 e *A. fumigatus* ATCC 0406.

No gráfico 1. observam-se as curvas da cinética de morte para as duas espécies do gênero *Aspergillus*, destacando o relevante efeito antifúngico dos extratos Sp-1 e Sp-

3. Na análise entre o controle e extratos todos os resultados foram significativos com redução do crescimento micelial dos fungos ($p < 0.05$). Na análise controle e cetoconazol, a inibição da droga não foi significativa no ensaio com a cepa *A. fumigatus* ATCC 0406. No gráfico 2. a inibição do crescimento micelial foi significativo para a cepa ensaiada *T. inkin* LM 067 com valores ($p < 0.01$), na relação entre controle e extratos e controle e cetoconazol. Alguns trabalhos vêm explorando o potencial de substâncias bioativas extraídas de plantas e de microorganismos contra o crescimento micelial de fungos patogênicos e outros microrganismos. Salvagnni et al. (2008), avaliou a atividade antibacteriana a partir de extratos de *Myrtus communis* L. frente a cepas Gram positivas e Gram negativas, Moreira (2006), determinou a cinética de algumas substâncias bioativas contra fungos dematiáceos, *C. cladosporioides* e *F. compacta*, observando efeito positivo contra o crescimento radial ao longo de 14 dias de exposição. Sharma e Tripatti (2006), observaram que o óleo de *Citrus sinensis* na concentração de 3,5 µg/mL foi capaz de inibir 100 % do crescimento micelial do *A. niger* após 07 dias de exposição. Pode-se inferir que os extratos obtidos a partir das cepas nativas de *Streptomyces* spp de solos paraibanos apresentam-se notáveis quanto à produção de metabólitos bioativos capazes de inibir o crescimento de cepas fúngicas patogênicas, se apresentado como uma nova rota na busca por novas drogas antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

Adam, K, Sivropoulou, A, Kokkni, S, Lnaras, T, Arsenakis, M 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare subsp. Hirtum*, *Mentha spicata*, *lavadula augustifolia* and *Salia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.5, p.1739-1745.

Bachiega, GL, Vilegas, W, Ujikawa, K 2005. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* V.26, nº1, p. 29-37.

Bauer AW, Kirby MDK, Sheries JC, Truck, M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493-496.

Daferera, DJ, Ziogas, BN, Polissiou, MG, 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greeks aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agriculture and Foods Chemistry*, v. 48, n.6, p.2576-2581.

Garcia-Quitana, H, Zaror, CL, Leiva, P.S 1997. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. *Rev. Med. Chile.*, v.125, p.1157-1164.

Groll, AH, Delucca, AJ, Walsh, TJ 1998. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbial.* 6(3):117-124.

Ichikawa T, Ishikura T, Osaki A 1971. Improvement of kasugamycin - Producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* v.16, n.3, p.218-224.

Li, H, Qing, C, Zhang, Y, Zhao, Z 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21(8-9), p. 1515-1519.

Lima, OG. et al., 1995. Algumas observações sobre a ação antifúngica de um *Streptomyces* sp. (cepa 233-IAUR). *Revista do Instituto de Antibióticos*, v.1, n.1, p.3-7.

Moreira, ACP, 2006. Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre fungos dematiacéos. 94p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba.

NCCLS, 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Vilanova, *Nccls*. v.17, n. 9 (Document m 27-A2).

Rasooli, I, Mirmosfata, SA 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oil. *Fitoterapia*. 73:244-250.

Salvaganni, LE, Oliveira, JRS, Santos, LE, Pietro, RCLR 2008. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L (*Myrtaceae*). *Rev. Brasileira de Farmacognosia*. 18(2); 241-244.

Sanches-Marroquin, A 1985. *Streptomyces* de amplio espectro antimicrobiano aislados de suelos de Brasil. *Rev. do Inst. de Antib.*, v.1, p.53-63.

Serrano, JA ; Sandoval, H 1992. Tecnnicas para el aislamiento y diagnóstico de los *Actinomycetales*. *Manual de Laboratorio*. Valdivia: Facultad de Medicina U.A.L

Scharma, N. Tripahi, A, 2006. Effects of Citrus (L) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 9-17.

Schlingmann, G, Milne, L, Bordes, D.B, Carter, GT 1999. Strevertenes, antifungal pentene macrolides produced by *Streptoverticillium* LL-30F848. *Tetrahedron*, v.55, p.5977-5990.

Strobel, GA, Daisy, B 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67(4), p. 491-502.

Thyagara, N, Hosono, A 1996. Effect of spice extract on fungal inhibition. *Lebensmittel wissenschaft ind technology*, v. 29, n.3, p.286-288.

Tresoldi, AT, Barison, EM, Pereira, RM, Padoveze, MC, Trabasso, P 2000. Risk factors associated with the acquisition of multiresistant bacteria in a pediatric nursery. *Jornal de Pediatria*, v. 4, p. 275-286.

Ujikawa, K 2003. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 39, n.2, abr./jun.

