

**Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Antibióticos
Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos**

**SELEÇÃO DE *STREPTOMYCES* SPP PRODUTORES DE INIBIDORES DE
 β -LACTAMASES**

Patrícia Maria Sobral de Oliveira

Recife-2004

Patrícia Maria Sobral de Oliveira

**SELEÇÃO DE *STREPTOMYCES* SPP PRODUTORES DE
INIBIDORES DE β -LACTAMASES**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia de Produtos
Bioativos para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia

Orientadores: Prof^o Dr^a Janete Magali de Araújo
Prof^a Dr^a Ester Ribeiro Gouveia

Recife-2004

Oliveira, Patrícia Maria Sobral de
Seleção de *Streptomyces spp* produtores de
inibidores de β -lactamases/ RN / Patrícia Maria Sobral
de Oliveira. – Recife : O Autor, 2004.

Vii, 58 folhas : il., tab., fig., gráf., fotos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos
Bioativos, 2004.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Biotecnologia – Produção de antibióticos. 2.
Enzimas (β -lactamases) – Resistência bacteriana. 3.
Inibidores de β -lactamases (Ácido clavulânico) -
Experimento. 4. *Streptomyces clavuligerus* – Meios
de cultura - Fermentação. I. Título.

615.332

CDU (2.ed.)

UFPE

660.62

CDD (20.ed.)

BC2004-135

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *PATRÍCIA MARIA SOBRAL DE OLIVEIRA* AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 10 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. ALDA DE ANDRADE CHIAPPETA
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA
Pesquisadora DCR/CNPq



Dra. ELZA ÁUREA DE LUNA ALVES LIMA
Departamento de Micologia - UFPE

Abandonemos a pressa e olvidemos o desânimo.
Não importa que a nossa conquista surja triunfante hoje ou
amanhã. Vale trabalhar e fazer o melhor que pudermos,
aqui e agora, porque a vida se incumbe de trazer-nos
aquilo que buscamos.

Emmanuel

DEDICATÓRIA

À Deus

Por ter dado-me força nos momentos de fraqueza;
Ânimo nos momentos de tristeza;
Calma nos momentos de desespero;
Por ter estado comigo em todos os momentos da execução deste trabalho.
Eu duvidei de mim, mas o Senhor sempre soube que eu conseguiria.

Obrigada, Pai, pois jamais teria conseguido sem Ti.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, professoras Janete Magali de Araújo e Ester Ribeiro Gouveia, pela paciência e dedicação durante a execução desta dissertação.

A todos os professores do Departamento de Antibióticos pela amizade, conhecimentos passados e ajuda constante. Em especial, aos professores Carlos Edson Lopes, Glícia Calazans, Fátima Queiroz Sousa, Alda Chiappeta e Silene Carneiro Nascimento.

Às estagiárias, Anuska Ferreira e Vanessa Andrade, pelo companheirismo e ajuda indispensável na parte prática deste trabalho.

Aos colegas de turma, em especial à Karen Pena, Elizama Roza, Edélvio Gomes, Renato Oliveira, Andréa Lopes, Daniel Tarciso e João pela amizade, apoio e incentivo durante esta caminhada.

As amigas Andréa Lobato, Geíza Azeredo, Gláucia Lima, Ana Rosa e Bel pelo incentivo.

À Danilo Mamede pela ajuda na parte experimental, incentivo e momentos de descontração.

À Orlando por ter me ajudado na elaboração dos meios de cultura e principalmente pelos conselhos e calma que me transmitia nos momentos de incerteza.

À Suely, secretária do Mestrado de Biotecnologia, pela amizade e colaboração em todos os momentos que precisei.

À minha mãe, que sempre esteve ao meu lado vibrando com as conquistas.

Aos meus avós Lia e Evandro Selva (in memoriam) e a tia e madrinha Deisinha (in memoriam), por terem me apoiado no início dos meus estudos.

Ao Ricardo Lavalle, meu namorado, que mesmo longe esteve presente me ajudando com paciência, dedicação e amor na fase final desta dissertação.

À minha chefe do HC, Izolda Moura, pela compreensão e incentivo e às colegas de trabalho Ileci, Glaudicéa e Verônica que sempre torceram por mim.

Ao Giovane Pereira pela ajuda na execução dos gráficos desta dissertação.

A todas as pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

| | P G |
|---|--------|
| | I |
| | iv |
| | v |
| | vi |
| | vii |
| Lista de Figura | I |
| LISTA DE TABELAS | iv |
| Resumo | v |
| Abstract | vi |
| Objetivos | vii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA | 4 |
| 2.1 <i>Streptomyces</i> | 4 |
| 2.2 Metabólitos secundários | 7 |
| 2.2.1 Antibióticos β -lactâmicos | 10 |
| 2.3 Mecanismos de resistência de bactérias patogênicas | 12 |
| 2.3.1 Inibidores de β -lactamase | 14 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Microrganismos | 18 |
| 3.2 Meios de cultura | 19 |
| 3.2.1 Meios para reativação de esporos | 19 |
| 3.2.2 Meios para avaliação da viabilidade celular | 19 |
| 3.2.3 Meios para produção de esporos | 19 |
| 3.2.4 Meios para produção de inibidores de β -lactamases | 20 |
| 3.2.5 Meio utilizado no teste antimicrobiana | 20 |
| 3.3 Equipamentos | 20 |
| 3.4 Fermentações | 21 |
| 3.5 Seleção de <i>Streptomyces</i> produtores de inibidores de β -lactamase | 21 |
| 3.5.1 Seleção primária pelo método bloco de gelose | 21 |
| 3.1.1.1 Seleção primária pelo método cultivo em meio sólido | 22 |
| 3.5.2 Seleção secundária- Teste de difusão em disco de papel | 22 |
| 3.6 Determinação do ácido clavulânico | 23 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 4.1 Experimentos preliminares | 25 |
| 4.2 Seleção primária de <i>Streptomyces</i> produtores de inibidores de β -lactamases | 26 |
| 4.3 Fermentações para seleção de <i>Streptomyces</i> produtores de ácido clavulânico | 30 |
| 5. CONCLUSÕES | 43 |
| 6. PERSPECTIVAS | 44 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pg |
|--|----|
| Figura 2.1 Ciclo de vida do <i>Streptomyces coelicolor</i> | 5 |
| Figura 2.2 Estrutura química da Cefalosporina e Penicilina | 11 |
| Figura 2.3 Estrutura química da Cefamicina C | 11 |
| Figura 2.4 Estrutura do ácido clavulânico | 16 |
| Figura 3.1 Esquema das fermentações em mesa agitadora com os meios complexos e quimicamente definidos | 21 |
| Figura 3.2 Esquema dos testes de atividade antimicrobiana bloco de gelose e cultivo em meio sólido utilizados na seleção primária, e ensaio secundário com a fermentação | 23 |
| Figura 4.1 Percentual de linhagens contra <i>Klebsiella aerogenes</i> pelo método bloco de gelose em meio CAA | 26 |
| Figura 4.2 Percentual de linhagens ativas contra <i>Klebsiella aerogenes</i> pelo método bloco de gelose em meio ISP-2 | 26 |
| Figura 4.3 Atividade antimicrobiana de diversas linhagens de <i>Streptomyces</i> sp frente a <i>Klebsiella aerogenes</i> , pelo método bloco de gelose em diferentes meios de cultura | 27 |
| Figura 4.4 Atividade antimicrobiana das linhagens selecionadas em meio sólido | 28 |
| Figura 4.5 Halo de inibição de <i>Klebsiella aerogenes</i> pela linhagem de <i>Streptomyces</i> sp DAUFPE 3133 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina | 28 |
| Figura 4.6 Halo de inibição de <i>Klebsiella aerogenes</i> pela linhagem de <i>Streptomyces</i> sp DAUFPE 3098 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina | 29 |
| Figura 4.7 Halo de inibição de <i>Klebsiella aerogenes</i> pela linhagem de <i>Streptomyces</i> sp DAUFPE 3060 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina | 29 |
| Figura 4.8 Halo de inibição de <i>Klebsiella aerogenes</i> pela linhagem de <i>Streptomyces</i> sp DAUFPE 3036 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina | 29 |

- Figura 4.9** Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 96 horas de fermentação em meio CA para as 5 linhagens (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3098, DAUFPE 3094, DAUFPE 3133) 30
- Figura 4.10** Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 96 horas de fermentação em meio MPE para as 5 linhagens (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3098, DAUFPE 3094, DAUFPE 3133) 31
- Figura 4.11** Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* da linhagem DAUFPE 3060 com 48 horas de cultivo em meio MPE 31
- Figura 4.12** Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* da linhagem DAUFPE 3133 com 96 horas de cultivo em meio MPE 32
- Figura 4.13** Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 72 horas de fermentação em meio MPE para as 5 linhagens (DAUFPE 3033, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098, DAUFPE 3036, DAUFPE 3060) 32
- Figura 4.14** Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 72 horas de fermentação em MPE modificado para 4 linhagens (DAUFPE 3133, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098, DAUFPE 3036) 33
- Figura 4.15** Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 72 horas de fermentação em meio com glicerol para as 5 linhagens (DAUFPE 3133, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098, DAUFPE 3036 e DAUFPE 3160) 34
- Figura 4.16** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3036 em meio MPE em diferentes tempos de fermentação 35
- Figura 4.17** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3060 em meio MPE em diferentes tempos de fermentação 35
- Figura 4.18** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3094 em meio MPE em diferentes tempos de fermentação 36
- Figura 4.19** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3098 em meio MPE em diferentes tempos de fermentação 36
- Figura 4.20** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3133 em meio MPE em diferentes tempos de fermentação 37
- Figura 4.21** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3036 em meio MPE modificado em diferentes tempos de fermentação 38
- Figura 4.22** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3094 em meio MPE modificado em diferentes tempos de fermentação 38
- Figura 4.23** Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3098 em meio MPE modificado em diferentes tempos de fermentação 39

| | |
|--|----|
| Figura 4.24 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3133 em meio MPE modificado em diferentes tempos de fermentação | 40 |
| Figura 4.25 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3036 em meio com glicerol em diferentes tempos de fermentação | 40 |
| Figura 4.26 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3060 em meio com glicerol | 41 |
| Figura 4.27 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3094 em meio com glicerol em diferentes tempos de fermentação | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | Pg. |
|--|-----|
| Tabela 2.1 Metabólitos secundários produzidos por Actinomicetos | 9 |
| Tabela 2.2 Bioatividade dos metabólitos de Actinomicetos | 10 |
| Tabela 2.3 Combinações de β -lactâmicos/inibidores de β -lactamase para uso clínico disponíveis comercialmente | 17 |
| Tabela 3.1 Linhagens pertencentes à Coleção de Culturas do DAUFPE utilizadas no presente trabalho | 18 |
| Tabela 4.1 Características macroscópicas das 19 linhagens de <i>Streptomyces</i> em diferentes meios | 25 |
| Tabela 4.2 Análise da produção de ácido clavulânico pelas linhagens que apresentaram atividade antimicrobiana, relacionando meio, pH e tempo de fermentação | 42 |

RESUMO

Com a utilização clínica de agentes antimicrobianos começaram a surgir bactérias resistentes a diversos antibióticos, entre os quais, se destacam os β -lactâmicos. A hidrólise do anel β -lactâmico pelas enzimas β -lactamases é o mecanismo de resistência bacteriana mais bem documentado. A obtenção de *Streptomyces* produtores de inibidores de tais enzimas constitui uma importante estratégia para contornar o problema da resistência bacteriana, garantindo a continuidade da terapia antimicrobiana com os β -lactâmicos. Com este objetivo, 19 linhagens de *Streptomyces* spp, pertencentes a Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE), isoladas de solos e preservadas em óleo mineral foram testadas quanto a capacidade de inibir a ação de β -lactamases produzidas por *Klebsiella aerogenes* ATCC 15380. As 19 linhagens foram purificadas utilizando-se os meios ISP-1 e TSB e submetidas à seleção primária pelos métodos de difusão em ágar, utilizando bloco de gelose e cultivo em meio sólido nos meios CAA e ISP-2. No meio CAA, 15% das linhagens formaram halo de inibição, com 10 a 12 mm de diâmetro e 10% formaram halos maiores que 20 mm de diâmetro. No meio ISP-2, 5% das linhagens formaram halo de 12 mm de diâmetro e 11% halos de 17 mm de diâmetro. A partir destes ensaios, cinco linhagens (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3094 DAUFPE 3098 e DAUFPE 3133) que formaram os maiores halos de inibição, foram selecionadas para ensaio em meio líquido usando meios de cultura sintéticos ou quimicamente definidos e complexos. As fermentações foram realizadas a 30°C e 200rpm durante 96 horas. As amostras retiradas em intervalo de tempo pré-definido foram submetidas à centrifugação a 11000 rpm por 5 minutos, para a separação do líquido metabólico, o qual foi submetido a determinação de pH, atividade antimicrobiana e ácido clavulânico, sendo este um potente inibidor de β -lactamases. Observou-se que o melhor meio para produção de inibidor de β -lactamase foi o MPE modificado, em que todas as linhagens apresentaram atividade antimicrobiana contra *Klebsiella aerogenes* ATCC 15380. Com relação à produção de ácido clavulânico, três linhagens (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060 e DAUFPE 3094) apresentaram resultado positivo em dois meios de cultura (MPE modificado e meio com glicerol), enquanto que as duas linhagens restantes (DAUFPE 3098 e DAUFPE 3133) produziram outros inibidores.

ABSTRACT

Resistant bacteria for diverse antibiotics had appeared after the use of clinical antimicrobial agents. The β -lactâmicos have detached among them. The most registered bacterial resistance mechanism is the hydrolysis of β -lactâmico ring for β -lactamases enzymes. The obtainment of *Streptomyces* inhibitors of such enzymes constitutes an important strategy to the bacterial resistance problem and, thus, guarantee the continuity of the antimicrobial therapy with the β -lactâmicos. With this objective, 19 lineages of *Streptomyces* spp - belonging to the Collection of Microrganismos of the Antibiotic Department of UFPE (DAUFPE) - isolated of ground and preserved in mineral oil, had been tested to detect the capacity to inhibit the β -lactamases' action produced by *Klebsiella aerogenes* ATCC 15380. The 19 lineages were purified using the environments ISP-1 and TSB, and submitted to primary selection for the methods of diffusion in agar, using gelose's block and culture in environment solid CAA and ISP-2. In CAA, 15% of the lineages had formed inhibition halo, with a diameter of 10-12 mm and 10% of them had formed bigger halos than 20 mm. In ISP-2, 5% of lineages had developed a halo with 12 mm whereas the halo of other 11% presented a diameter of 17 mm. With these results (essays), five lineages (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098 and DAUFPE 3133), which formed the biggest inhibition halos, were selected for experiment (essay) in liquid environment using synthetic and complex cultures. The fermentations had been carried out during 96 hours using 30°C and 200 rpm. The samples were removed in predefined time intervals and then submitted to centrifugation with 11000 rpm per 5 minutes for separation of the metabolic liquid - submitted to pH determination - antimicrobial activity and acid clavulânico, being the latter one a powerful inhibitor of β -lactamases. It was observed that the best environment for production of β -lactamase inhibitor was the modified MPE, where all the lineages had presented antimicrobial activity against *Klebsiella b aerogenes* 15380. Concerning the production of acid clavulânico, three lineages (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060 and DAUFPE 3094) had presented positive outcome in two cultures' environment (MPE modified and half with glicerol), while the two remaining lineages (DAUFPE 3098 and DAUFPE 3133) formed other inhibitors.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Testar linhagens de *Streptomyces* da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE) quanto à produção de inibidores β -lactamases.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaio primário com diferentes linhagens de *Streptomyces* para verificar a produção de inibidores de β -lactamase frente a *Klebsiella aerogenes*;
- Analisar a influência dos meios de cultura sobre a produção dos inibidores;
- Determinar a presença de ácido clavulânico durante as fermentações com linhagens de *Streptomyces* selecionadas inicialmente.

