

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DA *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br

Aline Dayse da Silva¹, Janete Magali de Araújo², Ivana Gláucia Barroso Cunha³

EVALUATION OF BIOTECHNOLOGICAL POTENCIAL OF ACTINOMYCETES FROM RHIZOSPHERE OF *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br

Endereços dos autores:

1. Aline Dayse da Silva. Faculdade Pernambucana de Saúde. E-mail: aline_dayyse@hotmail.com.
2. Janete Magali de Araújo. Universidade Federal de Pernambuco. E-mail: janetemagali@yahoo.com.br
3. Ivana Gláucia Barroso Cunha. Faculdade pernambucana de saúde. E-mail: glau_iv@yahoo.com.br

RESUMO

A pesquisa experimental teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico das actinobactérias isoladas da rizosfera da planta litorânea *Ipomoea pes-caprae*, identificando a atividade antimicrobiana, fazendo análise preliminar de composto químico e realizando o teste da produção de L-asparaginase, enzima utilizada no tratamento do câncer. Os testes antimicrobianos foram feitos através da técnica de bloco de gelose, a caracterização do composto químico por cromatografia em camada delgada, e o teste da produção de L.asparaginase foi feito pelo ensaio rápido em placa para produção dessa enzima. Os actinomicetos apresentaram maiores quantidades de halos de inibição para micro-organismos do grupo dos Gram-positivos. Chama-se atenção para *Staphylococcus aureus* com amplo perfil de resistência. A actinobactéria A94CZN (1)10⁻⁴ deu halo de inibição de 23 mm para esse micro-organismo e o grupo químico caracterizado nesse actinomiceto foi dos monoterpenos, que segundo a literatura, tem compostos com atividade anti-séptica. Quanto à produção de L-asparaginase, 85% das actinobactérias apresentaram produção dessa enzima antitumoral. Muitas pesquisas com

actinobactérias marinhas mostram ótimos resultados para a produção de antineoplásicos. Esses micro-organismos têm atividades biotecnológicas que podem proporcionar esperança no combate a cepas bacterianas resistentes e alternativas para tratamento do câncer.

Palavras-chave: Actinobactérias, Rizosfera, Marinhas, Antimicrobiano, Antitumoral.

ABSTRACT

The experimental research was to evaluate the biotechnological potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of coastal plant *Ipomoea pes-caprae*, identifying antimicrobial activity, doing preliminary analysis of chemical and performing the test production of L-asparaginase, an enzyme used in the treatment of cancer. Antimicrobial tests were done using the technique of agar block, characterization of the chemical compound by thin layer chromatography, and the test production L.asparaginase was done by rapid assay plate for production of this enzyme. The actinomycetes showed high amounts of inhibition zones for micro-organisms of the group of Gram-positive. Attention is drawn to the *Staphylococcus aureus* with broad resistance profile. The actinobacteria A94CZN (1) 10-4 gave inhibition zone of 23 mm for this micro-organism and chemical group characterized this actinomycete was the monoterpenes, which according to the literature, has compounds with antiseptic activity. As for producing L-asparaginase, 85% of actinobacteria production of this enzyme showed antitumor. Much research on marine actinobacteria show excellent results for the production of antineoplastic. These micro-organisms have biotechnology activities that can provide hope in fighting bacterial strains resistant and alternatives for cancer treatment.

Key- words: Actinomycetes, Rhizosphere, Marine, Antimicrobial, Antitumor.

INTRODUÇÃO

Nas plantas estão presentes populações de micro-organismos epífitas e endófitas, ambos no filoplano e na rizosfera¹. A rizosfera é a região do solo sujeita a influências de exudatos que promovem ou inibem a atividade microbiana. Do ponto de vista nutricional, o solo é um grande habitat para micro-organismos heterotróficos, principalmente nas imediações das raízes (rizosfera) que eles encontram os substratos que necessitam para sua proliferação². Também é o local onde ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas³. Muitas dessas associações são espécies-específicas, portanto, cada espécie de planta pode mostrar uma diversidade microbiana⁴.

A *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br, convolvulácea, é uma planta nativa das restingas de dunas arenosas da costa da África e da Ásia, e no Brasil são encontradas em toda costa litorânea, sendo conhecida popularmente como salsa-de-praia^{5,6}. Sua utilização caseira vem dos hábitos dos aborígenes da Austrália, que costumavam aquecer a folha e aplicá-las sobre furúnculos⁶.

O Brasil tem uma das maiores costas do mundo, com diversos ecossistemas e microhabitats. Apesar disso, pouco se conhece sobre a diversidade de actinobactérias nestas regiões. As pesquisas com produtos naturais marinhos no Brasil tiveram início na década de 1960, no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). No entanto, ainda são poucas as informações, documentadas em artigos científicos, sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos⁷.

A identificação e o sequenciamento do genoma de actinobactérias marinhas demonstraram a grande capacidade metabólica destes gêneros em codificar metabólitos secundários que são fontes ricas para produção de novas drogas⁸, com atividades antimicrobiana e anticancerígena⁹.

Os produtos naturais ciclo-celular específicos podem ser outro tipo de agente antineoplásico importante e eficiente, e que se refere a muitos fármacos usados na terapia clínica do câncer e que originalmente não são compostos sintéticos. Dentre alguns produtos naturais citotóxicos, usados clinicamente no tratamento de neoplasias, podemos citar a enzima asparaginase (L-asparagina amino hidrolase, Elspar), particularmente em tratamento de leucemia aguda infantil^{40,41}, isolada de várias bactérias incluindo os actinomicetos, que atua pela diminuição catabólica de asparagina

sérica. Nas células neoplásicas, isto provoca a inibição da síntese de proteínas, resultando no bloqueio da proliferação celular⁴².

