

JÉSSICA THANDARA GOSSE

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE EXTRATOS
PROVENIENTES DA MICROBIOTA ASSOCIADA A INSETOS
NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE
INFECÇÕES HOSPITALARES”**

CAMPINAS

2013

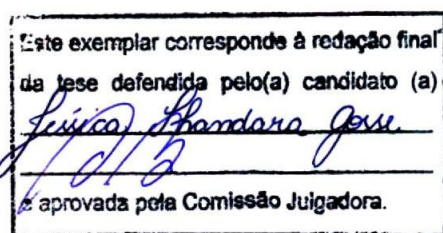
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE BIOLOGIA

JÉSSICA THANDARA GOSSE

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE EXTRATOS PROVENIENTES
DA MICROBIOTA ASSOCIADA A INSETOS NO CONTROLE DE
MICRORGANISMOS CAUSADORES DE INFECÇÕES
HOSPITALARES”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G695a Gosse, Jéssica Thandara, 1988-
Avaliação do potencial de extratos provenientes da microbiota associada a insetos no controle de microrganismos causadores de infecções hospitalares / Jéssica Thandara Gosse. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Agentes antiinfecciosos. 2. Infecção hospitalar. 3. Microorganismos patogênicos. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of potential of insect-associated bacterial extracts against nosocomial infections

Palavras-chave em Inglês:

Anti-infective agents Hospital
infection Pathogenic
microorganisms

Área de concentração: Genética de Microrganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]
Vera Lucia Garcia Rehder Sergio
de Mendonça

Data da defesa: 12-04-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

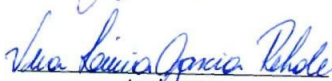
Campinas, 12 de abril de 2013

BANCA EXAMINADORA

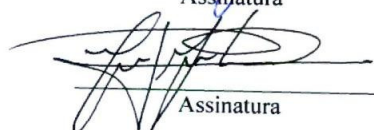
Prof. Dr. Marcelo Brocchi (orientador)


Assinatura

Dra. Vera Lucia Garcia Rehder


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio De Mendonça


Assinatura

Dra. Fabina Fantinatti Garboggini

Assinatura

Prof. Dr. Alvicler Magalhaes

Assinatura

"O sentido disso tudo é que não há sentido em tentar enlouquecer para impedir-se de ficar louco."

Douglas Adams

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Clarice, que sempre me apoiou e acreditou em mim, meu amor incondicional pelos enormes sacrifícios feitos para que eu pudesse estar aqui.

À minha família: Vó Neuza, Márcia, Bel, Tia Ivone e Joãozinho, Madrinha Dolores e Padrinho Zé Peroba (*in memorian*), Márcia, Samuca e Júlia, que sempre me apoiaram e estiveram comigo nas minhas jornadas.

Andrey, que me dá forças e alegrias, além de seu companheirismo e compreensão. Te amo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Brocchi, por ter me dado a oportunidade maravilhosa de realizar este trabalho e por ter me acolhido em sua equipe.

Aos companheiros de laboratório: Tamires, Cati, Luzinha, Bruna, Camila, Gui, Marcelinha, Diego, Meire, Marcos, Dri, minhas ICs Li e Carol e muitos outros, obrigada pelos bons momentos, pela ajuda dentro e fora do laboratório e por terem deixado tudo muito mais divertido.

Aos Professores Fernando Luis Cònsoli, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP/Piracicaba e Luiz Alberto Beraldo de Moraes, além de suas respectivas equipes, pelo auxílio prestado, e ao Projeto Biota FAPESP, pois este trabalho não poderia ter existido sem esta colaboração.

À CAPES e ao CNPq, pela concessão de bolsa.

Aos amigos queridos: Jaque(s) e pessoal do Herbert de Souza, Gisele Franchi, IBeanos, pelos bons momentos da minha primeira graduação, IFCHanos, que me acolheram e me ajudaram muito nessa segunda graduação, Família Top T., pelas boas risadas, e tantos outros que fizeram meus dias mais felizes.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO.....	1
1. Panorama da resistência antimicrobiana	1
2. Principais mecanismos de resistência aos antibióticos.....	3
2.1 Bombas de efluxo.....	4
2.2 Variações de permeabilidade da parede e/ou membrana bacteriana	5
2.3 Biotransformações.....	6
2.4 Modificação do sítio alvo	9
2.4.1 Alteração na estrutura de peptidoglicanos	10
2.4.2 Interferência na transcrição ou na síntese protéica.....	11
2.4.3 Interferência na síntese de DNA	11
3. Alternativas para o combate aos microrganismos resistentes.....	12
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
1. Microrganismos para análise	16
1.1. Seleção de linhagens bacterianas e análise de resistência	16
1.2 Teste de susceptibilidade ao metanol	17
2. Produção de extratos	18
2.1 Escolha das cepas bacterianas associadas a insetos	18
2.2 Preparação dos extratos orgânicos	19
2.3 Preparação das fases proteicas (aquosas)	21
3. Testes de susceptibilidade	22
3.1 Testes de disco-difusão.....	22
3.2 Testes de microdiluição.....	23
4. Análise, fracionamento dos extratos, identificação e provável elucidação	24
4.1 Cromatografia em Camada Delgada - CCD	24
4.1.2 Bioautografia dos extratos	24