1. INTRODUÇÃO

Waksman (1945), apresentou a primeira definição de antibióticos como “substâncias químicas produzidas por microrganismos, possuidoras de capacidade de matar ou inibir o crescimento de bactérias e outros organismos”. Na pesquisa de um novo antibiótico, tornou-se evidente que, embora os microrganismos sejam os principais produtores desses compostos, outros organismos, tais como: algas, líquens, plantas e mesmo células animais produzem antibióticos.

Dentre os antibióticos naturais conhecidos, mais de 60% são produzidos pelos Actinomicetos (Actinomycetales); 10-11% por fungos imperfeitos (Aspergillales) e bactérias do gênero *Bacillus* (Bacillaceae); cerca de 6% são sintetizados por Basidiomycetes e Ascomycetes; menos de 1% são obtidos de líquens e cerca de 14%; de vegetais superiores; somente 2% são de origem animal.

A resistência bacteriana aos antibióticos foi encontrada em isolados clínicos logo após a introdução desses agentes. O problema da resistência persiste até os dias atuais e continua sendo o fator de maior complicação no uso de agentes quimioterápicos e no controle de doenças infecciosas que surgem por mutação genética espontânea ou induzida. Acredita-se que a mutação espontânea contribui para o aumento da resistência a antibióticos. A maioria das mutações são induzidas, e ocorrem quando linhagens resistentes emergem de uma população bacteriana previamente suscetível à exposição a um antibiótico. Plasmídios, transposons ou mutações cromossômicas podem ser responsáveis por essas mutações (RUSSEL ; CHOPRA, 1990).

A hidrólise do anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas pelas β -lactamases é o mecanismo de resistência bacteriana mais documentado. As β -lactamases são relacionadas, em termos evolutivos, as transpeptidases. Tanto organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos são capazes de produzir essas enzimas, havendo variação na especificidade de seu substrato (penicilinas e/ou cefalosporinas), nas características moleculares e na sensibilidade a inibidores (clavulanato, sulbactam) sejam elas codificadas por genes cromossômicos ou plasmidiais, e seja qual for o organismo em que apareçam (HAKIMELAHI *et al*, 2002).

A despeito dos problemas clínicos, com o aumento da resistência bacteriana, os antibióticos β -lactâmicos continuam sendo importantes e efetivos na terapia antimicrobiana em muitas situações, levando a indústria farmacêutica a desenvolver estratégias para conter a expansão das β -lactamases e garantir a continuidade da terapia antimicrobiana dos β -lactâmicos com melhores resultados. A primeira estratégia adotada foi alterar a estrutura do β -lactâmico, tornando-o insensível à hidrólise pelas β -lactamases, embora mantendo seu potencial como antibiótico. Porém, foi verificado que moléculas mais resistentes às β -lactamases também foram menos eficazes como antibióticos. A segunda estratégia inclui compostos que não têm atividade antimicrobiana, mas que potencializam a ação dos antibióticos β -lactâmicos por sensibilizarem a resistência bacteriana. O primeiro exemplo de tais compostos foi o ácido clavulânico, que fez com que as bactérias ampicilina-resistentes se tornassem suscetíveis por impedirem as β -lactamases de destruir o antibiótico. “Augmentin ou Clavulin” é uma combinação de amoxicilina e ácido clavulânico usada clinicamente. A descoberta do clavulanato levou a um poderoso aumento nas propriedades inibitórias das β -lactamases (HAKIMELAHY *et al*, 2002).

Em 1971, Higgins e Kastiner isolaram o ácido clavulânico de *Streptomyces clavuligerus*, de amostras de solo da América do Sul. Desde então, alguns relatos têm sido feitos quanto à produção por outros organismos, tais como *Streptomyces jumanjinensis*, *S. katsurahamanus* e *Streptomyces* spp P6621, espécies produtoras de ácido clavulânico relatadas e patenteadas por indústrias japonesas (PORTO, 1984).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Streptomyces*

Investigações realizadas por Chater (1984), nos anos 50, através de estudos citológicos, bioquímicos e genéticos, revelaram que os actinomicetos apresentam sensibilidade a antibióticos antibacterianos, parede celular igual a das bactérias Gram-positivas, são aeróbios obrigatórios, conhecidos como sapróbios.

Os actinomicetos podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro grupo é do tipo fermentativo com paredes celulares que não contêm ácido diaminopimélico e está frequentemente associado ao homem e aos animais. O segundo grupo corresponde ao tipo oxidativo que contém ácido diaminopimélico no peptidoglicano e são geralmente encontrados no solo. Neste segundo grupo são encontrados os esporaactinomicetos, destacando-se o gênero *Streptomyces* como responsável pela síntese de 99% dos antibióticos produzidos por microrganismos desta família (LECHEVALIER, 1981).

Mishra *et al* (1980), relataram que alguns gêneros de actinomicetos são clinicamente importantes como *Norcadia* e *Actinomyces*. Várias doenças, como as infecções pulmonar e cerebral (sistema nervoso central) além de lesões cutâneas e subcutâneas, conhecidas por norcadiose, são causadas por algumas espécies de *Norcadia* (BEAMAN, 2000). Por outro lado, *Actinomyces* são comumente encontrados como formadores de biofilme na cavidade oral, considerados patógenos oportunistas e estão implicados em gengivites, periodontites e cárie dentária (YEUNG, 2000).

Algumas espécies de *Streptomyces* como *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. caviscabies* e *S. turgidis* se destacam como fitopatógenos, que causam escabiose ou sarna da batata (*Solanum tuberosum*). Esta doença é caracterizada pela formação de lesões enegrecidas na superfície do tubérculo (HAYASHIDA *et al*, 1989).

Os *Streptomyces* são largamente distribuídos na natureza, têm o solo como nicho primário (próximo à superfície), com ocorrência que varia de 10^4 a 10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias/mL), geralmente sobre a forma de esporos. Também podem ser encontrados em ambientes aquáticos (águas marinhas e fluviais), em áreas pantanosas, em forragens e no ar (LOYD, 1969; CROSS, 1981).

São aeróbios estritos e podem crescer em pH ácido ou na faixa da neutralidade. A maioria deles são mesofílicos (22°C a 37°C), porém algumas espécies são termofílicas (TOMMICH, 1988).

O crescimento dos *Streptomyces*, quando estes se encontram em meio favorável, se inicia pela formação de um tubo germinativo que se ramifica formando o micélio vegetativo cenocítico ramificado (fase nutritiva), seguido pela formação do micélio aéreo multicelular (fase reprodutiva) dentro do qual algumas hifas sofrem metamorfose originando a cadeia de esporos uninucleares (CHATER *et al*, 1982; HOPWOOD, 1989; CHATER *et al*, 1991; SHINICH *et al*, 1997). A esporulação (Figura 2.1) começa com a formação simultânea de septos na hifa aérea, em intervalos regulares de 1µm, e termina com a liberação de esporos fechando assim um ciclo (LANCINI; LORENZETTI, 1993).

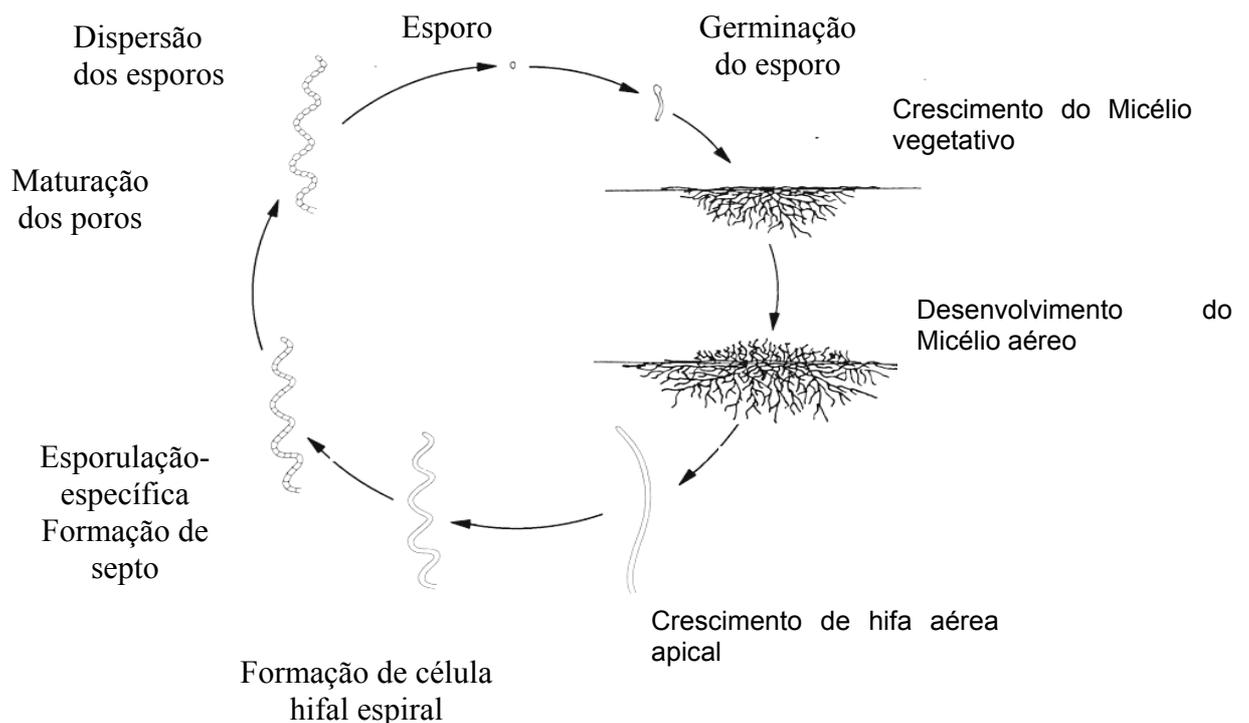


Figura 2.1 Ciclo de vida do *Streptomyces coelicolor* (CHATER; MERRICK, 1979)

Como observado na literatura, colônias de *Streptomyces* em meio sólido são altamente diferenciadas, com micélio cenocítico e hifas compartimentadas contendo

inúmeras cópias do cromossomo. Por outro lado, os esporos contêm uma única cópia cromossomal linear (DARY *et al*, 1999).

Em decorrência de *Streptomyces* ser o principal produtor de antibióticos, até meados da década de 60 existiam mais de 3.000 espécies descritas. Visando homogeneizar a descrição de espécies, foi desenvolvido em 1966 o “International *Streptomyces* Project” (ISP), cujo objetivo era padronizar a descrição de 450 espécies deste gênero, adotando os seguintes critérios de identificação: morfologia da cadeia de esporos (*Rectiflexibiles*, *Retinaculiaperti* e *Spirales*); cor dos micélios aéreo e vegetativo, produção de pigmentos melanóides; utilização ou não de fontes de carbono; microscopia eletrônica; micromorfologia; metabólitos secundários e homologia do DNA (SHIRLING; GOTTLIEB, 1977).

Atualmente, a quimiotaxonomia, a taxonomia numérica e a molecular se unem para a determinação de espécies de *Streptomyces* (WILLIAMS *et al*, 1997).

O rápido desenvolvimento da biologia molecular mostra que os actinomicetos pertencem, atualmente, a um novo phylum Actinobacteria e não mais ao phylum Firmicute como proposto pelo Bergey’s Manual (1989). Stackebrandt *et al* (1997) propuseram elevar a classe Actinobactéria ao nível de phylum indicando que este grupo é muito diferente do Firmicutes, que compreende as bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo de Guanina mais Citosina (G+C).

Segundo Bergey’s Manual (2001), o gênero *Streptomyces* pertence a família Streptomycetaceae que compreende os gêneros *Streptomyces*, *Kitasatospora* e *Streptoverticillium*.

Investigações realizadas por Lin *et al*, (1993), mostraram que *Streptomyces* possui cromossomo linear de 8Mb, com estrutura similar a telômeros, caracterizados pela presença de terminais invertidos repetidos (TIR) ligados a proteínas. O genoma de *Streptomyces* é geneticamente instável, ocorrendo grandes deleções e muitos dos genes deletados estão associados ao metabolismo secundário. Segundo Leblond e Decaris (1999), cerca de 25% do genoma pode ser deletado sem afetar a sobrevivência da linhagem em condições de laboratório. As vezes as deleções estão associadas a amplificação e todos os rearranjos estão localizados no final linear do DNA cromossomal. Esta plasticidade genômica possivelmente é responsável pela grande diversidade observada entre as espécies de *Streptomyces* como enfatiza Dary *et al* (1999).

Segundo Neves (1999), a remoção de seqüências terminais nos telômeros conduz à circulação da molécula, e, somente na década de 90 foi possível determinar que o DNA cromossomal de *Streptomyces* é linear e não circular como a maioria das bactérias, contendo uma única cópia

2.2 Metabólitos Secundários

O metabolismo primário envolve uma série de reações enzimáticas interconectadas que fornecem intermediários biossintéticos e energia, além de converter precursores biossintéticos em macromoléculas essenciais, tais como : ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e polissacarídeos. O metabolismo primário é essencialmente idêntico para todas as formas vivas. As reações metabólicas deste tipo de metabolismo são rigorosamente balanceadas, e os metabólitos intermediários por serem necessários à sobrevivência celular, raramente se acumulam (MARTIN; DEMAIN, 1980).

O metabolismo secundário não é essencial para o crescimento do organismo produtor, como enfatizado por vários autores. Um metabolismo secundário não é “secundário” por ser produzido após o crescimento e sim porque não está envolvido no crescimento do microrganismo produtor (DEMAIN, 1999).

A expressão “metabolismo secundário” foi introduzida por Bu’Lock em 1960 para indicar metabólitos microbianos que não eram essenciais para o metabolismo celular, e eram encontrados como produtos da diferenciação celular em um grupo taxonômico restrito. Este termo foi usado por fisiologistas de plantas para indicar alcalóides de plantas (LANCINI *et al*; 1995).

Durante a fase de produção (idiofase) que ocorre após a fase de crescimento (trofofase) os metabólitos secundários se acumulam no meio fermentativo e por isto são conhecidos também como idiólitos. Entretanto, em decorrência da baixa especificidade de algumas enzimas do metabolismo secundário, os idiólitos são produzidos como componentes de famílias químicas específicas com uma grande diversidade de estruturas. Estas estruturas químicas são pouco comuns e incluem anéis β -lactâmicos, peptídeos cíclicos contendo

aminoácidos não naturais, novos açúcares e nucleosídeos raros, polienos e grandes anéis macrolídeos (DEMAIN, 1999).

A função ou a relevância do antibiótico para o organismo produtor é muito discutida e várias hipóteses são sugeridas para correlacionar sua função no desenvolvimento do microrganismo produtor. Vining (1992) enfatiza que os metabólitos secundários são benéficos para o microrganismo produtor, uma vez que pode melhorar o seu crescimento, reprodução e sua dispersão em condições apropriadas, ou ainda pode proporcionar proteção contra os competidores e predadores, sendo importantes para a sobrevivência do microrganismo na natureza.

Demain (1989) relata que o processo de desenvolvimento do microrganismo envolve dois fenômenos, o crescimento e a diferenciação, destacando-se a diferenciação como morfológica (morfogênese) e química (metabolismo secundário).

Em geral, os microrganismos produtores de antibióticos formam esporos e aqueles não formadores de esporos, mas que ocorrem em sua maioria no solo, também podem produzir antibióticos. Vining (1992) relatou que as bactérias *Chromobacterium*, *Gluconobacter* e *Acetobacter*, isoladas do solo, não produzem esporos, mas produzem antibióticos β -lactâmicos. Segundo Lancini e Lorenzetti (1993), mais de 6.000 antibióticos são produzidos por actinomicetos e destes, 75% são produzidos pelo gênero *Streptomyces*.