Wiyakrutta, S, Riubolmas, N, Panphut, W, Thongon, N, Danwisetkanjana, K, Ruangrunsi, N, Meevootisom, V 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from the medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20(3), p. 265-272.

Tabela 1. Atividade antifúngica dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp contra fungos filamentosos.

Espécies Fúngicas	Método de Difusão com Discos em Meio sólido		
	Sp-1	Sp-3	Cetoconazol
<i>A. niger</i> LM 05	24	29	20
<i>T. inkin</i> LM 067	25	31	19
<i>A. fumigatus</i> ATCC 0406	31	35	21
<i>T. rubrum</i> ATCC 1683	21	24	20

Legenda

Halos expressos em mm - milímetros
Cetoconazol 50 µg/mL - droga padrão
Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos
ATCC - America Type Culture Colection
LM - Laboratório de Micologia

Tabela 2. Ensaio antifúngico em placas de microdiluição dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* spp contra fungos filamentosos.

Extratos (mg/mL)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichophyton inkin</i>	<i>Trichophyton inkin</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	LM 05	LM 05	LM 067	LM 067	ATCC 0406	ATCC 0406	ATCC 1683	ATCC 1683
	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3	Sp-1	Sp-3
10 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
05 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
1,25 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
0,625 mg	-	-	-	-	-	-	+	-
0,31250 mg	-	-	-	-	-	+	+	-
0,15625 mg	-	-	-	-	-	+	+	-
0,078125 mg	+	+	-	-	+	+	+	+
Controle *	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle +	+	+	-	-	-	-	+	+
Antifúngico**								

Legenda

Halos expressos em mm - milímetros

**Cetoconazol 50 µg/mL - droga padrão

Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos

ATCC - America Type Culture Colection

LM - Laboratório de Micologia

Caldo Sabouraud + microrganismo*

(-) Ausência de crescimento microbiano

(+) Crescimento microbiano

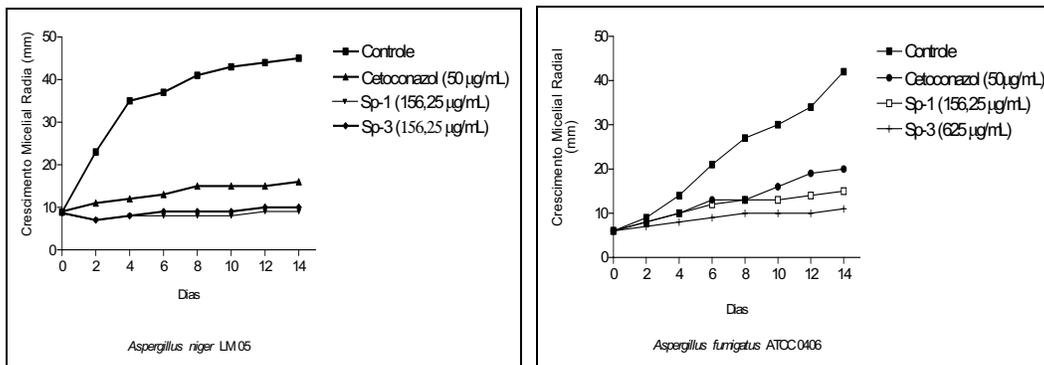


Gráfico 1. Efeito dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* e da droga Cetoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *A. niger* LM 05 e *A. fumigatus* ATCC 0406. ANOVA-Bonferronis ($p < 0.05$).

Legenda

ATCC - America Type Culture Collection

mL - mililitro

mm - milímetros

µg - micrograma

LM - Laboratório de Micologia

Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos

NaCl - Cloreto de sódio

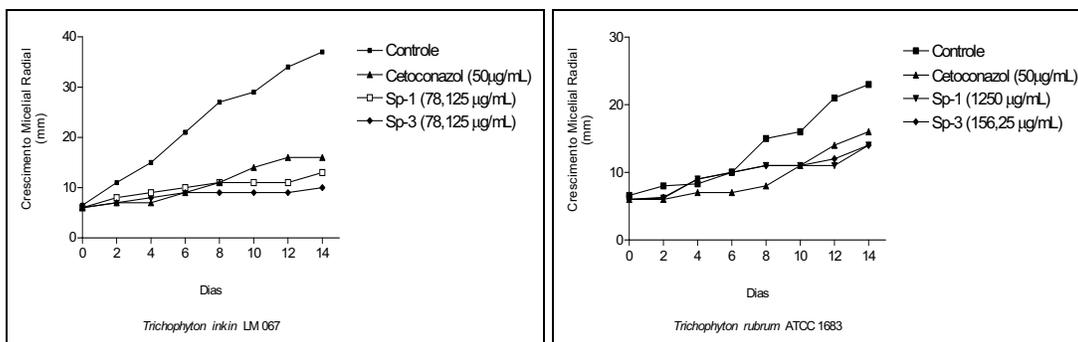


Gráfico 2. Efeito dos extratos Sp-1 e Sp-3 isolados de *Streptomyces* e da droga Ketoconazol sobre a cinética de morte microbiana de *T. inki* LM 067 e *T. rubrum* ATCC 1683. ANOVA - Bonferronis com ($p < 0.01$), para o *T. inki* LM 067.