Além disso, novos antibióticos provenientes de actinobactérias marinhas estão sendo descobertos e proporcionam esperanças para o combate às cepas bacterianas resistentes¹⁰. O problema da resistência a antibióticos é ainda mais complicada pelo aparecimento de cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas Multi-drogas Resistentes (MDR), isto inclui múltipla resistência aos aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas e da primeira, segunda e terceira geração de penicilinas e cefalosporinas¹¹. Além disso, nos últimos anos, novos agentes terapêuticos têm entrado na área clínica, infelizmente, com alguns efeitos secundários^{12,13} e este grave problema de saúde pública requer o desenvolvimento de novos medicamentos de forma mais eficaz, com menor impacto negativo contra o corpo e para o meio ambiente^{14,15}.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁶, o excesso de prescrição e o uso indevido de antibióticos levaram a resistência desses diversos patógenos. Hoje em dia, as novas cepas resistentes aparecem mais rapidamente, enquanto a taxa de descobertas de novos antibióticos diminuiu muito. Muitos cientistas se concentraram em buscar novos agentes antimicrobianos, principalmente de origem dos actinomicetos, por sua prolífera produção de antibióticos naturais¹⁷, por possuírem metabólitos secundários ativos e por terem estruturas químicas únicas¹⁸.

Os Actinomicetos ou actinobactérias são bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C (guanina + citosina). São conhecidos oito gêneros: *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Butyrivibrio*. Possuem aspectos morfológicos e de ciclo celular diferenciados dos demais organismos Gram-positivos. Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios¹⁹. São caracterizadas principalmente por sua morfologia filamentosa. Este grupo de bactérias constitui uma proporção considerável dos microorganismos do solo ($10^4 - 10^6$ esporos de actinomicetos por grama de solo), onde desempenham um papel fundamental na mineralização da matéria orgânica²⁰. Um gênero em destaque é o *Streptomyces*, de elevada ocorrência no solo, de fácil isolamento e de grande importância econômica, pois produz a maioria dos antibióticos utilizados na clínica médica, na agricultura e na veterinária, sendo que os de uso clínico representam cerca de 80% dos antibióticos em uso²¹.

A pesquisa de novos produtos que sejam eficazes contra as mais diversas doenças é um processo contínuo. A busca por novos metabólitos secundários, oriundos

da natureza, deveria ser feita em organismos que habitem nichos ecológicos distintos e ainda poucos explorados²². Nesse contexto, merecem destaque os micro-organismos da rizosfera que se destacam como promissores de moléculas bioativas²³.

Contudo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico das actinobactérias isoladas da rizosfera de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br, coletada na praia de Itamaracá, litoral norte de Pernambuco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e Isolamento

Foram coletadas duas amostras de rizosferas da *Ipomoea pes – caprae* (L.) R. Br da praia de Itamaracá – PE, em sacos plásticos estéreis. Até o procedimento de isolamento, as amostras foram mantidas sob refrigeração. Foram pesados 10 g de cada indivíduo (amostras), os quais, foram adicionados em dois Erlenmeyers de 250 mL contendo neles 90 mL de Solução Salina. As misturas foram agitadas nos Erlenmeyers em mesa agitadora de 150 rpm, durante 15 minutos, em seguida foram submetidas ao Banho - Maria de temperatura controlada em 50 °C por 10 minutos, ainda em agitação manual, esse procedimento tem como efeito liberar micro-organismos das partículas do solo²⁴. Esperou-se decantar por aproximadamente 5 minutos e foram iniciadas as diluições. Foram realizadas diluições seriadas das amostras dos Erlenmeyers para 4 tubos de ensaio, também contendo 9 mL de solução salina até a 10⁻⁵ diluição. Logo após, 0,2 mL das diluições 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵, foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 mL dos meios de cultura: Extrato de Malte Ágar (ISP₂) constituído por: extrato de malte 8,0 g, glicose 20,0 g, extrato de levedura 4,0 g, água destilada 1.000 mL e meio Czapeck Dox Ágar (CZ) constituído por: sacarose 30,0 g, nitrato de Sódio 3,0 g, fosfato dipotássio 1,0 g, sulfato de magnésio 0,5 g, cloreto de potássio 0,5 g, sulfato ferroso 0,01 g, água destilada 1.000 mL, ágar 15,0 g.

Para cada meio de cultura foram utilizadas 6 placas de Petri, 3 delas foram plaqueadas com o meio de cultura feito com água doce e as outras 3 com o meio de cultura feito com água salina a 0,9% para as duas amostras (indivíduos), totalizando 24 placas. Após as inoculações, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante sete dias³⁵. (Esquema do isolamento na Figura-1)

Análise química do solo

Com uma amostra do solo da rizosfera de onde foram isoladas as actinobactérias, foi feita a análise de seus compostos químicos no Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco-IPA.

Técnica para a avaliação da atividade antimicrobiana

Micro-organismos teste

Os micro-organismos teste utilizados para a atividade antimicrobiana são cepas contidas no Laboratório da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Foram eles: *Candida albicans* (levedura) UFPEDA 1007, *Bacillus subtilis* (Gram-positivo) UFPEDA 86 e ATCC 6633, *Escherichia coli* (Gram-negativo) UFPEDA 224 e ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e ATCC 6538 e isolado clínico do Hospital das Clínicas-PE de *Staphylococcus aureus* identificado como cepa 705 UFPEDA com amplo perfil de resistência.

Cultivos dos micro-organismos teste

Foram preparadas suspensões microbianas a partir das culturas puras dos micro-organismos teste. Da suspensão obtida, retirou-se 0,1 mL para semeio com swabs em placas de Petri contendo os meios: Müller Hinton Ágar para as bactérias e Ágar Saboraand Dextrose para *Candida albicans*. A levedura foi incubada na estufa de fungos a 30° C por 24 horas e as bactérias em estufa bacteriológica a 37°C, também por 24 horas.

Cultivos de actinobactérias em forma de “tapete”

As actinobactérias foram semeadas em estrias fechadas em toda a placa no meio de cultura que cresceram melhor e com micélios aéreos, o CZ-Salino. Foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por sete dias.