4.3 Fracionamento dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada - CCD	25
4.4 Fracionamento em coluna cromatográfica.....	25
4.5 Espectrometria de massas	25
5. Teste de susceptibilidade à citrinina comercial	26
RESULTADOS	27
1. Triagem de extratos com ação antimicrobiana	27
1.1 Perfil de sensibilidade das cepas padrão e de interesse clínico.....	27
2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e material proteico bruto	30
2.1 Avaliação por disco-difusão dos extratos orgânicos brutos.....	30
2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição dos extratos brutos.....	31
2.3 Avaliação do material protéico bruto	33
3. Análise dos extratos brutos.....	34
3.1 Análise de compostos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	34
3.2 Bioautografia dos extratos brutos.....	35
3.3 Fracionamento dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada	35
3.4 Fracionamento dos extratos brutos por cromatografia em coluna de Sephadex G15.....	36
4. Avaliação da atividade inibitória das frações dos extratos.....	37
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana das frações por microdiluição	37
4.2 Avaliação da atividade das frações por disco-difusão	38
5. Identificação provável dos compostos ativos	40
5.1 Espectrometria de Massas pelo método FullScan	40
5.2 Espectrometria de Massas in Tandem (MS/MS).....	44
5. Teste de susceptibilidade à citrinina comercial	47
6. Resumo das etapas de pesquisa	49
DISCUSSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Preparação dos extratos.....	21
Figura 2: Resultados de teste de sensibilidade a antibióticos.....	28
Figura 3: Teste de susceptibilidade ao metanol em cepas/amostras indicadoras.	29
Figura 4: Teste de microdiluição dos extratos brutos	32
Figura 5: Teste de frações concentradas 5 vezes do extrato de <i>Streptomyces sp.</i> em <i>E. faecalis</i> ATCC29212 (A) e em <i>S. aureus</i> N315 (B).	38
Figura 6: Resultados do teste de disco-difusão da cepa <i>S. aureus</i> N315 com as frações do extrato de <i>Streptomyces sp.</i>	39
Figura 7: Espectrometria de Massas - Extrato Bruto. A: modo positivo B: modo negativo.....	41
Figura 8: Espectrometria de Massas das Frações Ativas (início do fracionamento).	42
Figura 9: Espectrometria de Massas das Frações Ativas (meio do fracionamento).	43
Figura 10: Espectrometria de Massas das Frações Ativas (fim do fracionamento).....	43
Figura 11: Espectro de íons produtos (MS/MS) do pico m/z 251	44
Figura 12: Espectro de íons produtos (MS/MS) do pico m/z 267.	44
Figura 13: Espectro de íons produtos (MS/MS) do pico m/z 281	45
Figura 14: Espectro de íons produtos (MS/MS) para o pico m/z 265	45
Figura 15: A: Fórmula estrutural da citrinina. B: Proposta de fragmentação.....	46
Figura 16: Prováveis estruturas químicas dos alcalóides	46
Figura 17: Teste de microdiluição utilizando citrinina comercial.	48
Figura 18: Teste de placas com citrinina comercial.	48
Figura 19: Quadro ilustrativo das etapas de pesquisa.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Amostras e Linhagens utilizadas nos testes antimicrobianos, local de origem e perfil de resistência.....	16
Tabela II: Cepas utilizadas para a produção de extratos, inseto de origem e parte do corpo de onde foram extraídas	18
Tabela III: Resultados da avaliação do perfil de resistência aos antibióticos.....	27
Tabela IV: Resultados de testes de disco-difusão dos extratos brutos de <i>A. nicotivivora</i> contra <i>E. faecalis</i> e <i>S. aureus</i>	30
Tabela V: Resultados de MIC (Minimum Inhibitory Concentration) para diferentes bactérias patogênicas dos extratos bacterianos em concentrações iniciais diferenciadas.....	33
Tabela VI: Diâmetros dos halos de inibição das frações do extrato de <i>Streptomyces sp.</i> obtidas por cromatografia em camada delgada	36

RESUMO

O número de casos de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos está aumentando cada vez mais em todo o mundo, paralelamente ao baixo número de novas drogas antimicrobianas que estão sendo lançadas no mercado. Alguns microrganismos que apresentam resistência aos antibióticos são *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* e bactérias produtoras de enzimas que degradam moléculas antimicrobianas. A busca de novas alternativas se faz necessária, porém dificuldades técnicas e biológicas aliadas do desinteresse no investimento em pesquisas de longo prazo e alto custo com baixo retorno levam à desistência por parte da indústria na pesquisa de antimicrobianos.

Este trabalho teve como objetivo observar a ação antimicrobiana de extratos de bactérias provenientes de insetos considerados pragas agrícolas sobre bactérias patogênicas para o homem, com a identificação dos compostos ativos presentes nos extratos. Estes extratos foram testados em microrganismos de espécies associadas a infecções hospitalares e que apresentam resistência a antibióticos, como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Os extratos foram produzidos através de extração com solventes orgânicos, e sua efetividade foi avaliada através de técnicas como disco-difusão e microdiluição. A identificação de moléculas ativas foi realizada através de Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia em Coluna, além de Espectrometria de Massas.

Dos extratos bacterianos avaliados, foi observada ação inibitória do extrato de *Streptomyces sp.* contra diversas amostras de bactérias, em sua forma bruta e fracionada, na concentração inibitória mínima de 0,25µg/µL. Os resultados da análise por Espectrometria de Massas apontam a possível presença de citrinina e fencomicina, com sugerida atividade antimicrobiana e antitumoral. A análise da literatura não apontou relatos da produção destas substâncias por bactérias, o que traz novas possibilidades para o estudo de moléculas bioativas produzidas por microrganismos.