Os metabólitos secundários são produzidos por diversos grupos microbianos sendo fungos filamentosos, *Actinobacteria* e *Bacillus*, os principais produtores. Sanglier *et al* (1993), relataram que, de 1988 a 1992 centenas de componentes bioativos foram produzidos por Actinobacteria, sendo que a maioria dos metabólitos foram isolados do gênero *Streptomyces*, revelando também que estas substâncias exibem maior diversidade química (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Metabólitos secundários produzidos por Actinomicetos (SANGLIER *et al*, 1993)

| Metabólito | GÊNEROS | | | | | |
|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------|
| | <i>Streptomyces</i> | <i>Actinoplanetes</i> | <i>Maduromycetes</i> | <i>Thermoplasma</i> (*) | <i>Norcadiformes</i> | Outros gêneros |
| Açúcar | 40 | 14 | 11 | 0 | 23 | 1 |
| Lactona macrocíclica | 191 | 54 | 16 | 2 | 19 | 6 |
| Quinonas | 95 | 48 | 20 | 0 | 3 | 2 |
| Peptídeo | 123 | 2 | 18 | 1 | 2 | 8 |

| Metabólito | GÊNEROS | | | | | |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------|
| | <i>Streptomyces</i> | <i>Actinoplanetes</i> | <i>Maduromycetes</i> | <i>Thermomonospora</i> (*) | <i>Norcadiformes</i> | Outros gêneros |
| Sistema heterocíclico | 144 | 3 | 24 | 0 | 2 | 34 |
| Esqueleto alicíclico | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Esqueleto aromático | 30 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Cadeia alifática | 74 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 |
| Outros | 56 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 |
| Total | 755 | 124 | 97 | 4 | 53 | 51 |

(*) e gêneros relacionados

Para a triagem de compostos bioativos, vários laboratórios utilizam apenas ensaios antimicrobianos e antitumorais, indicando serem estes mais comuns e essenciais para a obtenção de novos antibióticos como enfatiza Sanglier *et al* (1993), Tabela 2.2. Estes ensaios para actinomicetos “raros” como *Actinoplanetes*, *Maduromycetes* e *Thermomonospora*, permitem o descobrimento de novos antibióticos como salientado por Okami e Hota (1988).

Tabela 2.2 Bioatividade dos metabólitos de Actinomicetos (SANGLIER *et al*, 1993)

| Atividade | <i>Streptomyces</i> | <i>Actinoplanetes</i> | <i>Maduromycetes</i> | <i>Thermomonospora</i> (*) | <i>Norcadiformes</i> | Outros gêneros |
|------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------|
| Anti-Gram ⁺ | 230 | 58 | 31 | 3 | 45 | 14 |
| Anti-Gram ⁻ | 108 | 26 | 8 | 1 | 7 | 8 |
| Antifúngico | 98 | 8 | 24 | 1 | 4 | 19 |
| Anti-levedura | 61 | 6 | 17 | 1 | 4 | 19 |

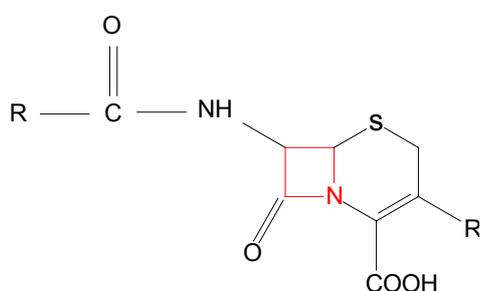
| | | | | | | |
|--------------------------------------|-----|----|----|---|----|---|
| Anti-protozoários, helmintos, et. | 61 | — | 6 | 1 | — | 3 |
| Herbicida | 24 | — | — | — | — | — |
| Inseticida | 23 | — | — | — | 9 | — |
| Antiviral | 16 | 3 | 1 | 1 | 18 | 4 |
| Anti-tumoral | 179 | 25 | 10 | 2 | — | 6 |
| Inibidor enzimático | 76 | 1 | 11 | 4 | — | — |
| Agente farmacológico | 56 | 1 | 2 | 1 | 1 | — |
| Outros | 4 | — | — | — | — | — |

(*) e gêneros relacionados

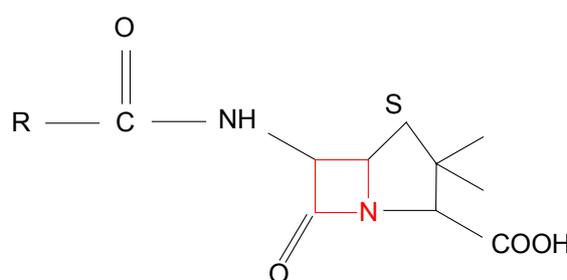
Segundo Okami e Hota (1988), até 1974 os antibióticos originados de actinomicetos eram exclusivamente produzidos por *Streptomyces* e o “Journal of Antibiotics” de 1976 a 1986 mostrou que *Streptomyces* é o único gênero microbiano que produz todos os grupos de antibióticos: aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamacrolídeos, β -lactâmicos, peptídeos, glicopeptídeos, antraciclinas, tetraciclinas, nucleosídeos, polienos e quinonas.

2.2.1 Antibióticos β -lactâmicos

Entre os diversos tipos de antibióticos, os β -lactâmicos constituem a família mais importante de agentes antimicrobianos. Os principais grupos desta família são as Penicilinas onde o anel β -lactâmico está ligado a um anel tiazolidínico e as Cefalosporinas, fusionadas ao anel dihidrotiazina. Ambas as estruturas contêm enxofre no segundo anel, que é derivado da cisteína (MILLER; INGOLIA, 1989) (Figura 2.2).



CEFALOSPORINAS



PENICILINAS

Figura 2.2 Estrutura química dos antibióticos cefalosporina e penicilina

Estes compostos são produzidos principalmente por fungos filamentosos. As principais Penicilinas como Penicilina G (Benzilpenicilina) e Penicilina V, são produzidas por *Penicillium chrysogenum* e a Cefalosporina por *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*) (MILLER; INGOLIA, 1989).

A descoberta de que procariontes também produzem β -lactâmicos foi relatada a partir de 1971 por Nagarajan *et al* (1971). Foi isolada de *Streptomyces lipmanii*, a Cefamicina, que estruturalmente é uma Cefalosporina com um grupo metóxi na posição 7 α . Subseqüentemente, foi isolado de *S. clavuligerus* uma metoxicefalosporina denominada de Cefamicina (Figura 2.3), resistente à β -lactamases de bactérias Gram-negativas.

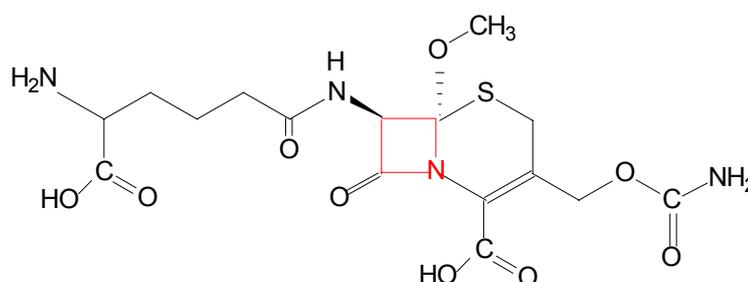


Figura 2.3 Estrutura química da Cefamicina C

Outros β -lactâmicos produzidos por *Streptomyces* foram descobertos salientando-se Carbapenem (Tienamicina) e Carpentimicina, produzidos respectivamente por *S. cattleia* e *S. lipmanni*. Estes antibióticos possuem um átomo de carbono em vez de enxofre e uma dupla ligação no anel pirrolínico com uma curta cadeia alifática (AOKI *et al*, 1992; GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Intensas investigações levaram à descoberta de novos β -lactâmicos por bactérias Gram-negativas cujo habitat é o solo. Estes estudos revelaram uma nova classe de antibióticos β -lactâmicos, caracterizados pela presença de um anel β -lactâmico não condensado a outro anel, sendo denominado Monobactâmicos (LANCINI *et al*, 1995).

Os monobactâmicos são produzidos por *Gluconobacter*, *Acetobacter* e *Agrobacterium*, pertencentes ao grupo das bactérias púrpuras, além de algumas espécies de *Pseudomonas* não fluorescentes (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

2.3 Mecanismos de resistência de bactérias patogênicas

Inúmeras investigações do mecanismo molecular e epidemiologia de bactérias resistentes têm revelado a extraordinária versatilidade das bactérias patogênicas humanas em se adaptar e sobreviver em ambientes ricos com agentes antimicrobianos como relatado por Demain *et al* (1999).

O problema da resistência aos antibióticos é complexo e envolve interações de múltiplos fatores relacionados ao organismo particular, a droga usada, bem como ao ambiente (MONROE; POLK, 2000).

Segundo Sutcliffe (1999), para a bactéria sobreviver em ambientes com antibióticos, a célula bacteriana precisa desenvolver mecanismos que superem ou inativem a atividade do antibiótico. Portanto, para inibir ou destruir a ação bactericida ou bacteriostática de um agente antibacteriano, as bactérias desenvolvem três mecanismos:

- Modificação do sítio alvo do antibiótico;
- Inativação ou modificação do antibiótico;
- Alteração da permeabilidade celular interferindo no efluxo da droga.

Por conseguinte, o nível de resistência bacteriana a um antibiótico, pode ser determinado pelo efeito cumulativo da ação de mais de um destes mecanismos de resistência (SUTCLIFFE *et al*, 1999).

Vários fatores contribuem para a resistência bacteriana. Entre estes o próprio antibiótico, influencia na transformação da população bacteriana sensível em resistente.

A mutação espontânea ocorre numa frequência de 10^{-7} a 10^{-11} numa população bacteriana sensível ao antibiótico. Quando a população está crescendo em presença do antibiótico, as bactérias sensíveis são inibidas e as resistentes continuam a se multiplicar, gerando uma população bacteriana resistente denominada “seleção de mutantes resistentes”. Logo, o espalhamento da população resistente a antibióticos decorre do efeito combinado da mutação e seleção (LANCINI *et al*, 1995).

Teoricamente, qualquer antibiótico pode selecionar linhagens bacterianas resistentes já que o local de concentração da droga excede a concentração mínima inibitória (CMI) para a população bacteriana suscetível, mas é baixa para o clone resistente. A ocorrência de grandes distúrbios depende do espectro do agente, dose, rota de administração, farmacocinética, propriedades farmacodinâmicas, e inativação do agente *in vivo*. A absorção incompleta da droga administrada oralmente influencia a microflora intestinal, e a secreção do agente antimicrobiano pelo intestino ou mucosa vaginal, bile, glândulas salivares, sudoríparas, endócrinas e apócrinas, podem interferir com a flora normal em diferentes habitats. Como consequência, microrganismos resistentes podem aumentar em número, e também servir como reserva de genes (CIZMAN, 2003).

Além deste processo, a principal causa da resistência bacteriana é a transferência de resistência por meio de plasmídios entre as bactérias patogênicas, originando resistência plasmidial e cromossomal. Relatos epidemiológicos mostram que os plasmídios R são os principais fatores de resistência múltipla extra-cromossomal. O processo de transferência desta resistência acontece por recombinação homóloga (FOSTER, 1995). Entretanto, são os transposons, conhecidos como elementos genéticos transponíveis ou “puladores”, os principais responsáveis pela mobilidade dos genes de resistência.

Em decorrência destes elementos genéticos apresentarem habilidade para transposição e inserção, são os principais responsáveis pela reorganização da informação genética e consequentemente mobilidade de genes de resistência entre as bactérias patogênicas (LANCINI *et al*, 1995).

2.3.1 Inibidores de β -lactamases

As β -lactamases são enzimas que hidrolisam a amida cíclica da molécula β -lactâmica. São extremamente heterogêneas tanto na estrutura como na especificidade do substrato e são amplamente relatadas entre as Enterobacteriaceae (WILLIAMS, 1999).

Embora todas as β -lactamases catalisem a mesma reação, diferentes enzimas foram isoladas e caracterizadas. De acordo com Bush *et al* (1995) as β -lactamases podem ser classificadas em grupos de acordo com o substrato e a

sensibilidade ao inibidor. Nos grupos 1 e 2 estão incluídas as β -lactamases de amplo espectro, codificadas respectivamente por genes cromossomais e plasmidiais. As enzimas do grupo 3 são chamadas de metalo- β -lactamases, pois possuem um íon metálico (geralmente zinco) no seu sítio catalítico, em contraste com as enzimas dos grupos 1,2 e 4 que têm um resíduo de serina no sítio ativo.

Atualmente, as enzimas β -lactamases são agrupadas em quatro classes baseadas em sua seqüência homóloga de aminoácidos. A catálise pelas classes A, C e D é realizada por um intermediário acil ligado a serina, enquanto que as enzimas da classe B requerem zinco para a atividade (MAJIDUDDIN *et al.*, 2002). As enzimas da classe A são as mais freqüentemente encontradas (PAYNE *et al.*, 2000).

Estas enzimas ocorrem em um número de bactérias clinicamente importantes, incluindo *Bacterioides* spp, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp e *Xanthomonas* spp. (COLEMAN *et al.*, 1994).

A identificação de mais de 340 diferentes enzimas β -lactamases representa um grande desafio no tratamento de infecções bacterianas (LEE *et al.*, 2003).

Para combater a produção de β -lactamases foram desenvolvidas estratégias para superar a resistência aos antibióticos β -lactâmicos. A primeira estratégia foi a modificação da estrutura química do antibiótico e a segunda a descoberta de compostos que inibem as β -lactamases. Os compostos inibidores de β -lactamases são estruturalmente relacionados às penicilinas, conservando a ligação amida do anel β -lactâmico, mas contendo uma cadeia lateral modificada (WILLIAMS *et al.*, 1999).

Os inibidores de β -lactamases podem ser classificados como reversíveis e irreversíveis. Os inibidores reversíveis tais como cloxacilina, retardam a hidrólise do β -lactâmico associado a ela e a enzima ativa é rapidamente regenerada do complexo enzima-inibidor. Inibidores irreversíveis são mais efetivos desde que sejam hábeis para inativar a enzima por períodos extensos. O primeiro inibidor suicida foi o ácido olivânico, isolado de *Streptomyces olivaceus*. Muitos derivados do ácido olivânico foram potentes agentes antibacterianos e inibidores suicidas, mas eram rapidamente metabolizados no sangue e nunca foram desenvolvidos para uso clínico (COLEMAN *et al.*, 1994). Outros inibidores suicidas tais como as penicilinas sulfonas (sulbactâmico, tazobactâmico e seus derivados) e o ácido clavulânico, produzido por *Streptomyces clavuligerus*, são de uso clínico (MILER *et*

al., 2001). O ácido clavulânico e o tazobactâmico são potentes inibidores das enzimas das classes A e B (BEHARRY *et al.*, 2004).

O ácido sulbactâmico é menos potente que o clavulânico. Este composto possui uma atividade um pouco maior para as β -lactamases do grupo 1, porém isso não é relevante, sendo um inibidor particularmente fraco para as enzimas TEM comuns. É usado em combinação com ampicilina via parenteral e via oral, como uma pró-droga. O tazobactâmico tem atividade inibitória igual ao ácido clavulânico contra as β -lactamases do grupo 2, mas superior contra as enzimas do grupo 1. Contudo, a atividade observada para o grupo 1 é insuficiente para proteger os β -lactâmicos contra as β -lactamases produzidas pelos organismos. O tazobactâmico é utilizado em uma formulação parenteral em combinação com a piperacilina (COLEMAN *et al.*, 1994).

Segundo Lancini *et al.* (1995) meticilina e outras penicilinas resistentes a β -lactamases de *Staphylococcus* atuam também como inibidores de β -lactamase e na teoria poderiam ser usadas em combinação com as cefalosporinas que são inativadas por esta enzima, aumentando seu espectro de ação. Entretanto, não ocorre boa penetração destes compostos na célula bacteriana.