Legenda

ATCC - America Type Culture Collection

mL - mililitro

mm - milímetros

µg - micrograma

LM - Laboratório de Micologia

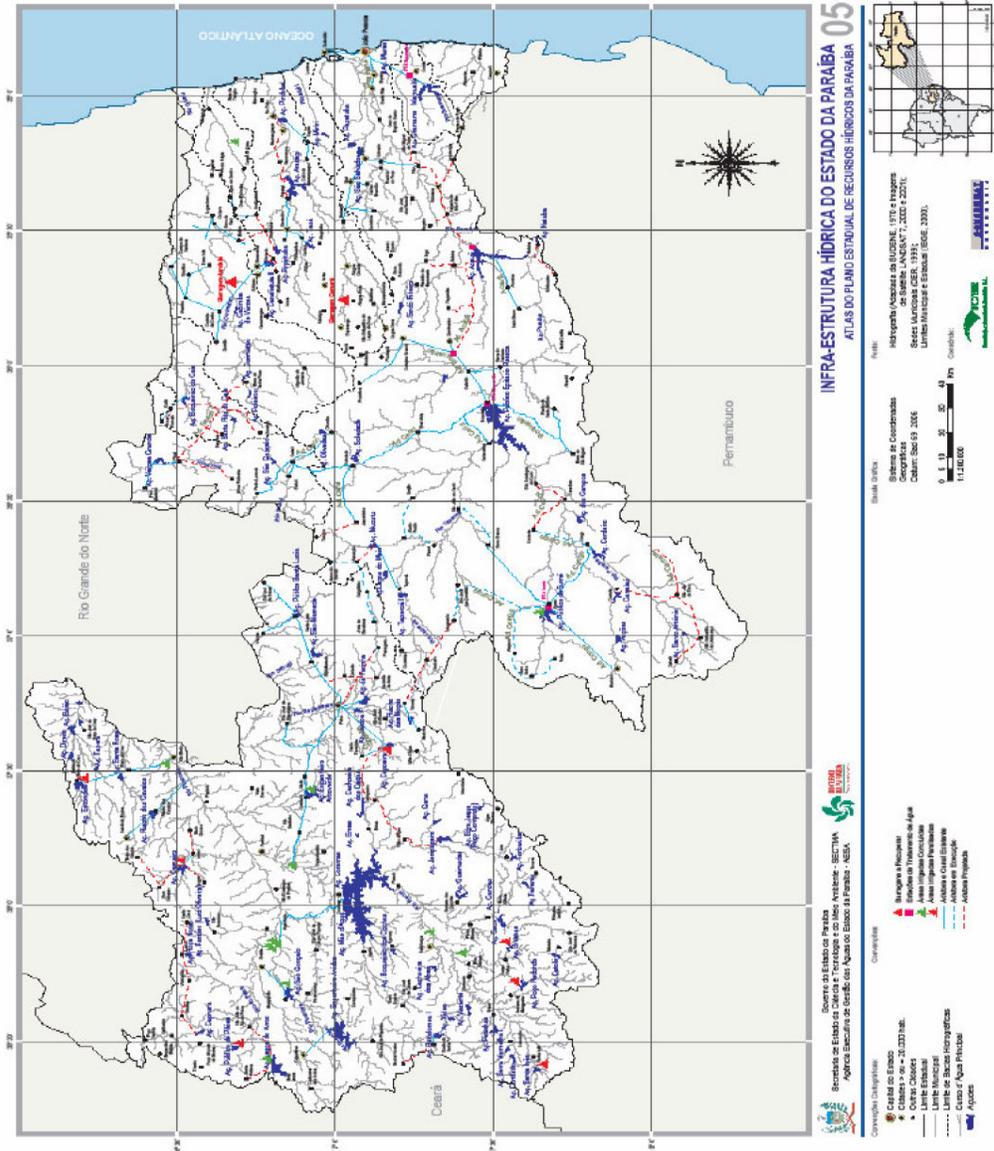
Sp-1 e Sp-3 - extratos secos etanólicos

NaCl - Cloreto de sódio

ANEXOS

10





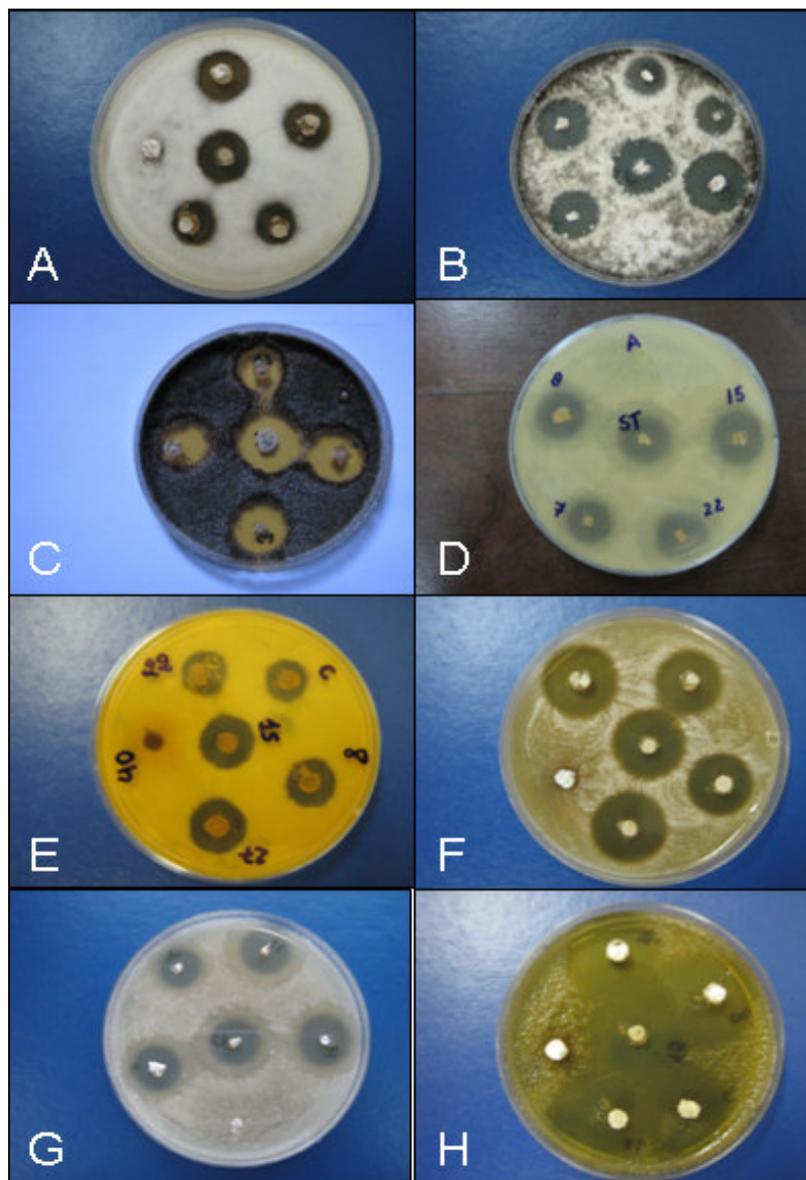
Fonte: Atecel (2002).

Figura 2. Estrutura hídrica com principais rios, onde foram realizadas as coletas de amostras de solo rios no Estado da Paraíba.

Distribuição das coletas de solo em leito de rios do Estado da Paraíba entre os meses de agosto de 2006 a janeiro de 2007:

- Rio Gramame** - 8 coletas;
- Rio Paraíba** - 8 coletas;
- Rio Mamanguape** - 7 coletas;
- Rio Taperoá** - 8 coletas;
- Rio Espinharas** - 8 coletas;
- Rio Piranhas** - 8 coletas;
- Rio Piancó** - 7 coletas;
- Rio do Peixe** - 7 coletas;
- Rio Curimataú** - 7 coletas.

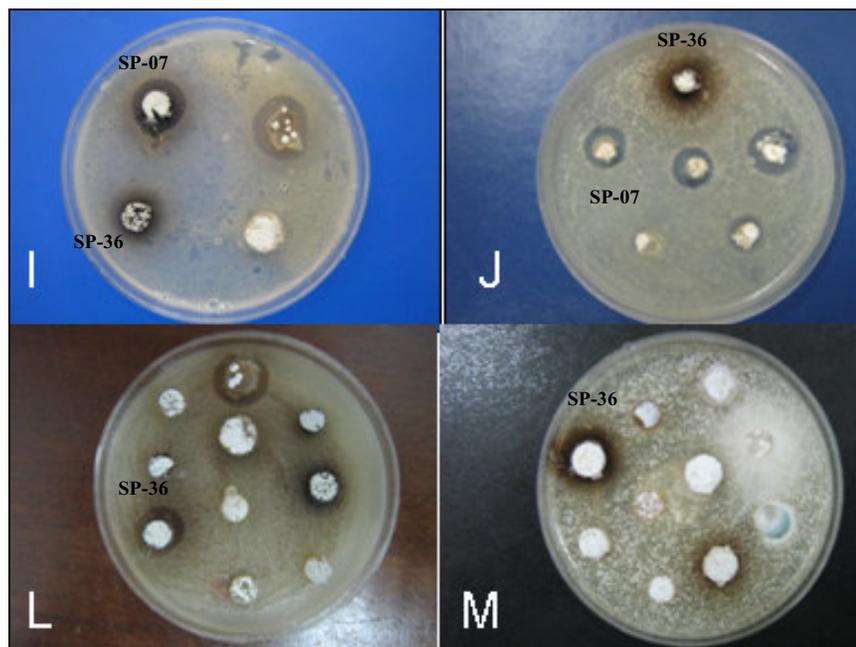
Triagem antimicrobiana através do método de difusão em meio sólido com bloco de Agar Ichikawa et al., (1971). As amostras SP1 e SP3 apresentaram os melhores resultados na realização do *screening* frente a espécies fúngicas, bem como, no rendimento na preparação dos extratos.