ABSTRACT

The number of cases of nosocomial infections is rising worldwide, but the number of new antimicrobial drugs is not following these statistics. Some antibiotic resistant micro-organisms are *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* and antimicrobial enzyme producer bacteria. The search for alternatives is urgent needed, but technical and biological difficulties associated with the disinterest in long term and low return researches contribute to the decrease of the discover of new antibiotics by the pharmaceutical industry.

The objective of this work have been the screening of insect-associated bacterial extracts with inhibitory activity to pathogenic microorganisms, identifying the active compounds present in these extracts. These extracts were tested in nosocomial infection associated bacterial species that show antibiotic resistance, such as *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis*. Extract production was made using organic solvent molecular separation, and the effectiveness of these extracts was evaluated by disk diffusion and micro dilution assays. The identification of bioactive molecules was made using Thin Layer and Column Chromatography, and Mass Spectrometry.

Inhibitory action was observed in the extract of *Streptomyces sp.* against some of the strains tested in its crude form as well as in the fractionated form, in the minimum inhibitory concentration of 0,25µg/µL. Mass Spectroscopy suggested the presence of molecules like citrinin and phencomycin, with related antimicrobial and antitumoral activity. The literature analysis did not showed data of production of these substances by bacterial strains, what brings alternatives for the study of new active molecules.

INTRODUÇÃO

1. Panorama da resistência antimicrobiana

A resistência a antibióticos sempre foi um problema enfrentado na saúde pública, causado, na maioria das vezes, pelo excesso e mau uso dos antibióticos, além da capacidade adaptativa dos microrganismos no sentido de desenvolver diferentes mecanismos de resistência sob pressão seletiva. Nos últimos vinte anos, esta resistência tem se mostrado cada vez maior e de mais rápida ocorrência, exigindo um grande esforço conjunto de empresas farmacêuticas, laboratórios de pesquisa e poder público no delineamento de novas estratégias de controle e na busca de novos antimicrobianos.

Quando a penicilina, um dos primeiros antibióticos disponíveis, começou a ser amplamente utilizada nos anos 40, isolados de *Staphylococcus aureus* desenvolveram resistência ao medicamento após pouco tempo de introdução do antibiótico no mercado (MONROE e POLK, 2000). Ao final dos anos 50, 80% dos isolados de *S. aureus* já haviam se tornado resistentes às penicilinas naturais, à amoxicilina e à ampicilina (BAUER *apud* TAVARES, 2000). Grande parte dessa resistência se desenvolveu devido ao amplo uso do medicamento, tanto no ambiente hospitalar, em especial nos hospitais de campanha, quanto na comunidade. Já nos anos 60 e 70, com a disponibilidade de novas drogas e aumento do percentual de cura, as infecções graves foram consideradas doenças do passado (JANSEN *et al.*, 2006).

Atualmente, as doenças infecciosas voltaram a apresentar um índice de incidência preocupante, e o aumento dos níveis de resistência aos antibióticos disponíveis para uso faz com que os índices de sucesso nos tratamentos sejam baixos em alguns casos. Os microrganismos que apresentam grandes níveis de resistência aos antibióticos tradicionalmente utilizados para seu tratamento são *S. aureus* metilicina resistente (MRSA), *S. aureus* resistente ou com resistência

intermediária à vancomicina (VRSA e VISA, respectivamente), *Enterococcus sp.* vancomicina resistente (VRE), *Streptococcus pneumoniae* multirresistente, *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* intrinsecamente resistentes, organismos da família Enterobacteriaceae produtores de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), além de bactérias produtoras de enzimas carbapenemases (JANSEN *et al.*, 2006; CUZON e NORDMANN, 2009).

As causas da seleção de resistência a antimicrobianos em bactérias são diversas e incluem não só as características biológicas dos microrganismos, mas também causas sociais e econômicas. Os antibióticos são um dos medicamentos mais prescritos no mundo, sendo que em muitos casos sua utilização é desnecessária. O uso irregular dos antibióticos pelos pacientes, associado à falta de um diagnóstico profundo e detalhado dos agentes infecciosos por parte dos médicos tem um grande peso nas modificações biológicas para a aquisição de resistência por parte dos microrganismos, no aumento das dosagens prescritas, com riscos à saúde dos pacientes devido à toxicidade dos medicamentos. Além disto, vê-se também o aumento de custos para os hospitais públicos e privados, que gastam em média de 30 a 50 por cento do orçamento de medicamentos com os antibióticos (RÜTTIMANN *et al.* 2004).

O desenvolvimento de alternativas também se torna dificultado pela falta de pesquisas por parte dos setores especializados, não só pela complexidade de ultrapassar as barreiras de regulação celular e da dificuldade técnica em se descobrir novos antibióticos, mas pelo próprio desinteresse da indústria, que vê nos antibióticos algo pouco lucrativo (LIVERMORE, D., 2012). O investimento em pesquisas de longo prazo e alto custo, muitas vezes com baixo retorno, acaba por se tornar mais um motivo da desistência da pesquisa no segmento de antimicrobianos (LIVERMORE, D. 2012). Porém, iniciativas como o projeto 10x'20, da Infectious Diseases Society of America (IDSA), que propõe um esforço conjunto global para o desenvolvimento de pesquisas que levem a dez novos

antibióticos até o ano de 2020 (IDSA, 2010), mostram o quanto é importante que os setores de pesquisa invistam de forma incisiva nesta área, pois o problema da resistência bacteriana tem proporções globais, afetando um grande número de pessoas todos os anos.