Seleção primária em meio de cultura

A atividade antimicrobiana das actinobactérias isoladas da rizosfera foi avaliada quantitativamente, em meio de cultura sólido, através da técnica do Bloco de Gelose, que selecionou as actinobactérias com maiores atividades antimicrobianas.

Técnica do teste de bloco de gelose

Nessa técnica foram preparadas suspensões de cada micro-organismos teste de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Dessas suspensões foram retirados 100 µL (0,1 mL) que foram semeados em estrias fechadas em toda superfície de placas contendo meio de cultura Mueller-Hinton Ágar para as bactérias e Saboraund Dextrose Ágar para a levedura, até formar um “tapete”. Foram feitos blocos de gelose circulares de 6 mm de diâmetro com auxílio de um furador especializado e transferidos para placas de Petri com os tapetes de micro-organismos teste. As placas foram incubadas em estufas específicas, e mantidas por 24 horas para bactérias e 48 horas para a levedura. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor de cada bloco²⁶, que foram medidos em mm com uma régua. (Esquema do bloco de gelose na figura-2)

IDENTIFICAÇÃO DAS ACTINOACTÉRIAS

Para identificar as actinobactérias utilizou-se a técnica de microcultivo. Nessa técnica o micro-organismo foi cultivado em meio de cultura ISP-2, foram feitas estrias e nelas inseridas três lamínulas com inclinação de 45° em cada estria e a placa foi incubada a 30°C por 21 dias²⁷. Essa técnica tem como objetivo, fazer com que as estruturas morfológicas através dos micélios cresçam sobre as lamínulas, para que possam ser observadas ao microscópio. A cada sete dias, uma lamínula foi retirada para observação da formação da cadeia de esporos - esporóforos - ao microscópio óptico em objetiva de 40x. Três actinomicetos foram identificados, dois deles correspondem ao gênero *Streptomyces sp.* e um do gênero *Nocardia sp.* O gênero *Streptomyces sp.* apresenta cadeias de esporos em forma espiralada, o gênero *Nocardia sp.* tem unidades cocoides ou em forma de bastonetes em seus filamentos.

FERMENTAÇÃO DA ACTINOBACTÉRIA

Foi feita a fermentação da actinobactéria A94CZN(1)10⁻⁴ pertencente ao gênero *Nocardia sp.* que teve a melhor atividade antimicrobiana contra o *S.aureus* com amplo perfil de resistência.

METODOLOGIA DA FERMENTAÇÃO

A fermentação realizada foi do tipo sólida, em que foram feitos tapetes da actinobactéria no seu meio de melhor crescimento, o Czapeck Dox Ágar (CZ) com água salgada a 0,9% de NaCl, e depois incubados em B.O.D. (Biological Oxygen Demand) durante sete dias. Dos tapetes, foram retirados 20 plugs do actinomiceto e com esses plugs foram feitos pré-inóculos em Erlenmeyers de 250 mL contendo neles 100 mL de meio de cultura líquido ISP₂ também com água salgada, esses inóculos foram submetidos à agitação de 120 rpm por 48 horas. Depois de passado esse período de rotação, em Erlenmayer de 500 mL contendo o meio sólido de arroz (90g de arroz parbolizado e 90 mL de água destilada) autoclavados por 40 minutos, foi adicionado o pré-inóculo (10mL) e incubados em B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 30°C por 21 dias³⁹.

TESTES PARA ANÁLISE PRELIMINAR DE COMPOSTOS QUÍMICOS DA ACTINOBACTÉRIA FERMENTADA

Os testes preliminares para identificação dos compostos químicos da actinobactéria A94CZN(1)10⁻⁴ pertencente ao gênero *Nocardia sp.* foram realizados em cromatografia de camada delgada (CCD) no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Pernambuco. (Tabela-3)

METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DA ENZIMA ANTITUMORAL L-ASPARAGINASE PRODUZIDA POR MICRO-ORGANISMOS

O experimento foi realizado com o teste rápido em placa, para rastreio de L-asparaginase – in vitro - onde foi preparado o meio M-9 modificado produzido com g/L de NaHPO₄.2H₂O (6.0); KH₂PO₄ (3.0); NaCl (0.5); CaCl₂.2H₂O (0.014); MgSO₄.7H₂O (0.5); Glicose (2.0); L-asparagina (5.0); Vermelho fenol (0.09) e ágar (17g/L) . Depois de vertido o meio de cultura nas placas, foi feita uma estria com as actinobactérias e as placas foram incubadas em estufa B.O.D. (Biological Oxygen Demand) durante sete dias. No meio de cultura foi utilizado o corante vermelho de fenol como indicador da mudança de pH, ocasionada pela clivagem da L-asparagina em ácido aspártico, de laranja para rosa⁴³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ISOLAMENTO DE ACTINOBATÉRIAS

Da rizosfera da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br, nativa do litoral norte de Pernambuco, da praia de Itamaracá, foi possível quantificar 212 unidades formadoras de colônia provenientes das diluições 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ (Tabela-1) . Dessas 212 UFCs, 81 foram isoladas (Figura-3).

Vários actinomicetos já foram isolados a partir de amostras marinhas^{28,29,30,31}, dentre elas, um total de 98 actinomicetos foram encontrados em sedimentos marinhos na Baía de Bengala, Índia³² e outros pesquisadores isolaram 21 actinomicetos de amostras de solo das margens dos mares de Royapuram, Muttukadu e Mahabalipuram, Ásia³³. Em outro estudo realizado, foram isoladas um total de 54 actinobactérias marinhas a partir de esponjas marinhas coletadas em águas rasas do Mar da China Meridional³⁴. Esses números indicam que o ambiente marinho é um rico habitat de actinomicetos diversificados e com possíveis potenciais biotecnológicos.

Com os resultados de números de unidades formadoras de colônias nesse isolamento, pode-se observar que o melhor meio de cultura para as actinobactérias da rizosfera da planta *Ipomoea pes-caprae*, é o Czapeck Dox Ágar (CZ) feito com água salina. Em pesquisa de actinobactérias em região entre- marés da Ilha do Mel, Paraná-

Brasil, foram isolados 116 actinomicetos através desse mesmo meio de cultura com água doce e salgada. Esse meio de cultura é bastante rico em sais e deve se aproximar mais do ambiente natural em que eles vivem³⁵.

ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

Os resultados obtidos da análise em cmolc/dm³ foram: pH (H₂O): 7.60, Cálcio: 1.15, Magnésio: 0.90, Sódio: 1.00, Potássio: 0.26, Alumínio: 0,00, Hidrogênio: 7.83.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliar a atividade antimicrobiana, foi escolhido pelo menos um representante de grupos de extrema importância clínica, causadores comuns de infecções, para ser micro-organismo teste, dos Gram-positivos usou-se o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e outra cepa com amplo perfil de resistência isolada do Hospital das Clínicas – PE. No teste padrão de sensibilidade para esse micro-organismo problema, foram utilizadas três drogas padronizadas para testar atividade contra *S. aureus* resistente⁴⁹, foram elas: vancomicina que formou halo total de 19 mm, norfloxacino que apresentou halo parcial de 32mm e oxacilina que apresentou um poder mínimo de inibição da bactéria, com uma área de 12mm.

Foram isolados 81 actinomicetos e com 29 desses micro-organismos, foi realizado o teste de atividade antimicrobiana. Das 29 actinobactérias testadas 62% (18/29) apresentaram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste na técnica do bloco de gelose. Apresentaram atividade de 27,5% (8/18) para o *S.aureus* (02) ATCC 6538, 24,1% (7/18) para *S. aureus* (705) cepa resistente, 62% (18/29) para o *Bacillus subtilis* ATCC 6633, e apenas 3,44% (1/18) apresentaram atividade para *Candida albicans* UFPEDA 1007 e mais 3,44% (1/18) para *Escherichia coli* ATCC 25922. (Tabela-2)

Dentre esses resultados, duas actinobactérias a A2CZS(1)10⁻⁵ e 93CZN(1)10⁻⁷ apresentaram halo de inibição parcial, uma para o *S.aureus* (02) ATCC 6538 e outra para *S. aureus* (705) cepa resistente, isso pode indicar que, os antibióticos produzidos por eles podem ser bacteriostáticos. Em estudo realizado com actinomicetos isolados de línquens, também de ambiente marinho, no qual trabalharam com 337 isolados de actinobactérias, encontraram atividade antimicrobiana somente em 27% deles, sendo

que a atividade mais frequentemente encontrada foi contra bactérias Gram-positivas (23%), contra *Candida albicans* (10,7%) e a menor atividade foi contra bactérias Gram-negativas (6,5%)³⁶. Em decorrência da natureza complexa da parede celular das bactérias Gram-negativas, essas são mais resistentes à ação de antibióticos, que não são capazes de atravessar efetivamente a barreira lipídica da camada externa dessas bactérias. Trabalhos com actinobactérias com atividade frente a bactérias Gram-positivas tem sido frequentemente publicados, no entanto com atividade contra Gram-negativas e fungos, o número de publicações tem sido inferior³⁷.

Os actinomicetos isolados da rizosfera da *Ipomoea pes-caprae* que foram testados para atividade antimicrobiana, apresentaram maiores quantidades de halos significantes (maiores que 15mm) para os micro-organismos do grupo dos Gram-positivos. Chama-se atenção para o *S.aureus* com amplo perfil de resistência. A actinobactéria A94CZN(1)10⁻⁴ do gênero *Nocardia sp.* deu um halo de inibição de 23mm para esse micro-organismo (Figura-4), podendo evidenciar que o antibiótico produzido por ele pode ser uma forte arma contra as cepas resistentes a antibióticos que já estão no mercado e que não são mais eficazes para combater infecções causadas por bactérias resistentes.

Em estudo de um *Streptomyces* (BT-408) isolado de sedimentos da Baía de Bengala em oceano da Índia, para avaliação de sua atividade contra *S. aureus* resistente a meticilina, constatou que essa actinobactéria conseguiu área de inibição de 20mm³⁸ e na pesquisa realizada com as actinobactérias isoladas da região entre-marés da ilha do mel, PR, Brasil, das 116 actinobacterias isoladas 79 delas possuíam atividade antimicrobiana e a maioria dos isolados de actinobactérias apresentou atividade contra bactérias patogênicas Gram-positivas. Destas, destaca-se o isolado AD 3B 17, que apresentou atividade contra *S. aureus* (ATCC 25923) com perfil de resistência³⁵. Esses resultados corroboram para enfatizarmos que o ambiente marinho apresenta uma ampla diversidade de actinobactérias e com importantes atividades antimicrobianas. Podem ser usadas biotecnologicamente como antibióticos, podendo resolver muitas infecções causadas por bactérias super resistentes, o que hoje a cada dia crescem e assustam a saúde pública mundialmente.

IDENTIFICAÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS

Três actinomicetos foram identificados, dois deles correspondem ao gênero *Streptomyces sp.* e um do gênero *Nocardia sp.* O gênero *Streptomyces sp.* apresenta cadeias de esporos em forma espiralada, o gênero *Nocardia sp.* tem unidades cocoides ou em forma de bastonetes em seus filamentos.

ANÁLISE QUÍMICA PRELIMINAR DE COMPOSTO QUÍMICO DA ACTINOBACTÉRIA A94CZN(1)10⁻⁴

Nos testes cromatográficos para identificação de metabólitos químicos com possíveis atividades antibióticas do actinomiceto de melhor resultado antimicrobiano, foi encontrado o grupo dos monoterpenos (Figura-5), que são compostos derivados dos terpenóides que constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, e esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno 9. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos. O monoterpenos podem, ainda, ser divididos em um subgrupo acíclico (linalol 11, geraniol 12), que inibem o crescimento de várias bactérias e fungos, devido a compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis, tendo um alto poder anti-séptico⁴⁷. No estudo de uma actinobactéria do gênero *Streptomyces sp.* também de ambiente marinho, como nova fonte de substância bioativa e com atividade antimicrobiana, também foi identificado o grupo dos terpenos, incluídos os compostos monoterpênicos⁴⁸.