O mais efetivo dos inibidores suicidas é o ácido clavulânico que foi isolado de *Streptomyces clavuligerus*, de ampla utilidade clínica (HUNTER e WEBB., 1980; REDADING; FARMER, 1981). Ele foi isolado pelos pesquisadores da Beecham Pharmaceutical Division, quando estes procuravam compostos que protegessem a benzilpenicilina contra bactérias produtoras de β -lactamases. Sua estrutura β -lactâmica (Figura 2.4) é fusionada ao anel oxazolidino e difere da penicilina e cefalosporina, por apresentar um átomo de oxigênio em lugar do enxofre (HOWARTH *et al.*, 1976).

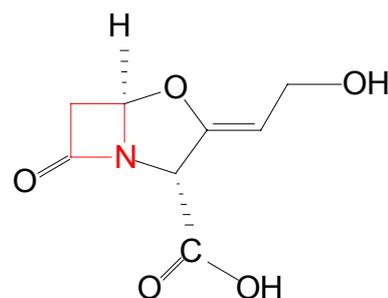


Figura 2.4 Estrutura química do ácido clavulânico (LANCINI; LORENZETTI, 1993)

O ácido clavulânico penetra nas bactérias Gram-negativas e se liga covalentemente a várias β -lactamases inativando-as, sendo por isso considerado um inibidor suicida para β -lactamases de *Staphylococcus* e algumas bactérias Gram-negativas como *Proteus*, *Escherichia* e *Haemophilus* (LANCINI *et al.*, 1995)

Cinco combinações de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase estão comercialmente disponíveis para tratamento de algumas infecções (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Combinações de β -lactâmicos/inibidores de β -lactamase para uso clínico disponíveis comercialmente (WILLIAMS, 1999)

| β -lactâmicos | Inibidor de β -lactamase | Administração |
|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| Ampicilina | Sulbactam | Parenteral e oral |
| Cefaperazone | Sulbactam | Parenteral |
| Piperacilina | Tazobactam | Parenteral |
| Ticarcilina | Ácido clavulânico | Parenteral |
| Amoxicilina | Ácido clavulânico | Parentera e oral |

A combinação de um β -lactâmico com um inibidor de β -lactamase se apresenta como uma opção de tratamento de grande importância, uma vez que restaura a atividade do antibiótico β -lactâmico resultando na efetividade desta família de antibióticos para o tratamento de várias infecções (WILLIAMS, 1999).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas 19 linhagens de *Streptomyces* spp pertencentes à Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos (DAUFPE).

Tabela 3.1 Linhagens pertencentes à Coleção de Culturas DAUFPE utilizadas no presente trabalho

| Linhagem | Ano de Conservação | Meio de Conservação | Meio de Reativação |
|-------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| DAUFPE 3004 | 1998 | CZ | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3006 | 1998 | CAA | TSB |
| DAUFPE 3007 | 1998 | CAA | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3009 | 1998 | CAA | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3012 | 1998 | CZ | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3016 | 1998 | CAA | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE3018 | 1998 | CZ | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3036 | 1998 | CAA | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3053 | 2000 | ISP-2 | TSB |
| DAUFPE3060 | 1998 | CZ | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3061 | 2002 | ISP-2 | ISP-1 |
| DAUFPE 3094 | 2002 | CAA | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3095 | 1999 | ISP-4 | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3098 | 1994 | M | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3125 | 1993 | M | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3126 | 1999 | ISP-2 | ISP-1 |
| DAUFPE 3131 | 1996 | M | ISP-1 |
| DAUFPE 3132 | 1996 | M | ISP-1 e TSB |
| DAUFPE 3133 | 1991 | M | ISP-1 |

Klebsiella aerogenes ATCC 15380 produtora de β -lactamase foi utilizada como microrganismo-teste segundo metodologia preconizada por Brown *et al* (1976).

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meios para reativação de esporos

- ✓ Meio ISP-1 (PRIDHAM; GOTTLIEB, 1948) composto de (em g/L): triptona (5,0), extrato de levedura (3,0), pH 7,0-7,2.;
- ✓ Meio Triptona de Soja (TSB) composto de (em g/L): hidrolisado de caseína (17,0), hidrolisado de farinha de soja (3,0), NaCl (5,0), K₂HPO₄ (2,5), dextrose (2,5), pH 7,0.

3.2.2 Meios para avaliação da viabilidade celular

- ✓ Caseína Amido Ágar (CAA), com a seguinte composição (em g/L): amido solúvel (10,0), caseína livre de vitamina (0,3), KNO₃ (2,0), NaCl (2,0), K₂HPO₄ (2,0), MgSO₄.7H₂O (0,05), CaCO₃ (0,02), FeSO₄.7H₂O (0,01), ágar (15), pH 7,0-7,4;
- ✓ Meio ISP-2 (PRIDHAM *et al.*, 1957) cuja composição é (em g/L): extrato de levedura (4,0), extrato de malte (10,0), dextrose/glicose (4,0), amido (5,0), ágar (15), pH 7,2.

3.2.3 Meios para produção de esporos

- ✓ Meio de Benedict, (em g/L): glicerol (20,0), L-arginina (2,5), NaCl (1,0), CaCO₃ (0,1), FeSO₄.7H₂O (0,1), MgSO₄.7H₂O (0,1), agar (15), pH 7,0;
- ✓ Meio de Hickey –Tresner, (PRIDHAM *et al.*, 1957), (em g/L) extrato de levedura (1,0), extrato de carne (1,0), dextrina (1,0), NZ amina (ou peptona), (2,0), CoCl₂. 7H₂O (1,0 ml/L da solução de CoCl₂.7H₂O 2,0g/L), ágar (15,0), pH 7,0;
- ✓ Meio Czapek-modificado (CZM) (em g/L): extrato de levedura (4,0), sacarose (15,0), NaNO₃ (2,0), FeSO₄.7H₂O (0,01), K₂HPO₄ (0,5), KCl (0,5), MgSO₄.7H₂O (0,5), ágar (15,0), pH 7,0.

3.2.4 Meios para produção de inibidores de β -lactamases

- ✓ Meio para Produção de Eurimicina (MPE), (ALBUQUERQUE *et al.*, 1975) (em g/L): farinha de soja (20,0), glicose (20,0), CaCO_3 (2,0), NaCl (5,0), pH 6,7-7,0;
- ✓ Meio MPE modificado no presente trabalho, composto de (em g/L): glicose (10), farinha de soja (30), K_2HPO_4 (1,5) e FeSO_4 (0,01), pH 6,5.
- ✓ Meio MG (MELO; GOUVEIA, 2002) (em g/L): glicerol (7,5), sacarose (7,5), arginina (4,03), prolina (5,79), NaCl (5,0), K_2HPO_4 (2,0), CaCl_2 (0,4), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,1), ZnCl_2 (0,05), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0), pH 7,0.
- ✓ Caseína Amido (CA), (em g/L): amido solúvel (10,0), caseína livre de vitamina (0,3), KNO_3 (2,0), NaCl (2,0), K_2HPO_4 (2,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05), CaCO_3 (0,02), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), pH 7,0-7,4;
- ✓ Meio com glicerol, também formulado neste trabalho, composto de (em g/L): glicerol (10,0), hidrolisado de soja (30,0), K_2HPO_4 (1,5), FeSO_4 (0,01), pH 6,5.

3.2.5 Meio utilizado no teste de atividade antimicrobiana

Meio Ágar Nutritivo (AN), (em g/L): peptona (10,0), extrato de carne (3,0), NaCl (5,0), pH 6,9-7,0.

3.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: mesa agitadora, medidor de pH (Metronm Herisan, E350B), autoclaves verticais (Fable- Primar, 103), estufa incubadora (Fanem, 377 CD), câmara de fluxo laminar (VECO), balança analítica (Sartorius BP 3100S) e semi-analítica (Sartorius BP 121 S), espectrofotômetro UV/ VIS (HP 8453), centrífuga (Incibrás, Spin).

3.4 Fermentações

Frascos de Erlenmeyers de 500mL contendo 50mL de cada um dos meios para a produção de inibidores de β -lactamases foram inoculados com 5mL do

inóculo em ISP-1, após 24 horas de cultivo a 200rpm e 30°C. As fermentações foram realizadas durante 96 horas e a cada 24 horas de incubação em mesa agitadora, alíquotas foram retiradas para a realização do teste de atividade pelo método de difusão em ágar.

A Figura 3.1 apresenta o esquema utilizado nas fermentações em meios líquidos complexos e quimicamente definidos.

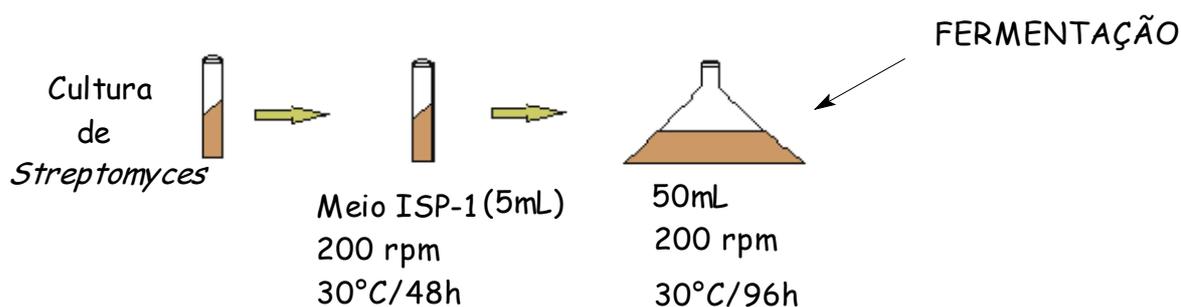


Figura 3.1 Esquema das fermentações em mesa agitadora com meios complexos e quimicamente definidos

3.5 Seleção de *Streptomyces* produtores de inibidores de β -lactamase

A seleção de linhagens produtoras de inibidores de β -lactamase foi realizada utilizando-se o teste de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, com bloco de gelose e com cultivo em meio sólido, segundo Brown *et al* (1976).

3.5.1 Seleção primária pelo método Bloco de gelose

A metodologia para a seleção de inibidores de β -lactamase foi realizada utilizando 100mL do meio AN, adicionado de 100 μ L de amoxicilina na concentração 10.000 μ g/mL de modo a obter-se uma concentração final de amoxicilina a 10 μ g/mL, em seguida, foi adicionado 1mL da suspensão de *Klebsiella aerogenes* ATCC15380 com turbidez igual ao tubo 1 da escala de Mac Farland, e distribuído em placas de Petri (BROWN *et al*, 1976). Após solidificação, blocos de gelose dos *Streptomyces* crescidos em meio CAA ou ISP-2 foram retirados e colocados sobre o meio. As placas foram levadas à geladeira por 10 minutos e depois incubadas em

estufa a 37°C. Após 24 horas de incubação, foi realizada a leitura dos halos de inibição. A Figura 3.2 apresenta o esquema do teste com bloco de gelose.

3.5.1.1 Seleção primária pelo método cultivado em meio sólido

Na etapa da seleção primária, culturas de *Streptomyces* apresentando micélio aéreo e bom crescimento foram inoculadas no centro das placas de Petri contendo os meios CAA e ISP-2 e em seguida incubadas durante 4 a 5 dias a 30°C. A 100mL de meio AN, foi adicionado 1mL da suspensão de *Klebsiella aerogenes* ATCC 15380 e 100µL de amoxicilina na concentração 10.000µg/mL. Um volume de 8mL deste meio foi usado para cobrir as colônias crescidas de *Streptomyces*. A incubação foi realizada a 37°C e o halo de inibição foi medido após 24 horas. A Figura 3.2 apresenta o esquema do cultivo em meio sólido utilizado na seleção primária.

3.5.2 Seleção secundária -Teste de difusão em disco de papel

O teste de atividade antimicrobiana com as linhagens que tiveram atividade na seleção primária, foi realizado com as amostras retiradas durante as fermentações e teve o seguinte procedimento:

O meio AN contendo amoxicilina (10µg/mL) e *Klebsiella aerogenes* ATCC15380, como descrito no item 3.5.1, foi distribuído em placas de Petri e após solidificação, discos de papel de filtro com 6mm de diâmetro embebidos com 30µL da fermentação, foram colocados sob a superfície do meio. Após 24 horas de incubação a 37°C, foi realizada a leitura dos halos de inibição.

A Figura 3.2 apresenta o esquema utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana das amostras, retiradas durante a fermentação.

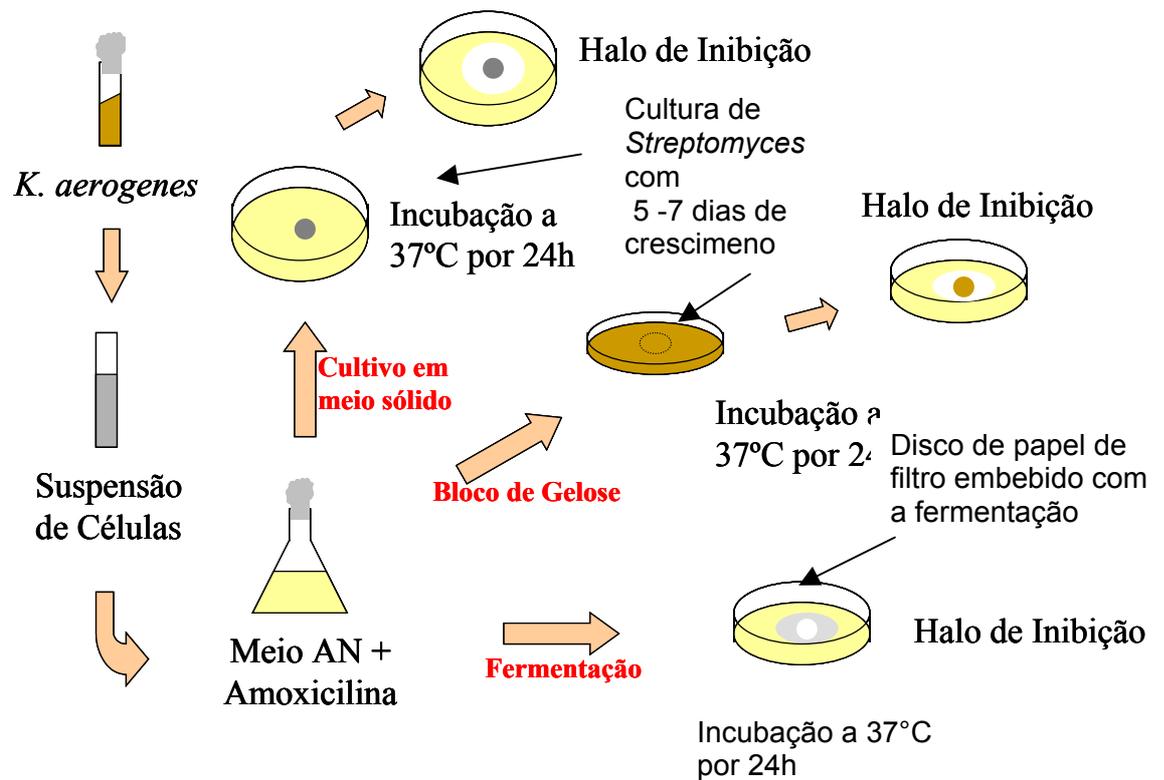


Figura 3.2 Esquema dos testes de atividade antimicrobiana bloco de gelose e cultivo em meio sólido utilizados na seleção primária, e ensaio secundário com a fermentação

3.6 Determinação de ácido clavulânico

A determinação de ácido clavulânico durante os cultivos em meios líquidos foi realizada pela medida da absorbância (312 nm) do produto da reação do ácido clavulânico com imidazol (BIRD *et al*, 1982).

A solução de imidazol foi preparada dissolvendo-se 4,13g de imidazol em 25mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 6,8 com ácido clorídrico concentrado e o volume foi completado para 50mL com água destilada.

Para o cálculo da absorbância foram utilizadas duas soluções para cada amostra:

Solução A: 0,5 mL da amostra + 2,5 mL de imidazol.