Fonte: Oliveira, T. L (2007).

Figura 3. Ensaio antagônico através de blocos de ágar entre os *Streptomyces* isolados de solos paraibanos, frente às espécies **A** - *A. flavus* ATCC 0406; **B** - *A. fumigatus* ATCC 0306; **C** - *A. niger* LM 05; **D** - *C. krusei* LM 12; **E** - *C. tropicalis* LM 37; **F** - *C. albicans* ATCC 13803; **G** - *C. albicans* ATCC 76485 e **H** - *T. inkin* LM 067.

Triagem antimicrobiana através do método de difusão em meio sólido com bloco de Agar Ichikawa et al., (1971). As amostras SP07 e SP36 apresentaram os melhores resultados no *screening* antibacteriano. Todavia, não revelaram rendimento suficiente no processo fermentativo para a obtenção dos extratos.



Fonte: Oliveira, T.L (2007).

Figura 4. Ensaio antagônico através de blocos de Agar entre os *Streptomyces* isolados de solos paraibanos, contra as espécies: **I** - *S. epidermidis* SSL - 01; **J** - *S. aureus* ATCC 6538; **L** - *S. aureus* LM - 13 e **M** - *S. Coagulase* negativo LM 02.

ANEXO II - Perfil de sensibilidade e resistência das espécies ensaiadas nas técnicas de difusão com discos em meio sólido, microdiluição em placas e cinética de morte microbiana.

Perfil das linhagens do gênero *Candida* spp utilizadas nos ensaios:

C. krusei LM 12 - **Sensível** às drogas (Fluconazol, Anfotericina, Miconazol, Cetoconazol e Nistatina).

C. tropicalis LM 37 - **Sensível** às drogas (Fluconazol, Anfotericina, Miconazol, Cetoconazol e Nistatina).

C. albicans ATCC 13803 - **Sensível** às drogas (Fluconazol, Anfotericina, Miconazol, Cetoconazol) **Resistente** (Nistatina).

C. albicans ATCC 76485 - **Sensível** às drogas (Fluconazol, Anfotericina, Miconazol, Cetoconazol) **Resistente** (Fluconazol e Nistatina).

Perfil das linhagens do gênero *Aspergillus* sp utilizadas nos ensaios:

A. niger LM 05 - **Sensível** às drogas (Fluconazol, Anfotericina, Miconazol, Cetoconazol e Nistatina).

A. fumigatus ATCC 0306 - **Sensível** às drogas (Nistatina, Anfotericina, Miconazol, Cetoconazol) **Resistente** (Fluconazol).

Perfil das linhagens do gênero *Trichophyton* sp utilizadas nos ensaios:

T. inkin LM 067 e *T. rubrum* - **Sensíveis** às drogas (Fluconazol, Anfotericina, Miconazol, Cetoconazol e Nistatina).

Perfil das linhagens do gênero *Staphylococcus* spp utilizadas nos ensaios:

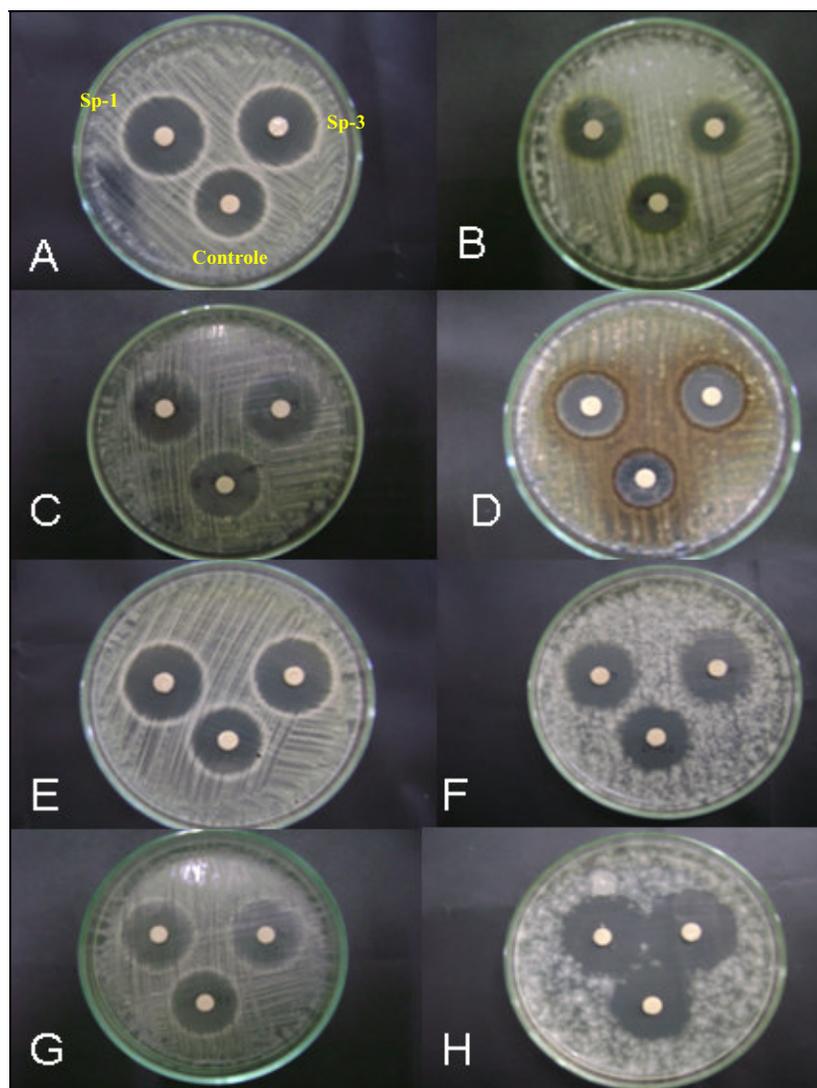
Staphylococcus aureus ATCC 6538 (**Sensível** - Oxacilina, Gentamicina, Amoxicilina, Cefalotina, Clorafenicol, Clindamicina, Eritromicina, Tetraciclina, Amicacina e Penicilina).