Os fatores genéticos e ambientais, porém, são as causas de resistência mais estudadas e de maior interesse científico, uma vez que sua compreensão é essencial para o entendimento dos mecanismos de resistência bacterianos e como evitar a sua seleção, podendo servir como ferramentas para quebrar a barreira das dificuldades de pesquisa.

A resistência pode ser desenvolvida para qualquer antibiótico, porém fatores como uma rápida evolução do genoma bacteriano sob pressão seletiva do antibiótico e/ou ambiental podem acelerar esse processo (KOLÁŘ *et al.*, 2001). Com uma pressão seletiva constante, devido ao uso prolongado dos antibióticos, há um favorecimento das condições para a seleção de isolados mutantes resistentes ao antibiótico em questão. As condições do ciclo de vida bacteriano – geralmente curto e com a geração de grande número de descendentes em pouco tempo - aumentam ainda mais a resistência e a sobrevivência de mutantes em um meio contendo os antibióticos. Um fator que se mostra muito importante para o surgimento da resistência é a presença de elementos genéticos móveis, como os plasmídios, que podem alojar genes que conferem resistência a drogas, muitas vezes mais do que uma. A própria mutação e/ou recombinação de genes do genoma bacteriano também podem culminar no processo de resistência.

2. Principais mecanismos de resistência aos antibióticos

As bactérias desenvolveram ao longo do tempo diversos mecanismos de escape que as permitem ser resistentes aos medicamentos utilizados no tratamento de infecções. Podemos ter dois tipos de resistência: natural e adquirida, também conhecidas por ativa e passiva (WRIGHT, G.D., 2005). A resistência ativa é, muitas vezes, decorrente de pressão seletiva sobre o microrganismo,

como por exemplo, a presença de agentes antimicrobianos, ou passiva, quando a resistência é oriunda de um processo adaptativo que não necessita estar diretamente ligado a um antibiótico (WRIGHT, G.D., 2005).

Os mecanismos genéticos da resistência passiva ou adquirida são variados, como a transferência de genes de resistência por meio de plasmídeos, transposons, bacteriófagos, entre outros; pela mutação genética ou ainda por uma combinação destes mecanismos (RICE *et al.* 2006; RAGHUNAT, D., 2008). As mutações espontâneas são geralmente raras, porém conferem resistência aos antibióticos associada a componentes estruturais celulares (RICE *et al.*, 2006), ao passo que a transferência horizontal de genes é bem mais frequente e preocupante, pois pode envolver espécies diferentes e existem muito mais mecanismos possíveis (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011).

As estratégias de resistência bacteriana estão divididas em três grandes grupos: efluxo do agente antimicrobiano para o meio extracelular, modificações do sítio alvo do antibiótico e biotransformações (WRIGHT, G.D., 2005; VAN HOEK *et al.*, 2011; INGEN *et al.*, 2012). É importante frisar que todos estes mecanismos de resistência estão atrelados a modificações genéticas na da célula, independentemente da aquisição de genes de resistência ou não. A seguir são apresentados alguns mecanismos de resistência microbiana, com exemplos do emprego destes por microrganismos presentes no ambiente hospitalar.

2.1 Bombas de efluxo

Os canais de efluxo são proteínas de membrana expressas em todo tipo de células vivas, com função de trocas moleculares normalmente mediados por íons ou ATP, e podem apresentar função protetora contra substâncias nocivas à célula (VILA *et al.*, 2007).

Os genes responsáveis por estes canais podem ser oriundos de plasmídeos, genes intrínsecos de resistência a condições ambientais hostis ou mutações cuja superexpressão acaba por elevar os níveis de transportadores capazes de retirar moléculas de antimicrobianos do interior celular, ou ainda modificar enzimaticamente as moléculas de antibiótico, de forma que estes percam sua atividade (INGEN *et al*, 2012). Quando a molécula é transportada através da membrana, para que ela possa retornar é necessário enfrentar a baixa permeabilidade da mesma, fator que atua em sinergismo com bombas de efluxo (VILA *et al.*, 2007).

Diversos microrganismos apresentam canais para a excreção de antibióticos e também de outras substâncias nocivas à célula, como brometo de etídio, solventes orgânicos e compostos quaternários de amônia, presentes em desinfetantes (ROJAS *et al. apud* MOREIRA *et al.*, 2004; LITTLEJOHN *et al. apud* MOREIRA *et al.*, 2004). Os antimicrobianos mais comumente expelidos pela membrana são as quinolonas, tetraciclinas e macrolídeos, e isto se deve a uma queda da especificidade normalmente encontrada nos canais, permitindo o reconhecimento de um maior número de moléculas (BARKER, K.F., 1999).

Diversas espécies bacterianas apresentam este mecanismo de resistência, como *Escherichia.coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (VILA *et al.*, 2007; MAHAMOUD *et al.*, 2007).