Solução B: 0,5 mL da amostra + 2,5 mL de água destilada.

A solução A foi colocada em banho-maria a 30°C por 12 minutos para que o ácido clavulânico reagisse com imidazol e posteriormente resfriada (20°C) antes da leitura da absorbância. Foi utilizada uma solução com 0,5 mL de água destilada + 2,5 mL de imidazol como branco da solução A e água destilada como branco da solução B.

A leitura da absorbância foi realizada a 312nm e a determinação do ácido clavulânico foi expressa pelo cálculo da diferença da absorbância entre as soluções A e B.

$$\text{Absorbância}_{AC} = \text{Absorbância}_{\text{Solução A}} - \text{Absorbância}_{\text{Solução B}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimentos preliminares

As 19 linhagens de *Streptomyces* retiradas da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE) foram reativadas para purificação e, em seguida, transferidas para os meios CAA e ISP-2 para observação do crescimento em meios sólido. Os resultados da observação macroscópica são mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Características macroscópicas das 19 linhagens de *Streptomyces* em diferentes meios

| Linhagens | Meios de Cultivo | | | | | |
|-------------|------------------|----------|---------------|-------------|----------|---------------|
| | CAA | | | ISP-2 | | |
| | Crescimento | Pigmento | Micélio aéreo | Crescimento | Pigmento | Micélio aéreo |
| DAUFPE 3004 | ++ ¹ | sim | sim | + | não | não |
| DAUFPE 3006 | +++ | sim | sim | + | não | não |
| DAUFPE 3007 | ++ | não | sim | + | não | não |
| DAUFPE 3009 | +++ | não | não | +++ | não | sim |
| DAUFPE 3012 | + | não | sim | +++ | não | sim |
| DAUFPE 3016 | +++ | não | sim | +++ | não | sim |
| DAUFPE 3018 | ++ | não | não | ++ | não | não |
| DAUFPE 3036 | ++ | não | sim | +++ | sim | sim |
| DAUFPE 3053 | - | não | não | ++ | sim | não |
| DAUFPE 3060 | +++ | sim | sim | +++ | não | não |
| DAUFPE 3094 | +++ | sim | sim | ++ | sim | não |
| DAUFPE 3095 | ++ | sim | sim | +++ | sim | não |
| DAUFPE 3098 | ++ | sim | sim | + | não | sim |
| DAUFPE 3099 | + | não | não | + | não | não |
| DAUFPE 3125 | ++ | sim | sim | ++ | sim | sim |
| DAUFPE 3126 | +++ | sim | sim | +++ | não | não |
| DAUFPE 3131 | +++ | sim | sim | ++ | não | não |
| DAUFPE 3133 | +++ | sim | sim | ++ | não | não |
| DAUFPE 3132 | ++ | sim | sim | +++ | sim | sim |

1: + ruim; ++ bom; +++ ótimo; - não houve crescimento

4.2 Seleção primária de *Streptomyces* produtores de inibidores de β -lactamases

As 19 linhagens foram utilizadas para seleção primária de produtores de inibidores de β -lactamase realizada pela medida da atividade antimicrobiana utilizando bloco de gelose e cultivo em meio sólido. As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam percentual de linhagens com atividade contra *Klebsiella aerogenes* pelo método bloco de gelose.

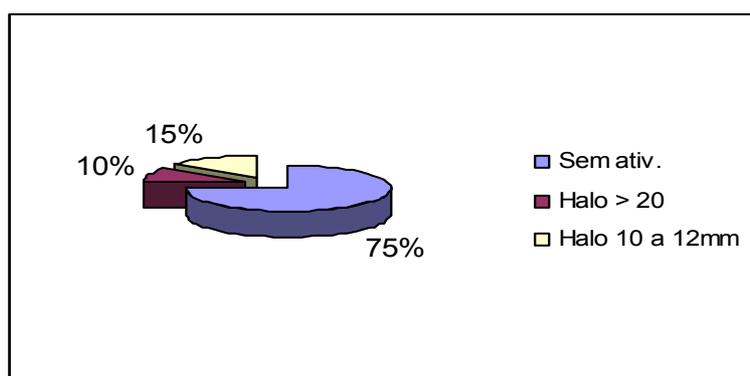


Figura 4.1 Percentual de linhagens ativas contra *Klebsiella aerogenes* pelo método bloco de gelose em meio CAA

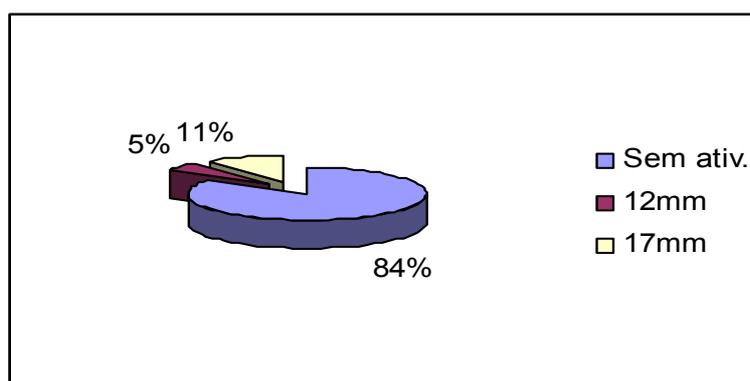


Figura 4.2 Percentual de linhagens ativas contra *Klebsiella aerogenes* pelo método bloco de gelose em meio ISP-2

Dentre as 19 linhagens investigadas nesta etapa, 25% das linhagens (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098 e DAUFPE 3133) apresentaram atividade antimicrobiana em meio CAA e 16% (DAUFPE 3060,

DAUFPE 3133 e DAUFPE 3094) em meio ISP-2. A Figura 4.3 apresenta os diâmetros dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar com bloco de gelose para estas 5 linhagens nos dois meios utilizados. As linhagens DAUFPE 3036 e DAUFPE 3098 apresentaram atividade antimicrobiana apenas em meio CAA. Por outro lado, as linhagens DAUFPE 3060, DAUFPE 3133 e DAUFPE 3094 mostraram atividade em ambos os meios, sendo que no meio ISP-2, os resultados foram melhores.

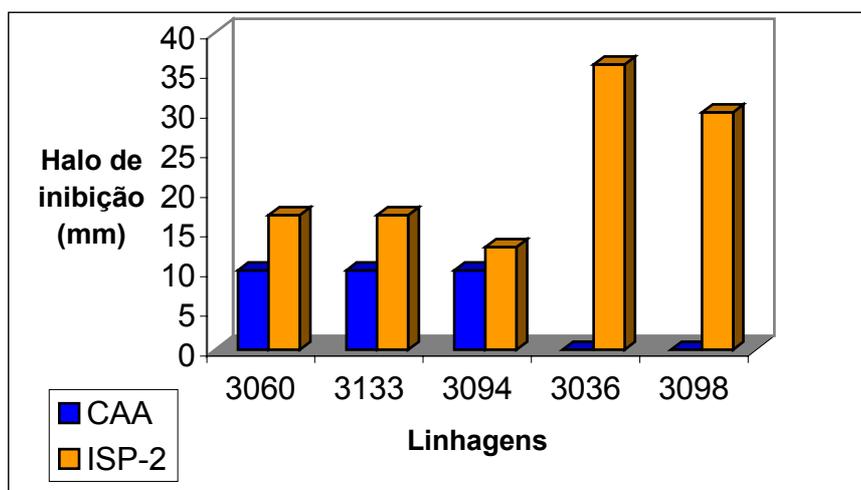


Figura 4.3 Atividade antimicrobiana de diferentes linhagens de *Streptomyces sp* frente a *Klebsiella aerogenes*, pelo método bloco de gelose em diferentes meios de cultura

Os resultados do teste de atividade antimicrobiana utilizando cultivo em meio sólido são mostrados na Figura 4.4. A linhagem que apresentou melhor atividade antimicrobiana por este método foi a DAUFPE 3036, com halo de inibição de 47 mm.

Vale ressaltar que, com este procedimento, todas as linhagens apresentaram resultado positivo com relação à produção de inibidores de β -lactamases, como pode ser constatado pelas Figuras 4.5 a 4.8 onde se observa os halos de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante o ensaio primário.

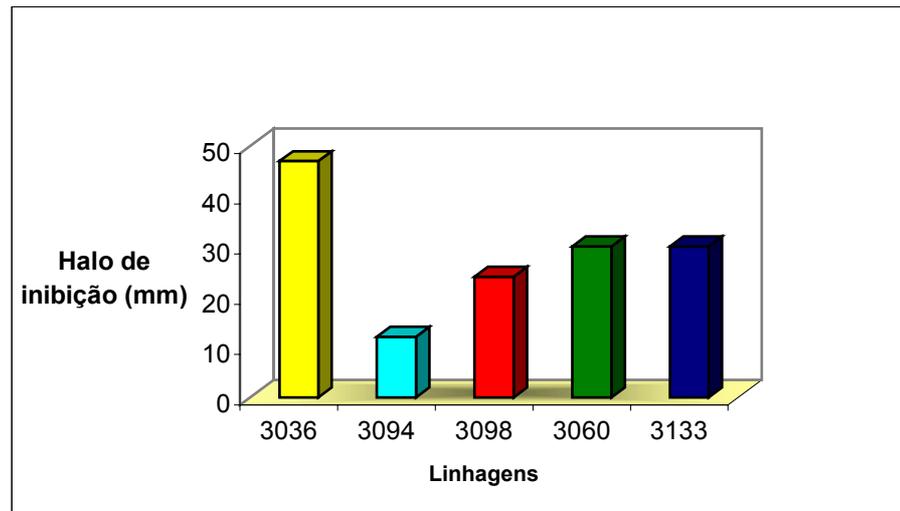


Figura 4.4 Atividade antimicrobiana das linhagens selecionadas em meio sólido

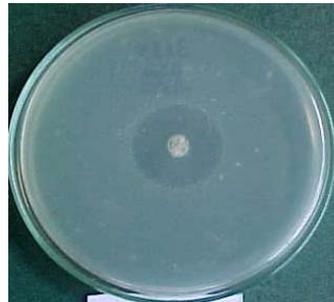


Figura 4.5 Halo de inibição de *Klebsiella aerogenes* pela linhagem de *Streptomyces* sp DAUFPE 3133 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina



Figura 4.6 Halo de inibição de *Klebsiella aerogenes* pela linhagem de *Streptomyces* sp DAUFPE 3098 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina



Figura 4.7 Halo de inibição de *Klebsiella aerogenes* pela linhagem de *Streptomyces* sp DAUFPE 3060 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina

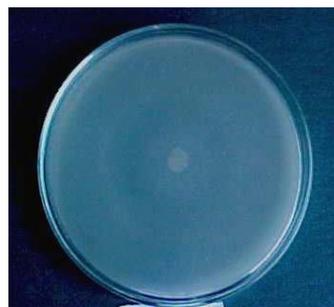


Figura 4.8 Halo de inibição de *Klebsiella aerogenes* pela linhagem de *Streptomyces* sp DAUFPE 3036 cultivada em meio CAA contendo amoxicilina

4.3 Fermentações para a seleção de *Streptomyces* produtores de ácido clavulânico.

A segunda etapa da pesquisa foi a realização de cultivos em meios líquidos para avaliação da produção de ácido clavulânico pelas 5 linhagens de *Streptomyces*

selecionadas inicialmente. Os resultados obtidos durante os cultivos nos meios CA e MPE podem ser observados nas Figuras 4.9 e 4.10, respectivamente. No meio CA as linhagens que apresentaram atividade foram DAUFPE 3036, nas primeiras 24 horas e DAUFPE 3098 em 48 horas de cultivo. No meio MPE todas as linhagens apresentaram atividade, sendo o melhor resultado observado para as linhagens DAUFPE 3133 e DAUFPE 3094 em 72 horas de cultivo. As Figuras 4.11 e 4.12 mostram os halos de inibição obtidos por amostras com 48 horas de cultivo da linhagem DAUFPE 3060 e 96 horas de cultivo da linhagem DAUFPE 3133 neste meio. No meio sintético MG não houve atividade antimicrobiana.

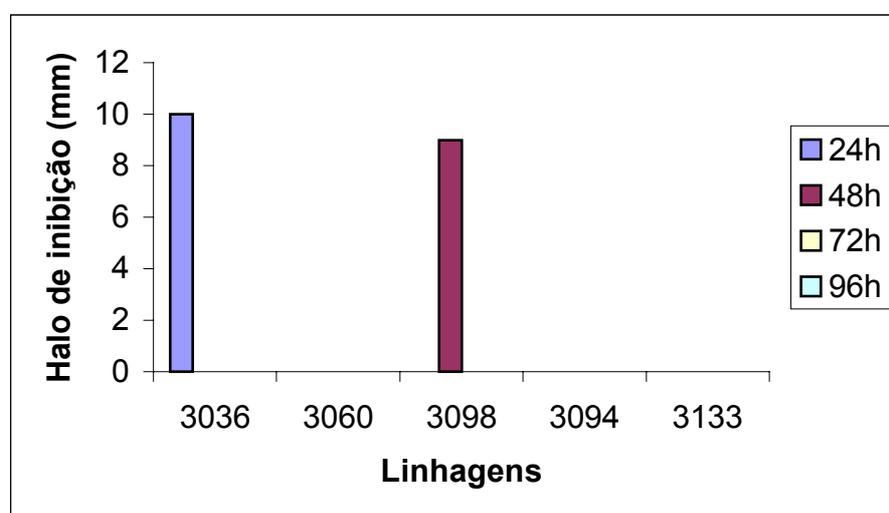


Figura 4.9 Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 96 horas de fermentação em meio CA para as 5 linhagens (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3098, DAUFPE 3094 e DAUFPE 3133)

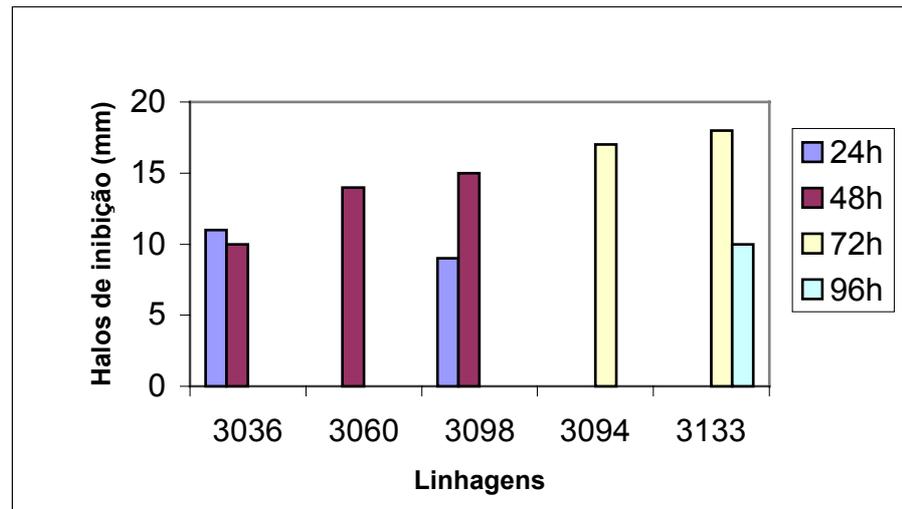


Figura 4.10 Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 96 horas de fermentação em meio MPE para as 5 linhagens DAUFPE (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3098, DAUFPE 3094 e DAUFPE 3133)



Figura 4.11 Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* da linhagem DAUFPE 3060 com 48 horas de cultivo em meio MPE



Figura 4.12 Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* da linhagem DAUFPE 3133 com 96 horas de cultivo em MPE

As fermentações em meio MPE foram repetidas acompanhado-se a verificação do pH. Dois outros meios também foram utilizados, MPE modificado e meio complexo contendo glicerol como fonte de carbono. Os resultados obtidos com relação à produção de inibidores de β -lactamases são apresentados nas Figuras 4.13-4.15.