Staphylococcus epidermidis SSL 01 (**Sensível** - Oxacilina, Gentamicina, Amoxicilina, Cefalotina, Clorafenicol, Clindamicina, Ampicilina e Eritromicina); (**Resistente** - Tetraciclina, e Penicilina).

Staphylococcus aureus LM 13 (**Sensível** - Oxacilina, Amoxicilina, Gentamicina, Cefalotina, Clorafenicol, Clindamicina e Eritromicina); (**Resistente** - Tetraciclina, Ampicilina, e Penicilina).

Staphylococcus coagulase negativo LM 02 (**Sensível** - Todas às drogas testadas).

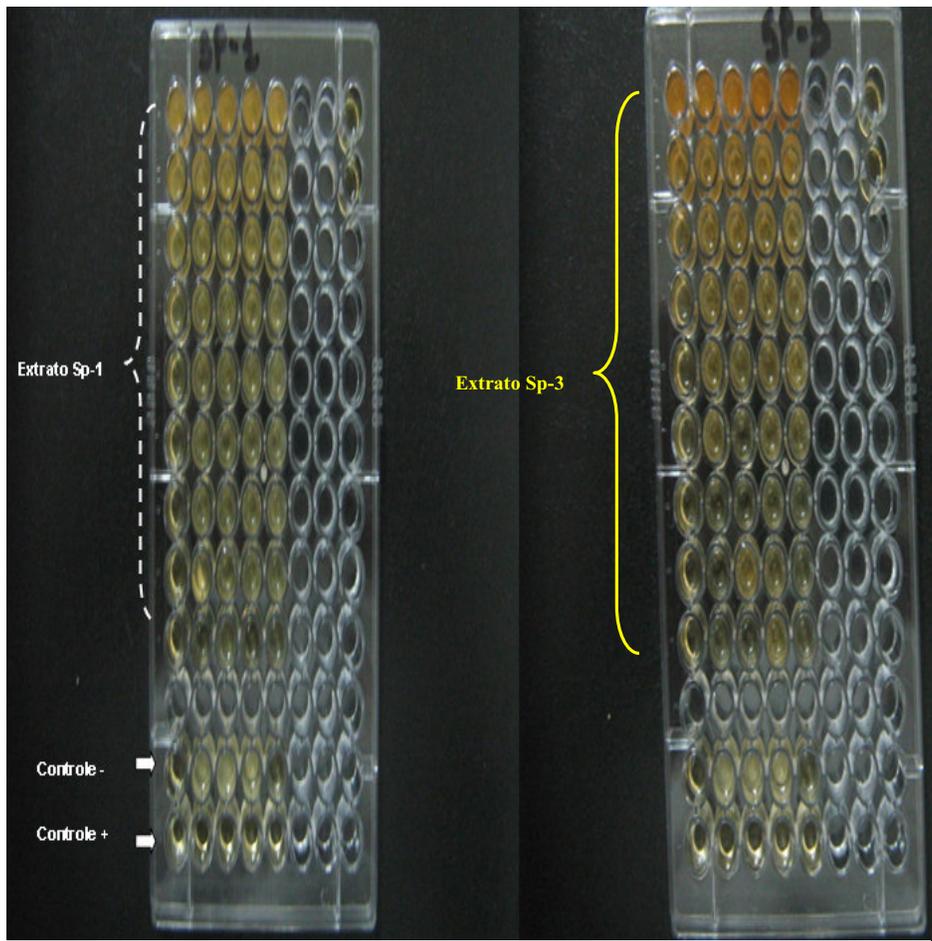
Ensaio de difusão com discos em meio sólido contra fungos filamentosos e leveduras (Bauer, 1966), com os extratos Sp-1 e Sp-3, e a droga controle cetoconazol suficiente no processo fermentativo para a obtenção dos extratos.



Fonte: Oliveira, T. L (2007).