2.2 Variações de permeabilidade da parede e/ou membrana bacteriana

A parede bacteriana é uma das primeiras barreiras para os medicamentos agirem na célula microbiana. Muitas espécies são naturalmente resistentes, pois sua constituição de parede acaba por lhes fornecer uma proteção contra a permeabilidade do agente antimicrobiano. As micobactérias,

por exemplo, apresentam uma parede celular naturalmente hidrofóbica, o que dificulta a penetração de agentes antimicrobianos na célula (LAMBERT, P.A., 2002).

Variações na expressão dos genes podem acarretar diminuição da concentração do antibiótico na célula através de mudanças na permeabilidade da membrana fosfolipídica ou pelo aumento do efluxo do mesmo da célula bacteriana (KOLÁŘ *et al.*, 2001). A membrana bacteriana pode ter sua síntese aumentada para se tornar mais espessa e consequentemente menos permeável aos antibióticos, ou ter sua hidrofobicidade aumentada, de forma que medicamentos com afinidade aos lipídeos não possam penetrar na célula (INGEN *et al.*, 2012).

As porinas, proteínas com papel de controle nas trocas de substâncias da célula com o exterior, também apresentam uma função chave na resistência. Por terem papel no transporte de substâncias e na comunicação celular, também se apresentam como bons sítios para ligação de compostos antimicrobianos (VILLA *et al.*, 2007). Guttman *et al.* (1984) já apontavam para o papel destas proteínas como um fator de seleção e consequentemente de resistência microbiana, em especial das bactérias Gram-negativas. Alterações nas características da parede, normalmente causadas por mudanças no core genômico como consequência do contato com o antibiótico (INGEN *et al.*, 2012), são muito comuns e levam à dificuldades no tratamento das infecções.

2.3 Biotransformações

Diversos medicamentos podem ter sua atividade diminuída ou serem totalmente inibidos pelo mecanismo de biotransformação, principalmente pela ação de enzimas, que ocorre no ambiente intracelular. Drogas como penicilinas, quinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol e rifampicina são alguns dos grupos com relatos de modificação estrutural realizada por microrganismos visando sua inativação (INGEN *et al.*, 2012). Muitas destas modificações se dão pela produção de enzimas que levam a uma variação estrutural das moléculas antimicrobianas, através de processos como acetilação, metilação, hidrólise e transferência de grupos químicos (INGEN *et al.*, 2012; WRIGHT,

G.D., 2005), que acabam por tornar a molécula inativa pois esta perde a capacidade de ligação a sítios ativos específicos.

Os genes de resistência aos β -lactamatos (penicilinas, carbapenemos e cefamicinas), um dos grupos de agentes antimicrobianos que podem sofrer bitransformação, podem estar presentes em diversos tipos bacterianos, como MRSA e bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* (JANSEN *et al.*, 2006). Dentre esses genes, o mais encontrado nestes tipos bacterianos é o de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), derivado de lactamases de classe A. O gene produtor da enzima β -lactamase se encontra localizado em plasmídios, que podem ser transmitidos entre tipos bacterianos diferentes, conferindo resistência a outras penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro (PATERSON e BONOMO, 2005).

Um dos grupos de maior interesse dentro dos produtores de enzimas β -lactamases é *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Amostras MRSA começaram a ser isoladas nos anos 60, pouco depois da introdução da meticilina como medicamento (SCHMITZ, 1997) e se tornaram um sério problema, especialmente no meio hospitalar. Por ser uma bactéria causadora de infecções cutâneas e de tecidos moles, é vista como oportunista (MOURA *et al.*, 2010), porém esta bactéria também é isolada em grupos de pessoas que não estejam passando por assistência hospitalar (ELSON e BARLOW, 2009). O tratamento das infecções por MRSA é feito através do uso de glicopeptídeos, em especial a vancomicina e a teicoplanina, porém estes compostos já não se mostram mais tão eficazes, com a emergência no fim dos anos 90 de cepas vancomicina intermediárias e resistentes (ditas VISA e VRSA, respectivamente) (HIRAMATSU *et al.*, 1997).

Atualmente, medicamentos como linezolida, quinopristina, dalfopristina e daptomicina são as drogas de escolha para tratamento, sendo consideradas as mais eficazes contra MRSA e VRSA (SCHIMIDT-TOMAS *et al. apud* JANSEN *et al.*, 2006; WUNDERINK *et al.*, 2012). Porém,

diversos trabalhos tem apontado casos de resistência a estes medicamentos em pacientes dentro do ambiente hospitalar (GALES *et al.*, 2006; MARTY *et al.*, 2006; GARCÍA *et al.* 2010; HILL *et al.*, 2010; WUNDERINK *et al.*, 2012).

A enzima β -lactamase age hidrolizando o grupo oximino β -lactâmico presente nos antibióticos cuja ação se faz pela inibição de famílias de enzimas com função de síntese de parede celular bacteriana (GUPTA *et al.*, 2003). Na presença do antibiótico, o peptidoglicano não consegue ser ancorado e formar o arcabouço necessário para a formação de uma parede celular concisa, e a bactéria acaba por ficar mais permeável, ocorrendo a lise celular. O gene responsável pela produção de β -lactamases, encontrado na maioria das bactérias resistentes, é o *AmpC*, um gene cromossômico, bem como sua forma plasmidial, o *pAmpC*. O gene é ativado como resposta à exposição do microrganismo a β -lactâmicos, produzindo a enzima que hidrolisa o antibiótico (SERAL *et al.*, 2012). Acredita-se que o gene cromossômico seja uma variação do gene produtor de proteínas de ligação de penicilinas (PEP), que está presente em diversas espécies bacterianas, e a forma plasmidial tenha se originado desta modificação (SERAL *et al.*, 2012). Os genes plasmidiais são encontrados associados a outros elementos de resistência a antibióticos, como as quinolonas (POIREL *et al.*, 2005).