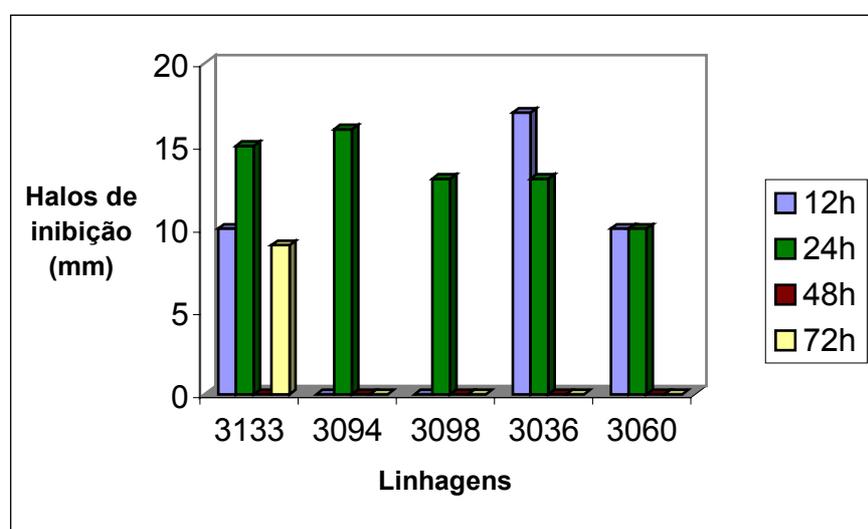


Figura 4.13 Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 72 horas de fermentação em meio MPE para as 5 linhagens (DAUFPE 3133, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098, DAUFPE 3036 e DAUFPE 3060)

Os resultados com o meio MPE modificado, comparando-se com o meio MPE foram consideravelmente melhores (Figuras 4.13 e 4.14), uma vez que a atividade antimicrobiana manteve-se por 72 horas para as linhagens DAUFPE 3133, DAUFPE 3094 e DAUFPE 3036 e por 48 horas para a linhagem DAUFPE 3098. Quando o meio MPE foi utilizado, a única linhagem em que a atividade antimicrobiana foi mantida até 72 horas foi a DAUFPE 3133 com halo de inibição de 10mm. Entretanto, o halo de inibição da fermentação com 12 e 24 horas variou de 13 a 17mm para as demais linhagens DAUFPE 3094, DAUFPE 3098, DAUFPE 3036 e DAUFPE 3060 (Figura 4.13).

Esta diminuição da atividade após 24 horas de cultivo, decorre provavelmente da degradação do metabólito inibidor durante a fermentação, como relatado por Chen *et al.* (2003), que enfatizam que a diminuição do ácido clavulânico após 36 horas de fermentação ocorre devido ao aumento de pH e da autólise celular. Fenômenos similares foram observados por Mayer & Deckwer (1996) e Romero *et al.* (1984) na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

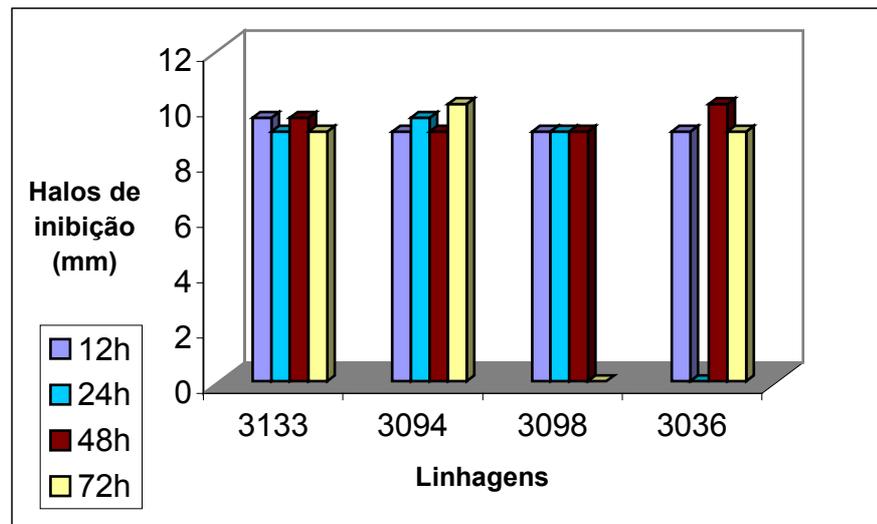


Figura 4.14 Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 72 horas de fermentação em MPE modificado para 4 linhagens (DAUFPE 3133, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098, DAUFPE 3036)

O meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono foi favorável apenas para as linhagens DAUFPE 3094, DAUFPE 3036 e DAUFPE 3060 (Figura 4.15). As linhagens DAUFPE 3133 e DAUFPE 3098 provavelmente preferem glicose como fonte de carbono.

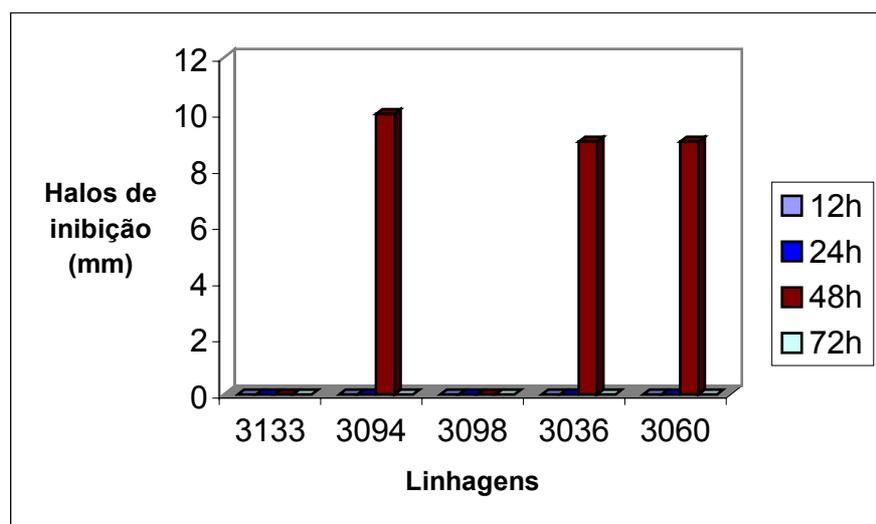


Figura 4.15 Halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes* durante 72 horas de fermentação em meio com glicerol para as 5 linhagens (DAUFPE 3133, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098, DAUFPE 3036 e DAUFPE 3060)

Segundo Haginaka *et al.* (1985), o ácido clavulânico é degradado em pH alcalino, razão pela qual foram feitas as medidas do pH durante as fermentações. As Figuras 4.16-4.20 apresentam os resultados de produção comparando-se com pH, no mesmo tempo de cultivo em MPE.

Como mostra a Figura 4.16, a atividade antimicrobiana da linhagem DAUFPE 3036 em meio MPE foi obtida até 24 horas em pH abaixo de 8,0. Com 48 horas de fermentação já não se observou a formação de halo de inibição, provavelmente porque o pH era alcalino, comprovando os achados de Mayer e Deckwer (1996), os quais relatam que o pH constitui um importante fator com influência negativa para a produção de ácido clavulânico.

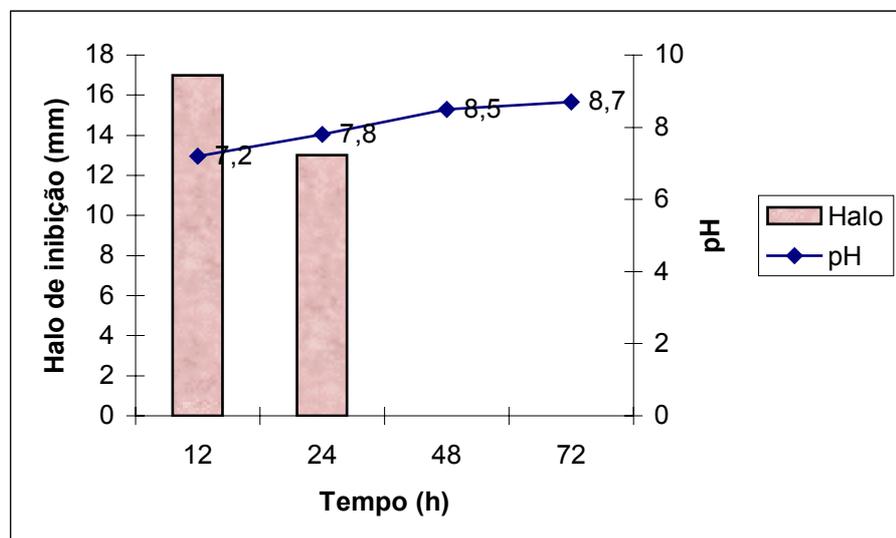


Figura 4.16 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3036 em meio MPE, em diferentes tempos de fermentação

A Figura 4.17 mostra a atividade antimicrobiana da linhagem DAUFPE 3060 em meio MPE ao longo de 72 horas de cultivo, onde se observa que após 24 horas de cultivo quando o pH é superior a 8,0, a linhagem perde a atividade antimicrobiana confirmando o que relata a literatura.

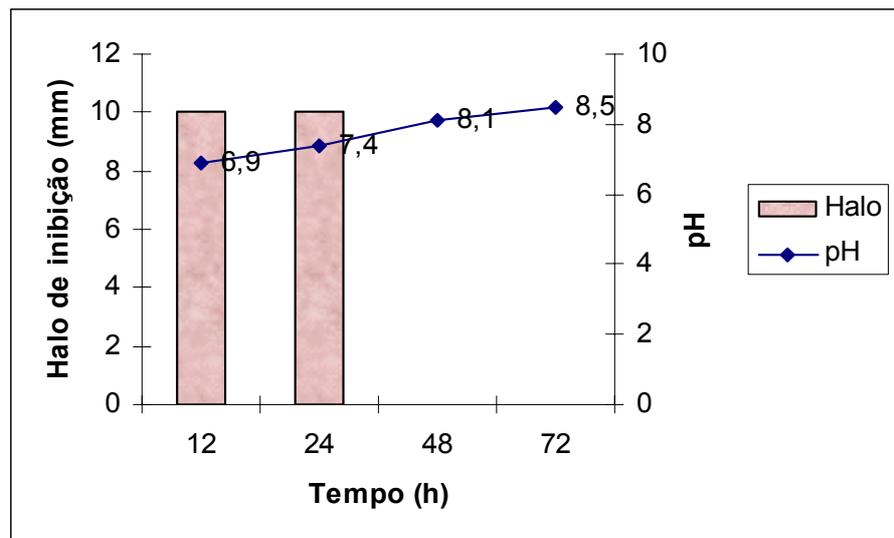


Figura 4.17 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3060 em meio MPE em diferentes tempos de fermentação

As linhagens DAUFPE 3094 e DAUFPE 3098 exibiram atividade no meio MPE em pH neutro em 24 horas de cultivo, como mostram as Figuras 4.18 e 4.19, respectivamente. Novamente, quando o pH alcançou um valor maior que 8,0, o produto provavelmente foi degradado, uma vez que não foi observado halo de inibição contra *Klebsiella aerogenes*.

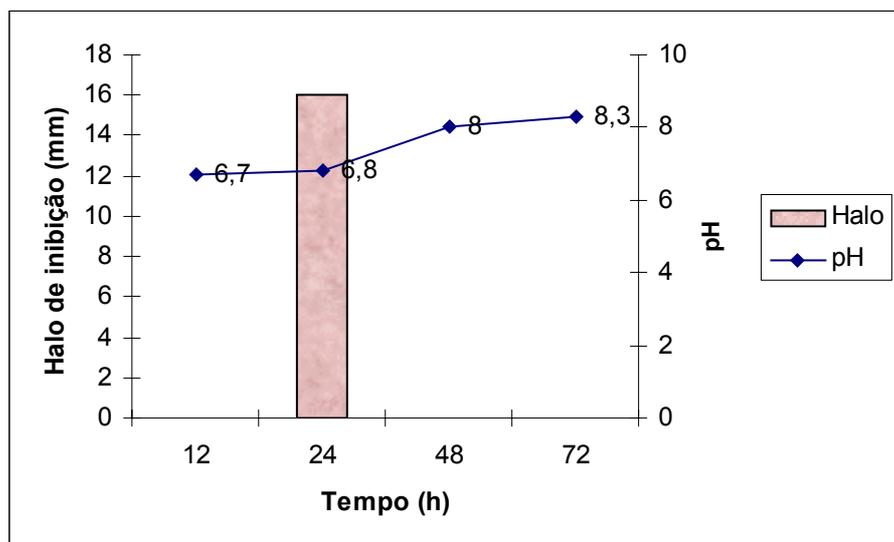


Figura 4.18 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3094 em meio MPE, em diferentes tempos de fermentação

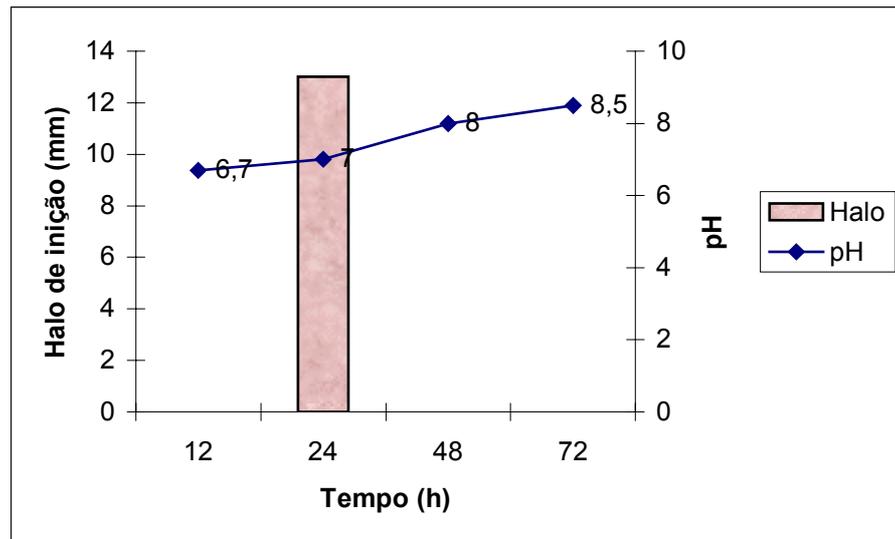


Figura 4.19 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3098 em meio MPE, em diferentes tempos de fermentação

A maior atividade da linhagem DAUFPE 3133 em meio MPE também ocorreu após 24 horas de fermentação em pH neutro como apresentado na Figura 4.20, onde se observa halo de inibição de 15 mm para *K. aerogenes*.

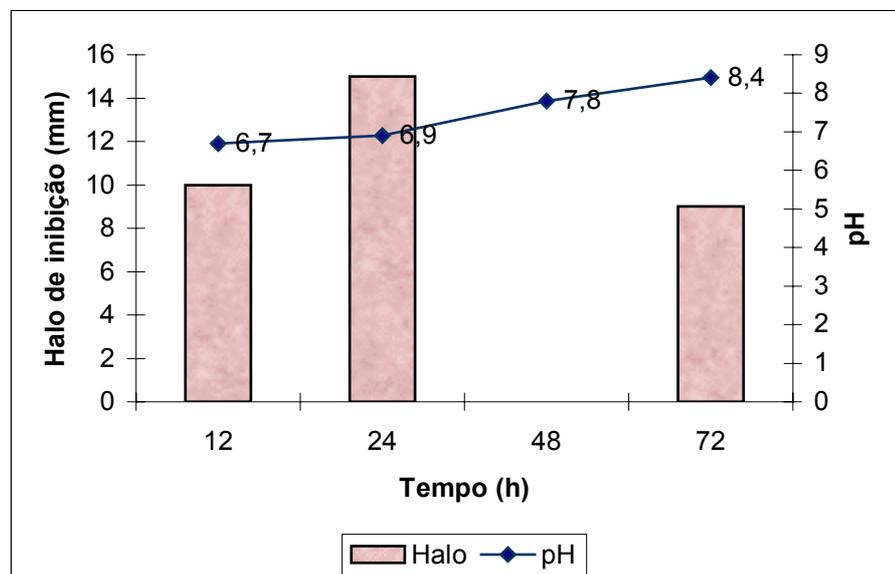


Figura 4.20 Relação da atividade/pH da linhagem DAUFPE 3133 em meio MPE em diferentes tempos de fermentação

Igualmente, pode ser observado nas Figuras 4.21 e 4.24 a variação de pH das 5 linhagens quando cultivadas no meio MPE modificado.