Figura 5. Ensaio antimicrobiano dos extratos Sp-1 e Sp-3. Técnica difusão com discos em meio sólido, frente às espécies: **A** - *C. albicans* ATCC 13803; **B** - *T. inkin*; **C** - *C. krusei* LM 12; **D** - *Aspergillus niger* LM 05; **E** - *C. tropicalis* LM -37; **F**- *A. fumigatus* ATCC 0406; **G** - *C. albicans* ATCC 76485.

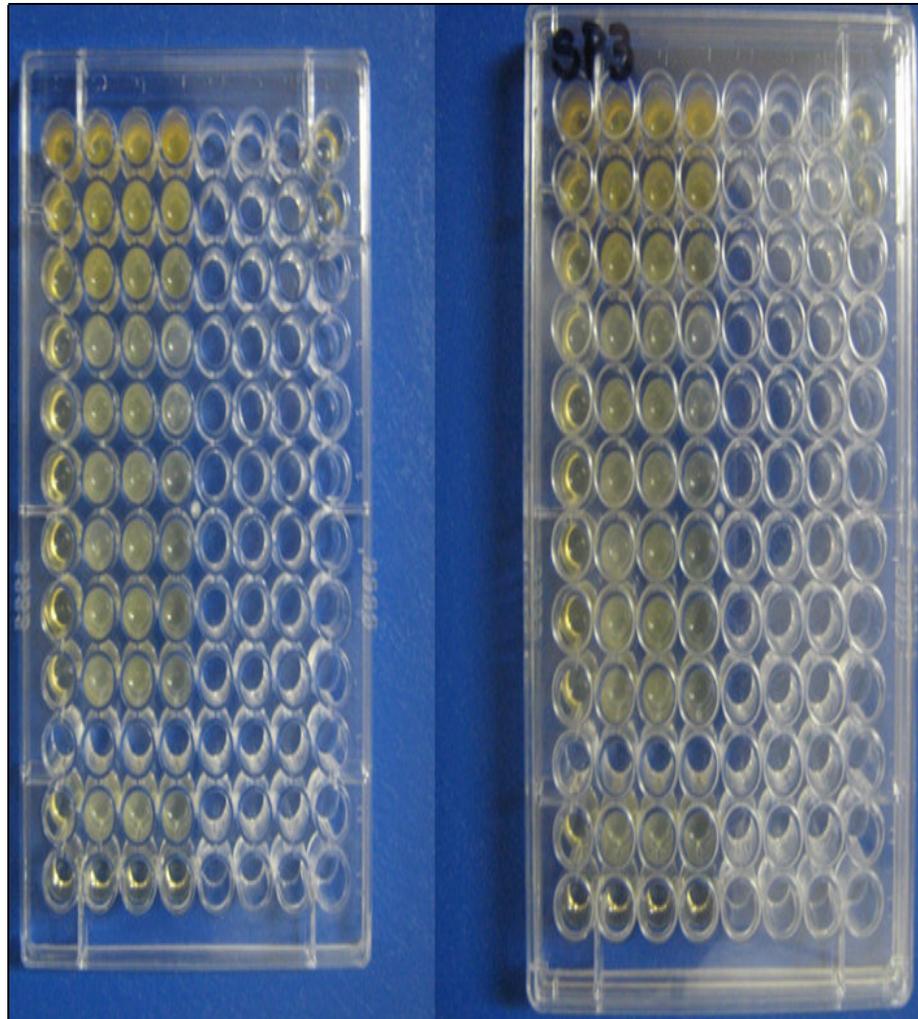
Microdiluição em placas de Elisa, com os extratos Sp-1 e Sp-3, contra fungos filamentosos (Banfi et al., 2003).



Fonte: Oliveira, T. L (2008).

Figura 6. Determinação da CIM dos extratos Sp-1 e Sp-3 por microdiluição em placa Elisa, frente a fungos filamentosos.

Microdiluição em placas de Elisa, com os extratos Sp-1 e Sp-3, contra leveduras (Banfi et al., 2003).



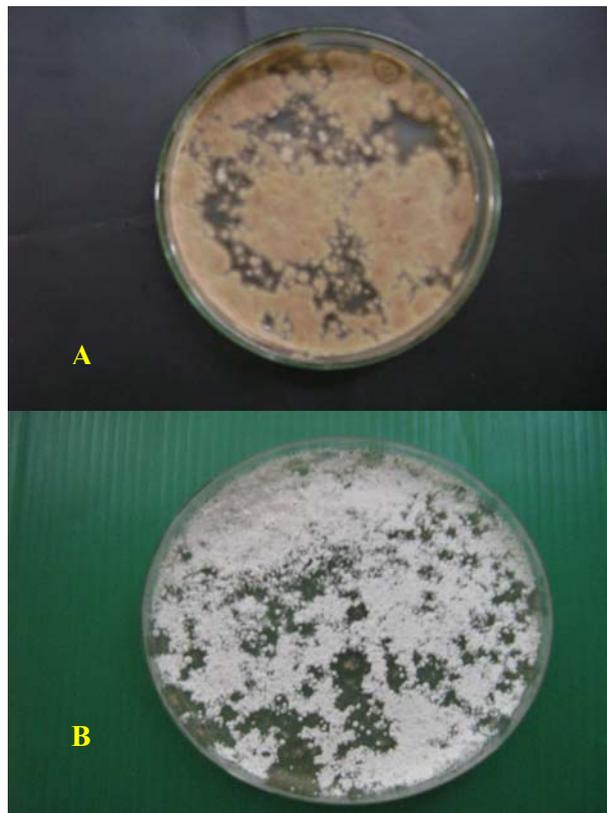
Fonte: Oliveira, T. L (2008).