RESULTADO E DISCUSSÃO DO TESTE PARA A ENZIMA L-ASPARAGINASE

O teste foi realizado com 27 actinobactérias e 85% (23/27) apresentaram produção da enzima L-asparaginase. Resultando positivo a mudança da cor do meio M-9 de laranja para rosa (Figura-6), por completo no meio ou nas margens do micro-organismo crescido, apenas 4 dos 23 positivos tiveram mudança de coloração nas margens do micro-organismo (Figura-7).

Em análise de produção da enzima L-asparaginase por actinomicetos isolados de 16 amostras de rizosferas de planta medicinal tailandesa, de 445 isolados, 30 deles apresentaram produção dessa enzima⁴⁴. Em outro estudo que verificou a produção de enzima L-asparaginase de diferentes estirpes de *Escherichia coli* isoladas de águas residuais, uma das bactérias que mais produzem essa enzima, do total de 35 isolados, apenas 10 (28%) delas apresentaram produção de *L. asparaginase*⁴⁵ e em outra pesquisa foram testados 10 isolados marinhos indianos de actinobactérias, apenas três deles apresentaram produção da enzima⁴⁶.

CONCLUSÕES

- Foram isoladas 81 amostras de actinobactérias que cresceram em meios de cultura preparados tanto com água doce, quanto com água salgada;
- 29 actinobactérias foram testadas para avaliar os seus potenciais antimicrobianos, em 18 delas foi averiguada a atividade antimicrobiana para pelo menos um micro-organismo teste.
- Os resultados evidenciaram que, dos 29 testados, 62% (18/29) apresentaram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste. Apresentaram atividade de 27,5% (8/18) para o *S.aureus* (02) ATCC 6538, 24,1% (7/18) para *S. aureus* (705) cepa resistente, 62% (18/29) para o *Bacillus subtilis* ATCC 6633, e apenas 3,44% (1/18) apresentaram atividade para *Candida albicans* UFPEDA 1007 e mais 3,44%(1/18) para *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Na análise de produção de enzima antitumoral L-asparaginase, 27 isolados foram testados e 23 (85%) deles possuem o poder de produção dessa enzima.
- A partir de análises microscópicas e macroscópicas foram identificados gêneros de actinobactérias *Streptomyces sp.* e *Nocardia sp.*
- Na análise de compostos químicos através de cromatografia de camada delgada da actinobactéria com melhor resultado, a A94CZN(1)10⁻⁴ do gênero *Nocardia sp.* foram identificados monoterpenos, que segundo a literatura, possuem compostos com atividade anti-séptica.
- Dentre os resultados a actinobactéria que representou o melhor resultado antimicrobiano e também possuem ótima produção de L-asparaginase foi a A94CZN(1)10⁻⁴ que conseguiu inibir com um halo de 23mm o *S.aureus* resistente isolado do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Curl, E. A. The rhizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. *Planta disease*, v.66, p. 624-630, 1982.
2. Cattelan, A.J.; Vidor, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. *Revista de Ciência do Solo*. Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-132, 1990.
3. Foster, R. C. The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 21, p. 211-234, 1986. Uren, N. C. Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into the Rhizosphere by Soil-Growth Plants. In: Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-plant interface*. Second Edition CRC Press. p. 472, 2007.
4. Hawkes, C. V.; Deangelis, K. M.; Firestone, M. K. Root Interactions with Soil Microbial Communities and Process In: Cardon, Z. G.; Whitbeck, J. L. *The Rhizosphere: an ecological perspective*. Elsevier/Academic Press, p. 232, 2007. Jeffries, P. In: Bull, A. T. *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Washington: ASM Press, p. 204-210, 2004.
5. Lorenzi, H.; Matos, F.J. A. *Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas*, 2ª edição, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.544 , 2008.
6. Wasuwat, S. Extract of *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) antagonistic to histamine and jelly-fish poison. *Nature 225*: 758-759, 1970.
7. Pinto, A. C.; Silva, D. H.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. Produtos Naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, Vol.25, p. 45, 61, 2002.
8. Udworthy, D. W.; Zeigler, L.; Asolkar, R. N.; Singan, V.; Lapidus, A.; Fenical, W. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. June 19, 2007. *PNAS* vol. 104 ,no.25. Site acessado em 29 de março de 2009.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700962104.
9. Prudhome, J.; Mcdaniel, E.; Bertani, S.; Fenical, W. Marine Actinomycetes: A New Source of Compounds against the Human Malaria Parasite. *PLoS One*. Open Access Freely available online. Vol 3. Issue 6, e 2335.
[doi:10.1371/journal.pone.0002335](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002335), 2008.

10. Zhao, X.; Jiao, W.; Jiang, B.; Yuan, W.; Yang, T.; Hao, S. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. *World Journal Microbiology Biotechnology* Vol.25. p. 859–866. DOI 10.1007/s11274-009-9964-y. Springer Science+Business Media B.V, 2009.
11. Gould IM. The Epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(1):S2-9.
12. Levy, S.B.; Marshall, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*. 2004; 10(12):S122-9.
13. Wenzel, R.P. The antibiotic pipeline-challenges, cost, and values. *N Engl J Med*. 2004; 351:523-6.
14. Urban, C.; Segal-Mauer, S.; Rahal, JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis*.2003; 36:1268-74.
15. Paterson, D.L.; Ko, W.C.; Von Gottberg, A.; Mohapatra, S.; Casellas, J.M.; Goossens, H.; et. al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med*. 2004; 140:26-32.
16. Who. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva: WHO; 2001.
17. Oskay, M.; Tamer, AU.; Azeri, C.; Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African J. Biotechnol*. 2004; 3(9):441-6.
18. Prashith, K.; Shobha, K.S.; Onkarappa, R.; Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J Pharmacy Res*. 2010; 3(2):250-6.
19. Lacaz, C. S. ; Porto, E. ; Martins, J. E. C. ; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.
20. Claessen, D. et al. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 14, n. 7, p. 313-319, 2006.
21. Chater, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*, London, v. 361, p. 761-798, 2006. Fguira, L. F. B.; Fotso, S.; Mehdi, R. B. A.; Mellouli, L.; Laatsch, H. Purification and structure elucidation of antifungal and

- antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US 80. Research in Microbiology, Paris, v. 156, p. 341-347, 2005.
22. Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A. K.; Krohn, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycological Research, 106: 996-1004, 2002.
 23. Banga, J.; Praveen, V.; Tripathi, C.K.M. & Bihari, V.; Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete. *Med. Chem. Res.*;17:425-436, 2008.
 24. Kolm, H. E; Siqueira, A. Variação de bactérias em decorrência da dragagem do canal de acesso ao Porto de Paranaguá, Paraná. Pontal do Sul: CEM. In: Relatório final das atividades de pesquisa do laboratório de microbiologia marinha do Centro de Estudo do Mar da UFPR, 1999.
 25. Anderson, A. S.; Wellington, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.51, p. 797-814, 2001.
 26. Ishicawa, T.; Ishicura, T.; Ozaki, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the Agar piece method and prototroph method. *Folia Microbiologica*. 31: 163-167, 2001.
 27. Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 16, p. 313-340, 1966.
 28. Sujatha, P.; Bapi, R. K.; Ramana, T. Studies on a new marine Streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* 160:119–126, 2005.
 29. Maldonado, L. A.; Fenical, W.; Jensen, P.R.; Kauffman, C.A.; Mincer, T. J.; Wrad, A.C.; Bull, A.T. *Goodfellowia* *Salinispora arenicolagen. nov.*, and *Salinispora tropica nov.*, obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1759–1766, 2005.
 30. Fenical, W.; Jensen, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol* 2:666–673, 2006.
 31. Ramesh, S.; Jayaprakashvel, M.; Mathivanan, N. Microbial status in seawater and coastal sediments during pre- and post-tsunami periods in the Bay of Bengal, India. *Mar Ecol* (2006) 27:198–203. Ramesh, S.; Rajesh, M.; Mathivanan, N. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine

- Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess Biosyst Eng.* doi: 10.1007/s00449-009-0305-1. (2009).
32. Subramani, R.; Narayanasamy, M.; Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J Microbiol Biotechnol* 25:2103–2111, DOI 10.1007/s11274-009-0113-4, 2009.
33. Valli, S.; Suvathi Sugasini, S.; Aysha, O.S.; Nirmala, P.; Vinoth Kumar, P.; Reena, A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 469-473, 2012.
34. Jiang, S.; Sun, W.; Chen, M.; Dai, S.; Zhang, L.; Liu, Y.; Lee, K. J.; Li, X. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. Springer Science. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol 92. p. 405–416, 2007.
35. Azuma, M.V.P, Actinobaterias com potencial biotecnológico isoladas da Região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. 2011.
<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/25760/MESTRADO%20COMPLETO%20FINAL.pdf?sequence=1>
36. González, I.; Ayso-sacido, A.; Anderson, A.; Genilloud, O.; Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 54, p. 401–415, 2005.
37. Guimaraes, D. O.; Momesso, L. da S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
38. Sujatha, P.; Bapi, K.V.V.S.N.; Ramana, R. T.; Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research* 160 119—126, 2005.
39. Pupo, M. T. *et al.* Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In Carlton A. Taft. (Org). *Morden Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Kerala: Research Signpost, 51-78, 2006.
40. Machado, A. E. D.; *Quim. Nova* 2000, 23, 237.
41. Chabner, B. A.; Calabresi, P. Em *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949, 1995.
42. Jäger, E; Jäger, D.; Knuth, A.; *Curr. Opin. Immunol.* 14, 178 2002.

43. Gulati, R.; Saxena, R.K.; Gupta, R. A Rapid Plate Assay for Screening L-asparaginase Producing Micro-organisms, *Letters in Applied Microbiology*. 24,23-26.1997.
44. Sutthinan, K.; Akira Y.; Saisamorn L.; L- asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *International journal of integrative biology*, ISSN 0973-8363, 6 (1):22, 2009.
45. Richa Jain, K.U. Zaidi, Yogita Verma, Pooja Saxena; L-Asparaginase: A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Molecular Biotechnology Laboratory, Centre for Scientific Research & Development, Bhopal-462037, 2010.*
46. N, Saleem Basha, R, Rekha, M, Komala and S Ruby; Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme Lasparaginase from Marine Actinomycetes by Solidstate and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, August 2009; 8 (4): 353-360. Available online at <http://www.tjpr.org>.
47. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; *Farmacognosia, da Planta ao Medicamento*. 6ª edição. P. 469, 488. 2010.
48. Dharmaraj, S. Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. DOI 10.1007/s11274-010-0415-6, *World J Microbiol Biotechnol* (2010) 26:2123–2139.
49. Resolução M2-A8, vol. 23. Nº 1. ANVISA. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_disco_difusao.pdf

ANEXO

Figura 1: Esquema de como foi feito o isolamento das actinobactérias com as amostras de solo (rizosfera).