Para a linhagem DAUFPE 3036 (Figura 4.21), o pH no meio MPE modificado variou de 7 a 9 ao longo de 72 horas de cultivo. Apesar da alcalinidade da fermentação foi observado atividade antimicrobiana com 12, 48 e 72 horas de cultivo, indicando provavelmente a produção de inibidores estáveis a pH alcalino.

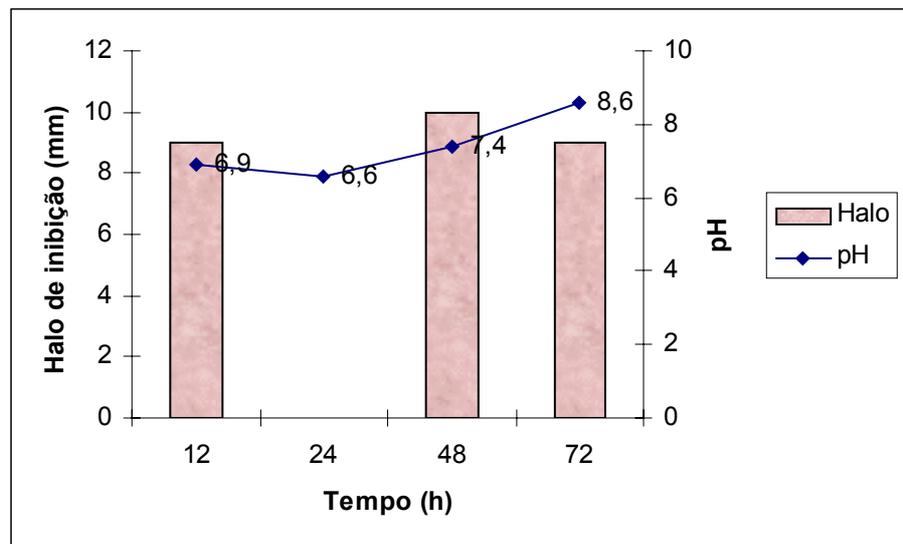


Figura 4.21 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3036 em meio MPE modificado em diferentes tempos de fermentação

O cultivo da linhagem DAUFPE 3094 no meio MPE modificado mostrou atividade antimicrobiana contra *K. aerogenes* durante 72 horas de cultivo, período em que o pH permaneceu levemente ácido entre 5,5 e 6,0 (Figura 4.22).

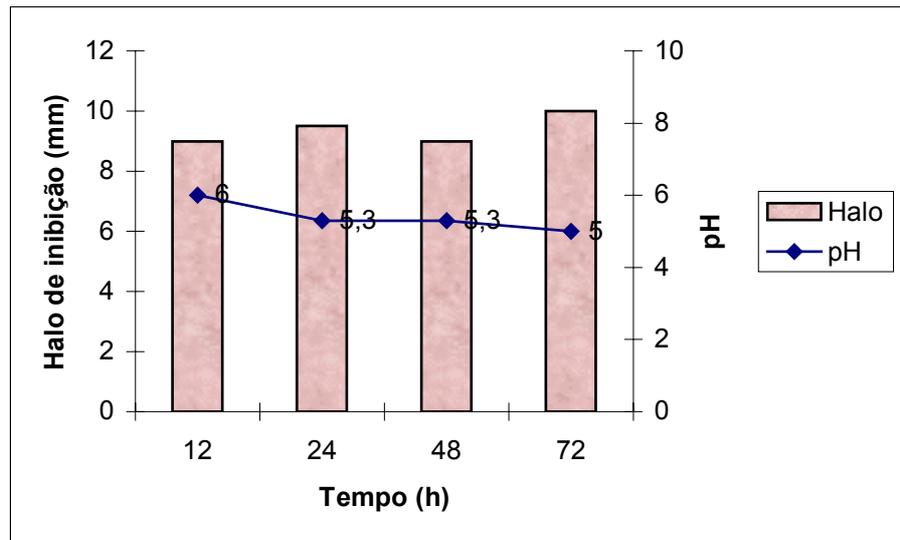


Figura 4.22 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3094 em meio MPE modificado em diferentes tempos de fermentação

A linhagem DAUFPE 3098 exibiu atividade durante 48 horas de fermentação em meio MPE modificado em pH também levemente ácido. Após 72 horas de fermentação, a mesma deixou de exibir atividade antimicrobiana, como mostra a Figura 4.23. Como este meio mantém uma faixa de pH ligeiramente ácido (pH 5-6), a atividade antimicrobiana se mantém por até 72 horas de fermentação.

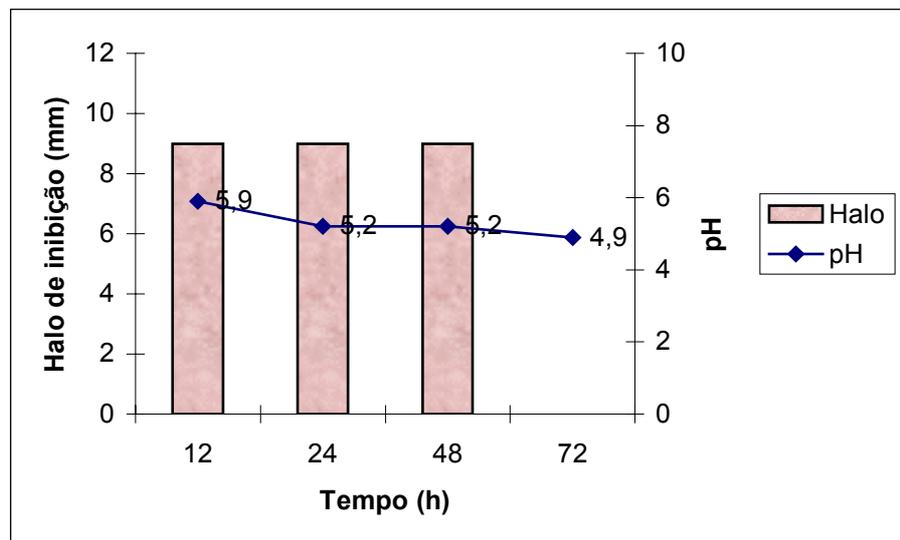


Figura 4.23 Relação atividade pH da linhagem DAUFPE 3098 em meio MPE modificado em diferentes tempos de fermentação

Durante toda a fermentação em meio MPE modificado, a linhagem DAUFPE 3133 permaneceu com atividade antimicrobiana, com o pH variando entre neutro e levemente ácido (Figura 4.24).

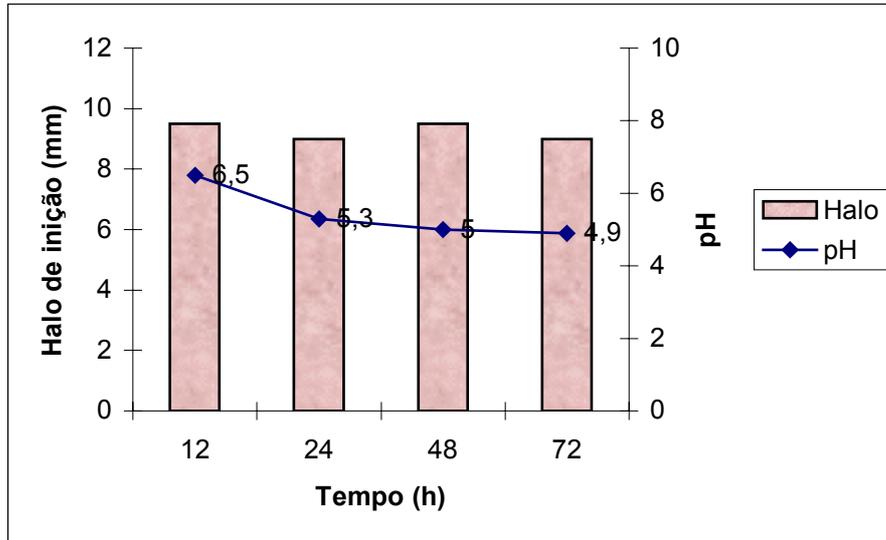


Figura 4.24 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3133 em MPE modificado em diferentes tempos de fermentação

As Figuras 4.25-4.27 registraram os resultados de produção comparados com a variação de pH, no mesmo tempo de cultivo em meio complexo com glicerol como fonte de carbono. Neste meio, a linhagem DAUFPE 3036 apresentou atividade apenas com 48 horas de cultivo em pH próximo a 7,0 (Figura 4.25).

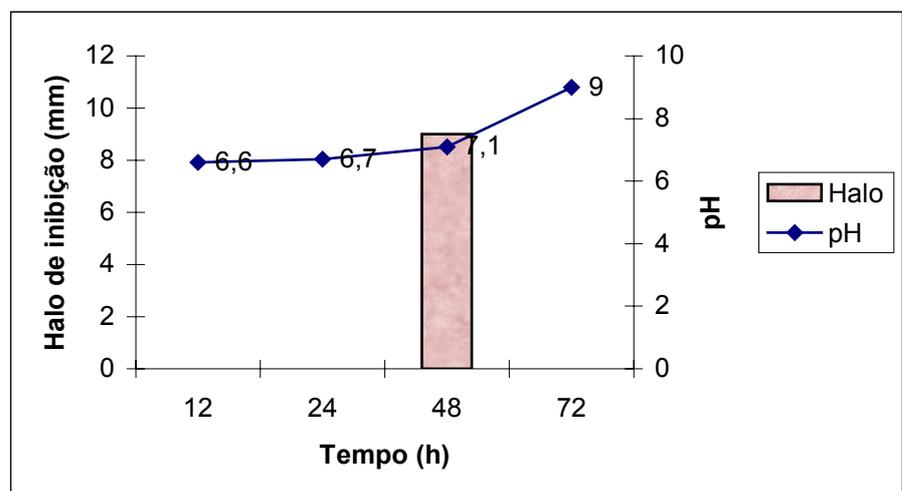


Figura 4.25 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3036 em meio com glicerol em diferentes tempos de fermentação

As Figuras 4.26 e 4.27 mostram os resultados das linhagens DAUFPE 3060 e DAUFPE 3094 no meio com glicerol. Com 48 horas de cultivo, foi observado pequeno halo de inibição (9mm) e pH abaixo de 7,0 para a linhagem DAUFPE 3060 (Figura 4.26) enquanto para a linhagem DAUFPE 3094 o pH ficou acima de 7,0 após 24 horas de fermentação (Figura 4.27).

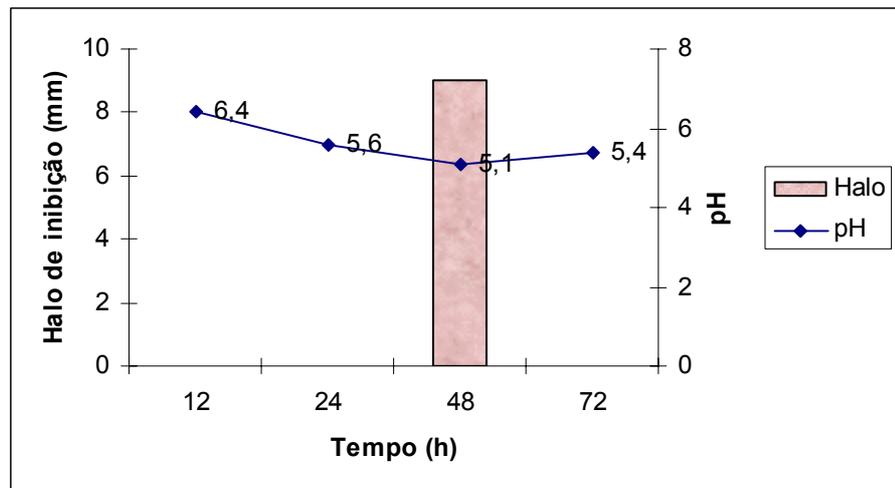


Figura 4.26 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3060 em meio com glicerol

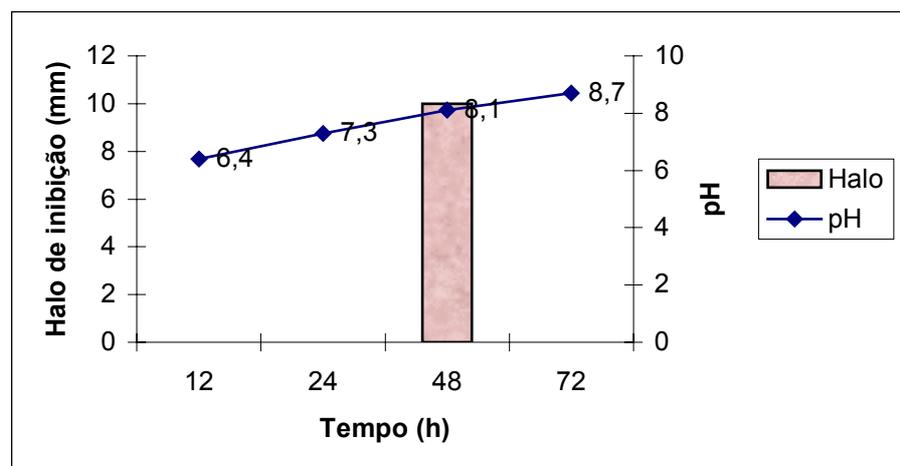


Figura 4.27 Relação atividade/pH da linhagem DAUFPE 3094 em meio com glicerol em diferentes tempos de fermentação

A variação de pH no meio de fermentação com glicerol para as diferentes linhagens mostra uma tendência a alcalinização como observado para as linhagens DAUFPE 3036 (Figura 4.25) e DAUFPE 3094 (Figura 4.27).

Se faz necessário, portanto, a utilização de um meio de fermentação contendo substâncias tampão que minimizem a flutuação de pH, proporcionando condições ácidas a neutra e assim estabilize a produção de ácido clavulânico por estas linhagens.

A determinação de ácido clavulânico por estas linhagens foi realizada com as amostras que apresentaram halo de inibição. Entretanto, apenas algumas dessas amostras (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060 e DAUFPE 304) deram resultado positivo quanto à presença de ácido clavulânico, sugerindo que foram produzidos outros inibidores pelas linhagens DAUFPE 3133 e DAUFPE 3098. Os resultados da análise de ácido clavulânico realizada por espectrofotometria podem ser observados na Tabela 4.3. A linhagem DAUFPE 3094 em 24 horas de cultivo no meio MPE modificado com pH ácido, apresentou maior produção de ácido clavulânico.

Tabela 4.2 Análise da produção de ácido clavulânico pelas linhagens que apresentaram atividade antimicrobiana, relacionando meio, pH e tempo de fermentação.

| Linhagem | Meios de Cultura Líquidos | Tempo de Cultivo (h) | pH | Ácido Clavulânico Absorbância* |
|----------|---------------------------|----------------------|-----|--------------------------------|
| 3036 | MPE modificado | 72 horas | 8.5 | 0,0154 |
| 3036 | Glicerol | 48 horas | 7.1 | 0,0366 |
| 3060 | Glicerol | 48 horas | 5.1 | 0,03811 |
| 3094 | MPE modificado | 12 horas | 6.2 | 0,6996 |
| 3094 | MPE modificado | 24 horas | 5.3 | 1,1212 |

Absorbância da sol. A – Absorbância da sol. B

Os resultados obtidos (Tabela 4.3) mostram que a produção de ácido clavulânico foi maior em pH ácido, corroborando com os relatos da literatura, que sugere a ocorrência de degradação deste composto em meio alcalino (MAYER ; DECHWER, 1996; CHEN *et al.*, 2003).