Figura 7. Determinação da CIM dos extratos Sp-1e Sp-3 por microdiluição em placa Elisa, frente a fungos leveduriformes.



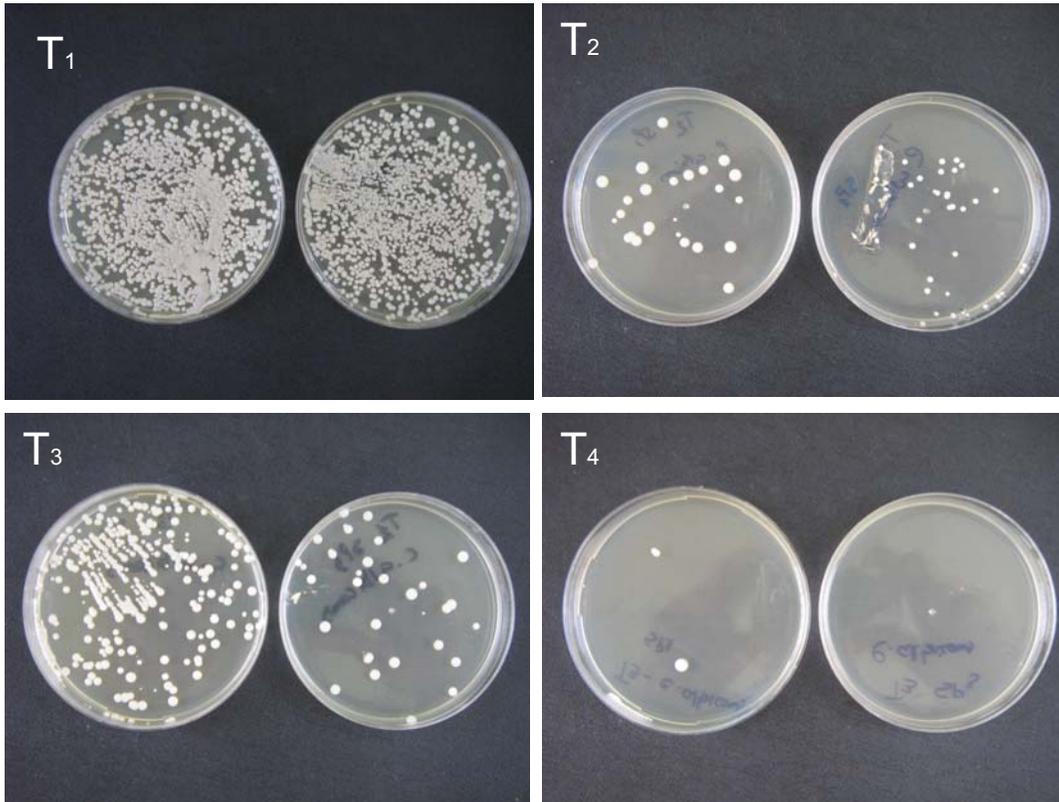
Fonte: Oliveira, T. L (2008).

Figura 8. Cinética de morte microbiana dos extratos Sp-1 e Sp-3 contra cepa de *A. niger* LM 05.



Fonte: Oliveira, T. L (2008).

Figura 9. Placas com meio de cultura Kuster-Williams, **A** - Cepa 12 de *Streptomyces* spp; **B** - Cepa de *Streptomyces* 03.



Fonte: Oliveira, T. L (2008).

Figura 10. Cinética de morte microbiana dos extratos Sp-1 e Sp-3 contra cepa de *C. albicans* LM 05.



Fonte: Oliveira, T. L. (2008).

Figura 11. Manipulação dos modelos de animais na realização do ensaio antitumoral.



Fonte: Oliveira, T. L (2008).

Figura 12. Resultado macroscópico da redução no peso dos tumores após a administração do extrato sp-1 comparando com o grupo controle.

Meios de Cultura

Ágar Caseína Amido (CAA) - (KÜSTER e WILLIANS, 1964).

Amido	10 g
Caseína	0,3 g
Nitrato de potássio	2 g
Cloreto de sódio	2 g
Fosfato hidrogenado dipotássico	2 g
Sulfato de magnésio	0,05 g
Carbonato de cálcio	0,02 g
Sulfato ferroso	0,01 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,2

Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (ISP-2) - (PRIDHAM *et al.*, 1957).

Extrato de levedura	4 g
Extrato de malte	10 g
Glicose	4 g
Amido	5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,2

Ágar Sabouraud dextrose (ASD)

Peptona	10 g
D (+) glicose	40 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 5,6