Bactérias produtoras de carbapenemases - enzimas que tem a propriedade de degradar carbapenens (imipenem, ertapenem, meropenem, doripenem), antibióticos utilizados no tratamento de bactérias produtoras de β -lactamases, tiveram um aumento no número de identificações em casos de infecções em humanos em todo o mundo (NORDMANN *et al.*, 2009), em especial de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases, denominadas KPC. Estas bactérias, ao produzirem mecanismos que impedem a ação de antibióticos carbapenemos em suas células, ameaçam a efetividade do tratamento de infecções hospitalares causadas por enterobactérias produtoras de β -

lactamases de espectro estendido (ESBL), visto que esta é a classe de antibióticos de escolha para o tratamento de infecções causadas por este grupo de microrganismos (CUZON *et al.*, 2009).

No início dos anos 2000, enterobactérias que produzem carbapenemases foram encontradas nos Estados Unidos, e atualmente diversos locais como China, Israel, Grécia e vários países da Europa Ocidental e América Latina já notificaram a presença destes isolados em hospitais (NORDMANN *et al.*, 2009; NORDMANN *et al.*, 2011). Foram relatados também casos de infecção por *Serratia marcescens* produtora de carbapenemase no Brasil (DEL PELOSO *et al.*, 2010), além de outros casos envolvendo *Klebsiella pneumoniae* (MONTEIRO *et al.*, 2009; PAVEZ *et al.*, 2009; PEIRANO *et al.*, 2009), *Enterobacter cloacae* (ZAVASCKI *et al.*, 2009) e *Escherichia coli* (LEÃO *et al.*, 2010). Por serem causadores de infecções hospitalares em pacientes debilitados (NORDMANN *et al.*, 2009) ou que se encontram em unidades de tratamento intensivo (CAI *et al.*, 2008), estes microrganismos se tornam um sério problema para a saúde pública.

Além da produção enzimática, outro fator que dificulta o combate a estes microrganismos é sua alta capacidade de transferência e acumulação de genes determinantes de resistência (NORDMANN *et al.*, 2009), como por exemplo os genes para a produção de β -lactamases e de outras enzimas que afetam a ação dos antibióticos (CUZON *et al.*, 2010). Essa transferência pode permitir diversas combinações genéticas, tornando a bactéria portadora resistente a uma grande gama de compostos, o que acaba por dificultar o diagnóstico preciso e um tratamento rápido.

2.4 Modificação do sítio alvo

A modificação de sítio alvo é um mecanismo que consiste na perda de ligação do antibiótico com o local de ação. As interações nestes casos são muito específicas e qualquer pequena alteração influencia na ligação do agente antimicrobiano com seu alvo. Algumas das

modificações de sítio possíveis são: alteração na estrutura de peptidoglicanos, interferência na síntese protéica e interferência na síntese de DNA (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011).

2.4.1 Alteração na estrutura de peptidoglicanos

As alterações na estrutura de peptidoglicanos, causadas por mutações em sítios de ligação de antibióticos, como por exemplo sítios de ligação da penicilina (Penicilin Binding Proteins - PBPs), levam à uma redução na afinidade de ligação de antibióticos que interferem na construção da parede celular (DŽIDIC *et al.*, 2008). Em *S. aureus* MRSA, por exemplo, a resistência ao antibiótico meticilina/oxacilina ocorre com a integração de um elemento genético móvel, denominado Staphylococcal Cassete Chromosome *mec* (SCC*mec*), junto ao gene *mecA*, que confere resistência à meticilina/oxacilina. Este complexo expressa uma proteína (MecA) que apresenta baixa afinidade de ligação a β -lactâmicos, pois há modificação nos sítios de ligação ao agente antimicrobiano (LENCASTRE *et al.*, 2007). Observou-se a presença de resistência cruzada a outros antibióticos, como estreptomicina, tetraciclina e eritromicina através deste mecanismo (GRUDMANN *et al.*, 2006).

O gênero *Enterococcus*, que também possui uma grande importância clínica, também adquiriu resistência a uma larga gama de antibióticos muito rapidamente, como a vancomicina, culminando no aparecimento de isolados ditos VRE (Vancomycin Resistant Enterococci). A resistência à vancomicina é dada pela presença de um gene, denominado *vanA*, que leva à modificação do sítio alvo de ligação do antibiótico (terminação D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lactado), diminuindo a afinidade de ligação à vancomicina, desencadeando a resistência (COURVALIN, P., 2006).

Um dos poucos medicamentos ainda eficazes no tratamento de infecções causadas por VREs é a daptomicina (PANKEY *et al.*, 2005; SADER *et al.*, 2011; TWILLA, J. *et al.*, 2011), com

estudos mais recentes apontando que pelo menos 99,5% de *Enterococcus* isolados de pacientes são suscetíveis ao medicamento (KAMBOJ *et al.*, 2011). Porém, já foram relatados casos de resistência à daptomicina, especialmente entre pacientes gravemente doentes (LONG *et al.*, 2005; KANAFANI *et al.*, 2007; MONTERO *et al.*, 2008; STEED *et al.*, 2011).