5. CONCLUSÕES

- 1- Das 19 linhagens testadas, 5 (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3094, DAUFPE 3098 e DAUFPE 3133) foram selecionadas como produtoras de inibidores de β -lactamases;
- 2- Dentre estas linhagens selecionadas, três (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060 e DAUFPE 3133) apresentaram os maiores halos de inibição no ensaio com bloco de gelose;
- 3- Quando o meio Caseína Amido (CA) foi utilizado houve produção de inibidores de β -lactamases por duas (DAUFPE 3036 e DAUFPE 3098), das 5 linhagens selecionadas;
- 4- Nas fermentações com os meios MPE, todas as 5 linhagens produziram inibidores de β -lactamases;
- 5- Nas fermentações com o meio complexo contendo glicerol como fonte de carbono, houve produção de inibidor de β -lactamase pelas linhagens DAUFPE 3036, DAUFPE 3060 e DAUFPE 3094;
- 6- O meio quimicamente definido MG não favoreceu a produção para nenhuma das 5 linhagens;
- 7- A produção de ácido clavulânico foi observada para as linhagens DAUFPE 3036, DAUFPE 3060 e DAUFPE 3094, no meio MPE modificado e no meio complexo contendo glicerol.

- 8- A linhagem DAUFPE 3036 deve produzir outro inibidor de β -lactamase, além do ácido clavulânico, enquanto que a linhagem DAUFPE 3098, provavelmente produz outro inibidor

6. PERSPECTIVAS

Para esclarecer se as linhagens selecionadas produzem ácido clavulânico, as mesmas deverão ser analisadas quanto ao perfil de DNA, através da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando “primers” específicos do gene do ácido clavulânico.

Outra abordagem futura será a determinação através de sondas moleculares se as 5 linhagens selecionadas pertencem à espécie *Streptomyces clavuligerus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE *et al* Um Complexo Antibiótico Produzido pelas Cepas de *Streptomyces* 5695, 6180, 6595 e 6616 (IAUFPE) de Procedências Distintas, Intimamente Relacionadas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 10, n.1/2, p. 17-28, 1975.

AOKI, H.; SAKAI, H., KOHSAKA, M.; RONOMI, T.; HOSODA, J.; KUBOCHI, Y.; IGUCHI, E., MANAKA, H. 1976. Norcadian A, a New Monocyclic β -lactam Antibiotic. **Journal of Antibiotics** . In Satosh Ōmura. Springer-Vorlag, **The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms**. Ed. Satosh Ōmura. Springer-Vorlag, Tokyo, Japan, 1992.

BEAMAN, B. The Pathogenesis of *Norcadia*. In : Gram-Positive Pathogens. Vicent A. Fichetti; Richard P. Novick; Joseph J. Ferretti; Daniel A. Portnoy; Julian :Washington, ASM Press 753 p. D.C. 2000.

BEHARRY, Z.; CHEN, H.; GADHACHANDA, V. R.; BUYNAK, J.D.; PALZKILL, T. Evaluation of penicillin-based inhibitors of the class A and B β -lactamases from *Bacillus anthracis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 541-545, 2004.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, Eds G. G. Holt,, N. R. Krieng; P. H. A. Sneath; J. T., Staley; S. T., Williams. Williams & Williams- Baltimore, 9ª Ed. 1994.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Vol 4 Eds. S. T. Williams; M. E. Sharpe & J. G. Holt. Williams & Wilks- Baltimore, U. S. A. 1989.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY Vol 1. The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In: David . R. Boone; Richard W. Castenholz & Geor M. Gorry. 1ª Ed, New York, Springer-Verlag 721 pg. 2001.

BIRD, ALBERT E.; BELLIS, JEANNE M.; GASSON, BRIAN C. Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction whit Imidazole **.Analyst**, v. 107 p. 1241-1245, 1982.

BROWN, A. G., BUTTRWORTH, D., COLE, M., HANSCOMB, G., HOOD, J. D., READING, C. and ROLINSON, G. N. naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 668-669, 1976.

BUSH, K. JACOB, G. A., MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -lactamases and its Correlation With Molecular Structure. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 39, p. 1211-33, 1995.

CHATER K. F. Aspectos of Multicelular Diferentiation in *Streptomyces* . In American: Society for Microbiology, ***Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacterias**, p. 83-99, 1993.

CHATER K. F. Saps, Hidrophobins and Aerial Growth. Curr, In: **Biologic.** v. 1, p. 328-320, 1991.

CHATER, K. F. and MERRICK, M. J. "*Streptomycetes*" In: Parish, J. H. In: **Developmental Biology of Prokaryotes.** Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1979.

CHATER, K. F. H; HOPWOOD, D. A. KIESER; C. J. TOMPSON. Gene Cloning in *Streptomyces*. Current Topics in Microbiology and Immunology. In: W. Hwnle; P. H. Hofschneider; H. Koprowski; F. Melchers, R. Rott; H. G. Schweiger; P. K. Vogt. v. 96, p. 69-95, 1982.

CHATER, K. F. Morphological and Physiological differentiation in *Streptomyces*. In: Losick, R.; Shapiro, L., **Microbial Development.** New York Cold Spring Harbon, 1984.

CHEN, K-C.; LIN, Y. H.; WU, J. Y.; HWANG, S. C. J. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 32, p. 152-1526, 2003.

CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 21 p 297-307, 2003.

COLEMAN, K., *et al.* Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 33 p 1091-1116, 1994.

CROSS Aquatic Actinomycetes: A Critical Survel of the Ocurrance, Growth an Role of Actinomycetes in Aquatic Habitats. **The Journal of Apllied Bacteriology.** 50, p. 397-423, 1981.

DARY, A. Martin P.; WENNER, T., LEBLON, P., DECARIS, Evolution of the linear chromosomal DNA in *Streptomyces* : is genomic variability developmentally modulated. **Review Microgiology.** v. 150, p. 439-445, 1999.

DEMAIN, A. L. Microbial Secondary Metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. Ciba Found. Sym. 171: 3-23. **In: Manual of Microbiology and Biotechnology**. 2^a ed. Eds: Ronald M. Atlas, Gerald Cohen; Charles L. Hershberger, Wei-shou Hu; David H. Sherman; Richard C. Wilson and J. H. David Wu. ASM Press. Washington, D. C., 1999.

DEMAIN, A. L.; Functions of Secondary Metabolites. **In: Charles L. Hershberg; Stephen W. Queener; George Hegeman. Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms**. 377 p.1989.

FOSTER, T. J. Plasmid Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. Rev. Microbiology, 47: 361. **In: Antibiotics: a Multidisciplinary Approach**. Eds: Giancarlo Lancini, Francesco Parenti, Gian Gualberto Galo. Plenum Press, New York, 1995. 278 p.

GLAZER, A. N. and KIKADO, H. Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology Eds W. H. Freeman and Company. New York, 1995. 662 p.

HAGINAKA, J.; YASUDA, H.; UNO, T.; NAKAGAWA, T. Degradation of Clavulanic Acid in Aqueous Alkaline Solution: Isolation and Structural Investigation of Degradation Products. **Chemical Pharmacology Bull.**, v. 33, p. 218-224, 1985.

HAKIMELAHI, G. H et al, Design, Synthesis and Biological Evaluation of a Series of β -lactam-Based Prorug- **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. P.p. 3489-3498. 2002.

HAYASHIDA, S.; CHOI, M.-Y; NANRI, N; YOKOYAMA, M.; and VEMATSU, T. Control of potato common scab with and antibiotic fertilizer produced from swine feces containing *Streptomyces* . **Agriculture Biology Chemistry** , v.53; p. 349-354, 1989

HOPWOOD, D. A. *Streptomyces* Genetics in Pure and Applied Research. **In: Genetics and Molecular Biology Industrial**. Eds: Hershberger, C. L.; Queener, S. W.; Hegeman, G. American Society for Microbiology. Washington, p. 12-20, 1989.

HOWARTH, T. T.; BROWN, A. G.; KING, T. J. Clavulanic acid, a Novel β -Lactam Isolated from *Streptomyces clavuligerus*; X-Ray Structure Analyses. **Journal Chemical Comm.**, p. 226-267, 1976.

HUNTER, P. A. & WEBB, J. R. Comparative in vivo and in vitro activity of two novel β -lactamase inhibitors-clavulanic acid and CP-45899. In: **Current Chemotherapy and Infectious Diseases: Proceedings of the Eleventh International Congress of Chemotherapy and Nineteenth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Boston, MA. Abstract 305, pp 340-2. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1980.

LANCINI, G. & LORENZETTI, R. Biotechnology of Antibiotic and Other Bioactive Microbial Metabolites. Plenum Press, New York, 1993. 235 p.

LANCINI, G.; PARENTI, F. And GALO, G. A.: Antibiotics: A Multidisciplinary Approach. Plenum Press, New York. 1995. 278p.

LEBLOND, P.; DECARIS, B.; Unstable Linear Chromosomes: the case of *Streptomyces*. In: Charlebois R. L., Ed. **Organization of the Prokaryotic Genome**. American Society for Microbiology, Washington D. C., 1999.

LECHEVALIER, H. A. Criterion to be Used in the Description of New Actinomycete. *Actinomycetes Relato Org.* v. 16, p 46-48, 1981.

LEE, N.; YUEN, K.Y.; KUMANA, C.R. Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. **Drugs**, v. 63, p. 1511-1524, 2003.

LIN, Y. S.; KIESER, H. HOPWOOD, D. A., CHEN, C. W. The Chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is Linear. **Molecular Microbiology**. 10, 923-933, 1993.

LOYD, A. B. Dispersal of *Streptomyces* in Air. **The Journal of general Microbiology**, v. 57, p. 35-40, 1969.

MAJIDUDDIN, F. K.; MATERON, I. C.; PALZKILL, T. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. **Int. Journal Medical Microbiology**, v. 202, p. 1-11, 2002.

MARTIN, J. F. & DEMAIN, A. L. Control of Antibiotics Biosynthesis. **Microbiological Review**, v. 44, p. 230-251, 1980.

MAYER, A. F. & DECKWER, W. D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 45, p. 41-46, 1996.

MELO, G. K. S. & GOUVEIA, E. R. Produção de ácido clavulânico em batelada alimentada em meio sintético. X CONIC (Congresso de Iniciação Científica da UFPE), CD-ROM, 2002.

MILLER, L. A.; RATNAM, K.; PAYNE, D. J. β -lactamase-inhibitor combinations in the 21 st century: current agents and new developments. **Current Opinion in Pharmacology** v.1 p. 451-458, 2001.

MILLER; J. R.; INGOLIA, T. D. Cloning β -lactam genes from *Streptomyces* spp and fungi. In: HERSHBERGER, C. L.; QUEESNER, S. W.; HEGEMAN, G. Genetics and Molecular Industrial Microorganisms. AMS, Washington, DC, p. 246-255, 1989, 377p.

MISHRA, S. K., GORDON, R. E.; BARNETT, D. A. Identification of Norcadeae and Streptomyces of medical importance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11,p. 728-36, 1980.

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

NAGARAJAN R et al β -lactam antibiotics from *Streptomyces*, **Journal American Chemical Society** , v 23 p 2308, 1971

NEVES, M. L. PEREIRA, **Estudos Comparativos dos Metabólitos da Linhagem Selvagem do *Streptomyces* sp. DAUFPE-8744 e dos Mutantes Obtidos por Irradiação Ultravioleta**. Dissertação (Mestrado em Biofísica) UFPE,1999

OKAMI, Y. & HOTTA, K. Search and Dscovery of New Antibiotics. In: **Actinomycetes in Biotechnology**. Eds: M. Goodfellow, S. T. Williams, M. Mordaski. Academic Press, London, 1988. 501 p.

PAYNE, D. J.; DU, W.; BATESON, J. H. Beta-lactamase epidemiology and the utility of established and novel beta-lactamase inhibitors. **Drugs**, v. 9, p. 247-261, 2000.

PORTO, A L. F. **Influência da Fonte de Nitrogênio no Crescimento, na Produção de Ácido Clavulânico da Atividade Proteásica em *Streptomyces clavuligerus*** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). UFPE, 1994.

PRIDHAM, T. G. & GOTTLIEB, D. "The Utilization of Carbon Compounds by Some *Actinomycetales*: as na Aid for Species Determination", **Journal of Bacteriology**, v. 56, p. 107-114, 1948.

PRIDHAM, T. G., ANDERSON, P., FOLEY, C., LINDENFELSER, L. A., HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. " A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*". **Antibiotics Annual**, p. 947-953, 1957.

READING, C. & FARMER, T. The inhibition of β -lactamases from Gram-negative bacteria by clavulanic acid. **Biochemical Journal** 199, p 779-87, 1981.

RUSSEL, A. D. & CHOPRA, I Understanding Antibacterial Action and Resistance. Ellis Horwood, Chchester, UK, 1990.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbial Biotechnology** v. 20, p. 318-325, 1984

SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T. A.; Fehr, T. Novel Bioactive Compounds from Actinomycetes : a short review (1988 – 1992). **Review Microbiology**, 144.p. 633-642. 1993.

SHINICHI K. WATANABE; H. HERSKETH; A. ENSIGN, J. C; OCHI, K. Expression Analysis of the ssAg Gene Productor, Associated whit Sporulation and cell Division in *Streptomyces griseus* . **Microbiology**, v. 143, p. 1077-1086, 1997.

SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. Retrospective Evolution of International *Streptomyces* Project Toxonomic Criteria. In: **Actinomycetes: The Boundy Microorganisms**, University Park Press, Baltimore, p. 9-41. 1977.

STACKEBRANDT, E.; RAINE, F. A.; WARDRAINEY. Proposal for a new hieraichic classification system, Actinobacteria classis. Nov. Int. **Journal. Systematic. Bacterial.** 47, p.479-491, 1997.

SUTCLIFFE, J. A.; MUELLER, J. P.; UTT, E. A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Bacterial Pathogens. In: **Manual of Microbiology and Biotechnology**. 2^a ed. Eds: Ronald M. Atlas; Gerald Cohen; Charles L. Hershberger, Wei-shou Hu; David H. Sherman; Richard C. Wilson and J. H. David Wu. ASM Press. Washington, D. C., 62, p.759-788, 1999.

TOMMICH, P. K. Streptomyces cloning: Possible construction of Novel Compounds and Regulation of Antibiotic Biosynthetic Genes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 32, p. 1472-1476. 1988.

VINING, L. C. 1990. Functions of Secondary Metabolites. Annu Review. Microbiology 44, 395-427. In: **Secondary Metabolites: Their Function and Evolution**. Eds: John Wiley & Sons. Ciba Foundation, 1992. 318p.

WAKSMAN, S. A. , REILLY, H. C. Microbial antagonisms and antibiotic substances. Editions Comman on Wealt Fundation, Inengthem Canclyt. Ed., New York: inc., p. 556, 1945.

WILLIAMS, J. D., β -lactamases and β -lactamase inhibitor. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 12. p.S3-S7, University of London, Lodon, UK, 1999.

WILLIAMS, R. S. MICHAEL; L. D. VINEET; B. R. WOO; A. J. PRIESTLEY N. D. Anthacyclines, Ohio State University, Columbus, Ohio. C 20,p. 577-653, 1997.

YEUNG, M. Actinomyces: Surface Macromolecules and Bacteria-Host Interactions. In: **Gram-Positive Pathogenes**. Eds: Vicent A. Fichetti; Richard P. Novick; Joseph J. Ferretti; Daniel A. Portnoy; Julian I. Rood. ASM Press. Washington, D. C. 2000. 753 p.