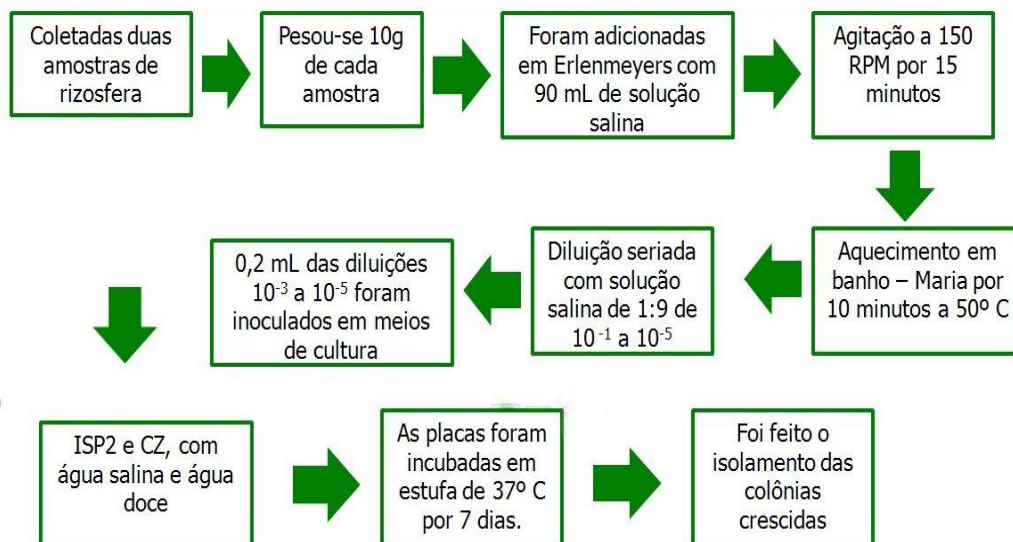


Figura 2: Esquema de como foi realizado o teste do bloco de gelose com os “tapetes” feitos com as actinobactérias e as suspensões com os micro-organismos teste.

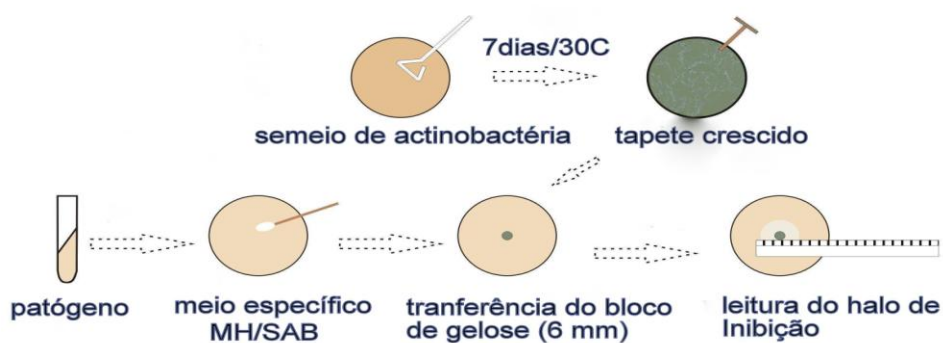


Tabela 1- Números de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) por mL, meios de cultura, diluições e indivíduos.

Nº de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) por placa			
Meio de cultura	Diluição	Indivíduo 1	Indivíduo 2
ISP ₂ -salino	10 ⁻³	3	13
ISP ₂ -salino	10 ⁻⁴	4	12
ISP ₂	10 ⁻⁵	3	0
ISP ₂ -salino	10 ⁻⁵	14	5
CZ-salino	10 ⁻⁵	11	5
CZ-salino	10 ⁻⁴	20	2
CZ	10 ⁻⁴	22	5
CZ	10 ⁻³	23	18
CZ	10 ⁻⁵	17	6
CZ-salino	10 ⁻³	1	28
Subtotal:		118	94
Total: 212			

Figura-3: placa do isolamento. Meio: Czapeck Dox Ágar – salino, amostra 2 e diluição 10⁻³.



Tabela 2: Média dos halos de inibição em mm para cada micro-organismos teste. DPR: Desvio padrão relativo. S.aureus*: cepa resistente a antibióticos.

Actinobactérias	Halos de inibição em mm do Teste Antimicrobiano									
	<i>S.aureus</i> (02)	DPR	<i>S.aureus*</i> (705)	DPR	<i>B.subtilis</i> (86)	DPR	<i>E.coli</i> (224)	DPR	<i>C.albicans</i> (1007)	DPR
A31CZN(2)10 ⁻³	14	0.0	0.0	0.0	16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A34CZN(2)10 ⁻³	11,66	0.0	0.0	0.0	13,66	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A63CZN(2)10 ⁻³	12,66	0.0	0.0	0.0	18,33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A94CZN(1)10 ⁻⁴	20,66	0.1	23,66	0.1	26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

A2CZS(1)10 ⁻⁵	23,33	0.4	13,66	0.0	23,66	0.1	0.0	0.0	21,66	0.2
A93CZN(1)10 ⁻⁵	14	0.1	15,66	0.0	29	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
A50CZS(1)10 ⁻⁴	20,66	0.1	15,33	0.1	18	0.1	15,66	0.1	0.0	0.0
A37CZN(2)10 ⁻³	17	0.1	15,66	0.0	18,33	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
A55CZS(2)10 ⁻³	0.0	0.0	11,33	0.0	11,33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A5CZS(1)10 ⁻⁵	0.0	0.0	13	0.1	28,66	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
A65CZS(2)10 ⁻³	0.0	0.0	0.0	0.0	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A122CZN(1)10 ⁻⁴	0.0	0.0	0.0	0.0	17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A202CZS(2)10 ⁻⁵	0.0	0.0	0.0	0.0	20,33	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
A120CZN(2)10 ⁻⁴	0.0	0.0	0.0	0.0	28	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
A208ISP ₂ -S(2)10 ⁻⁵	0.0	0.0	0.0	0.0	13,66	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
A119CZN(1)10 ⁻⁴	0.0	0.0	0.0	0.0	18,33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A180ISP ₂ -S (1)10 ⁻⁵	0.0	0.0	0.0	0.0	28,33	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
A101CZN(1)10 ⁻⁴	0.0	0.0	0.0	0.0	19	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0

Figura-4: Halo de inibição formado pela actinobactéria A94CZN(1)10⁻⁴ para *S.aureus* (705) resistente.