2.4.2 Interferência na transcrição ou na síntese protéica

Uma vasta gama de agentes antimicrobianos tem como mecanismo de ação a interferência na transcrição ou em estágios variados da síntese protéica. A ação pode ser focada na transcrição, com efeitos sobre a enzima RNA polimerase, ou na tradução, com ação nas subunidades 30S e 50S do ribossomo bacteriano, impedindo ou alterando a síntese proteica (TENOVER, F.C., 2006). A resistência a estes mecanismos é provocada geralmente por alterações na síntese das subunidades ribossomais, como por exemplo mutações que levam à modificação da subunidade 23S rRNA, constituinte da subunidade 50S (TENOVER, F.C., 2006). Já no caso da transcrição, um exemplo de resistência é o apresentado pelo gênero *Mycobacterium*, através da mutação de pares de bases no gene que codifica a β -subunidade da enzima RNA polimerase (*rpoB*), o que leva a modificações na estrutura desta e perda de sítio de ação do antimicrobiano (SOMOSKOVI *et al.* 2001).

2.4.3 Interferência na síntese de DNA

Dois mecanismos são responsáveis pela resistência a antibióticos que interferem na síntese de DNA: um deles é associado à enzima DNA girase e o segundo está ligado a mutações no gene da enzima topoisomerase IV (ANDERSON, K.L., 2005).

Em geral, a resistência a antibióticos do grupo das quinolonas é devido a mutações no gene codificador da DNA girase, que tem papel importante na replicação do DNA, auxiliando no desenovelamento e diminuindo a tensão de torção e a compactação da dupla hélice do DNA conforme esta é aberta (COLLIN, F. *et al.*, 2011). A enzima age diminuindo o número de

enovelamentos, através de clivagem e reposicionamento do DNA, em um mecanismo chamado de “*Two-gate model*” (ROCA and WANG *apud* COLLIN *et al.* , 2011). A mutação no gene leva à perda dos sítios onde os antibióticos se ligariam para inibir cataliticamente a ação da DNA girase ou para impedir a liberação da enzima, mantendo-a ligada ao DNA no momento da clivagem para reposicionamento (COLLIN *et al.*, 2011), levando à resistência ao medicamento.

Um exemplo de resistência ligada à síntese de DNA é a apresentada por *Salmonella sp.* às quinolonas, através de mutações nos genes cromossômicos *parC* e *parE*. Estes genes são responsáveis pela produção das subunidades da topoisomerase IV, um alvo secundário dos antibióticos utilizados no tratamento da salmonelose (SOUZA *et al.*, 2010)

3. Alternativas para o combate aos microrganismos resistentes

Diante deste quadro de resistência generalizada a diversos compostos comumente utilizados para o tratamento de infecções, novas alternativas devem ser procuradas para que se possa minimizar o problema de forma eficaz. Uma delas é a pesquisa de novas drogas antimicrobianas presentes em extratos bacterianos. Extratos bacterianos podem ser produzidos através do crescimento de culturas puras de microrganismos em meios de cultura artificiais, seguido de centrifugação e filtração da mistura obtida e da determinação da atividade antimicrobiana dos compostos presentes (HERRANZ *et al.*, 2006). Uma vez produzidos estes extratos, eles podem ser adicionados a meios de cultura para testes de atividade antimicrobiana para que esta possa assim ser determinada.

Diversos casos na literatura trazem o uso de microrganismos e de seus extratos nos mais diferentes campos. Cazzola *et al* (2007) utilizaram um composto formado pela associação de oito tipos diferentes de bactérias, chamado OM-85 BV, para a imunoestimulação e consequente prevenção do agravamento de casos de doença pulmonar obstrutiva crônica. Sedelmeier e Bessler (1994), além de Huber *et al.* (2000) utilizaram o extrato OM-89, preparado a partir de 18 cepas

diferentes de *Escherichia coli* para a estimulação e ativação de leucócitos e consequente produção de anticorpos capazes de atuar contra compostos típicos de paredes celulares bacterianas, ajudando na prevenção e no tratamento de infecções urinárias recorrentes, graças à sua ação não específica de ativação do sistema imune.

No campo da parasitologia, o uso de bactérias e suas substâncias como forma de controle de parasitas também é um segmento promissor. Pumpuni *et al.* (1993) desenvolveram um estudo no qual as bactérias presentes no tubo digestório do vetor de *Plasmodium falciparum*, o mosquito *Anopheles stephensi* foram cultivadas, processadas e os extratos foram testados para verificar o desenvolvimento de gametócitos. Segundo os resultados obtidos, extratos de bactérias gram-negativas inibiram completamente ou parcialmente o desenvolvimento de *P. falciparum*. Outros estudos, como o realizado por Moraes *et al.* (2008), sugerem que a adição de *Serratia marcescens* em meio contendo *Leishmania chagasi* desencadeia a lise do parasita, através da formação de estruturas que se assemelham aos biofilmes naturalmente produzidos pela bactéria para fixação no substrato. Já Azambuja *et al.* (2004) sugerem que a prodigiosina produzida por cepas de *S. marcescens* presentes no trato digestório de vetores de *Trypanosoma cruzi* tem um papel importante na ação de lise do parasita protagonizada pela bactéria.