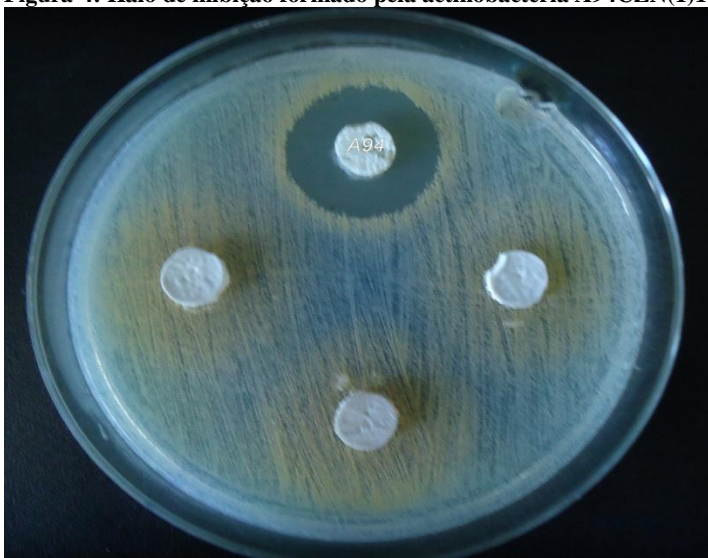


Tabela-3: Testes cromatográficos realizados para a análise preliminar de compostos químicos da actinobactéria A94CZN(1)10-4.

Identificação	Padrão	Eluente	Revelador	Resultado
Triterpenos e esteróides	β - citosterol	9:10 – de tolueno e acetato de etila	Lieberman	NEGATIVO
Monoterpenos e sesquiterpenos	Timol	97:3 – de tolueno e acetato de etila	1 ^o - H ₂ SO ₄ a 5% 2 ^o - Vanelina sulfúrica	POSITIVO
Alcalóides	Pilocarpina	100:11: 11:27 – de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água	Dragfort	NEGATIVO
Cumarina, flavonóides, fenilpropanóides e derivados linâmicos	Rutina	100:11: 11:27 – de acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água	NEU (Reagentes de produtos naturais) com adição de PEG (Polietilenoglicol) e Revelador para polifenóis geral: FeCl ₃ (cloreto férrico)	NEGATIVO

Figura-5: Placa de cromatografia com verificação de monoterpenos no extrato "A" da actinobactéria A94CZN(1)10⁴.

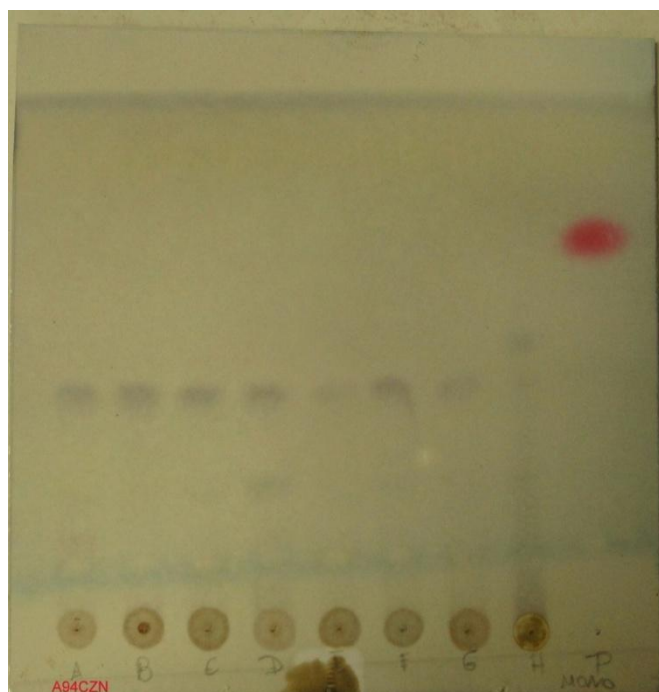


Figura-6: Resultado positivo para produção de L-asparaginase, meio de cultura cor rosa. Meio de cultura cor laranja, resultado negativo.

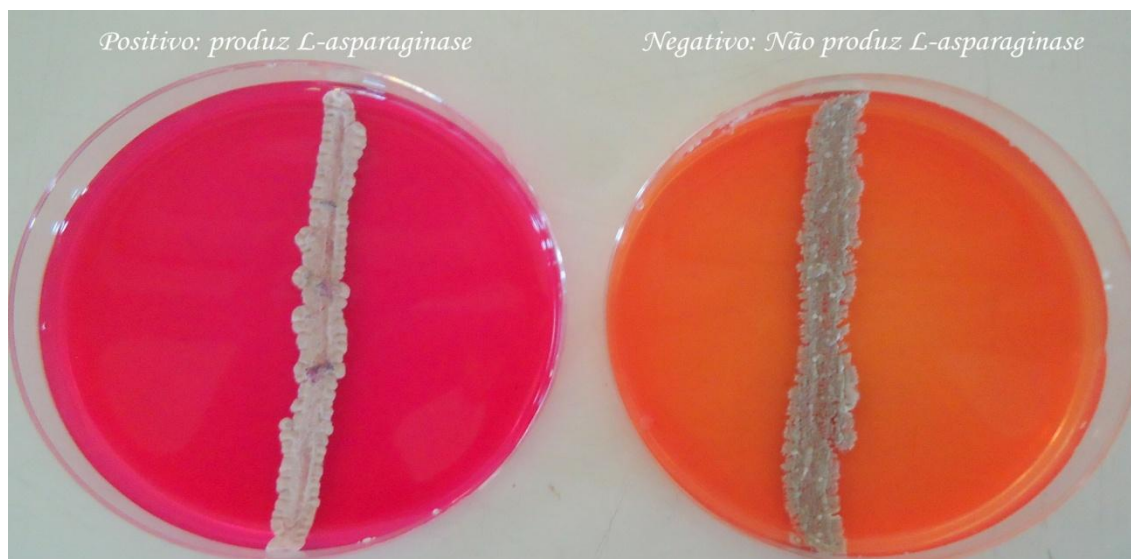


Figura-7: Micro-organismo com produção parcial da enzima L-asparaginase. Mudança de coloração apenas nas margens da actinobactéria crescida.