Pesquisadores como Dillon e Dillon (2004) e Azambuja (2005) ressaltaram em seus trabalhos a importância da relação simbiótica entre insetos e as bactérias presentes no tubo digestório dos mesmos. Os trabalhos ainda indicam que há uma modulação na transmissão de doenças por insetos vetores devido a substâncias naturalmente produzidas pelos microrganismos simbiotes para auxiliá-los em processos de defesa ou de aproveitamento de nutrientes, porém estas substâncias podem ter um efeito adverso em outros organismos introduzidos no ambiente, levando a uma diminuição populacional.

Além das bactérias cuja produção de compostos bioativos é mais conhecida, como os gêneros *Bacillus*, *Serratia* e *Pseudomonas*, a importância dos actinomicetos e mixobactérias tem crescido nos últimos dez anos como uma rica fonte produtora de compostos bioativos, com especial ênfase em seus metabólitos secundários (REICHENBACH, H., 2001). Diversas moléculas, que vão desde terpenos simples, passando por isoprenóides, ácidos carboxílicos e açúcares modificados e compostos lipofílicos, além de peptídeos (GERTH *et al*, 2003), foram identificadas como importantes agentes bioativos que dão origem a diversos tipos de medicamentos. Com o isolamento e identificação de novas espécies bacterianas do ambiente (GERTH *et al*, 2003), espera-se que o número de compostos isolados destes microrganismos que tenham um papel importante no combate às doenças acabe aumentando significativamente.

Diante destes fatos, é evidente que o uso de bactérias presentes na microbiota habitual de seres vivos como controle ou auxiliares no tratamento de diversas doenças é um campo bastante promissor e com resultados bastante satisfatórios, com um grande potencial de desenvolvimento. Observa-se, portanto, que qualquer esforço feito no sentido de desenvolver estudos para compreender a influência que estes microrganismos simbiotes podem ter em bactérias patogênicas resistentes a antibióticos é de extrema importância para a obtenção de maiores informações na busca de alternativas de tratamento de diversas infecções que acometem os seres humanos, bem como para ampliar nossos conhecimentos sobre as substâncias produzidas por microrganismos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral observar a ação antimicrobiana de extratos de bactérias oriundas de diferentes insetos, considerados pragas agrícolas, sobre bactérias patogênicas para o homem, identificando os compostos ativos presentes nos extratos.

Objetivos específicos

- 1) Testar a efetividade dos extratos de diferentes bactérias associadas a insetos na inibição do crescimento de bactérias patogênicas para humanos, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus aureus*, utilizando as técnicas de disco-difusão e microdiluição;
- 2) Fracionar os extratos ativos por técnicas cromatográficas e propor através de espectrometria de massas a identidade dos principais compostos com atividade antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismos para análise

1.1. Seleção de linhagens bacterianas e análise de resistência

A escolha dos microrganismos para a realização dos testes foi baseada na existência de casos na literatura de infecções hospitalares ocasionadas pelas espécies presentes nos estoques do próprio laboratório, tomando-se o cuidado de escolher, além de linhagens sem resistência, amostras que apresentassem resistência a antibióticos. A Tabela I apresenta as cepas e amostras escolhidas para teste.

Tabela I: Amostras e Linhagens utilizadas nos testes antimicrobianos, local de origem e perfil de resistência.

<i>Bactéria</i>	<i>Origem</i>	<i>Resistência</i>
<i>S. aureus</i> BEC 9393	Laboratório da Profa. Dra. Agnes Marie Sá Figueiredo (Instituto de Microbiologia – UFRJ, RJ)	<i>Meticilina</i>
<i>S. aureus</i> N315	Laboratório do Dr. Keiichi Hiramatsu, (Departamento de Bacteriologia – Universidade de Juntendo – Japão)	<i>Meticilina</i>
<i>S. aureus</i> Rib1	Laboratório do Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (IB – Unicamp)	<i>Meticilina</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Linhagem padrão – FIOCRUZ	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Linhagem padrão – FIOCRUZ	
<i>E. faecalis</i> 6778	Laboratório da Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini (FCFRP – USP)	<i>Vancomicina</i>
<i>E. faecalis</i> 1614	Laboratório da Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini (FCFRP – USP)	<i>Vancomicina</i>
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Linhagem padrão - FIOCRUZ	
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	Linhagem padrão - FIOCRUZ	<i>Vancomicina</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Linhagem padrão - FIOCRUZ	
<i>E. coli</i> ATCC 35218	Linhagem padrão - FIOCRUZ	<i>Betalactâmicos</i>
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	Linhagem padrão - FIOCRUZ	<i>Ampicilina</i>
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	Linhagem padrão - FIOCRUZ	<i>Betalactâmicos, aminoglicosídeos</i>
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Linhagem padrão - FIOCRUZ	
<i>E. faecium</i> ATCC 6569	Linhagem padrão - FIOCRUZ	

Para a determinação da manutenção ou perda de resistência aos agentes antimicrobianos comerciais, utilizou-se o teste de disco-difusão ou método de Kirby-Bauer (BAUER *et al.* 1959; AMBAYE, 1997). A técnica tem como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana de um composto a partir da formação de uma zona de inibição de crescimento bacteriano em volta do local de aplicação de um disco contendo o agente inibidor.

As cepas/amostras de teste foram cultivadas em tubos tipo *falcon* contendo de 5 a 6 mL de meio líquido, como BHI (Acumedia Products – Neogen, USA) ou caldo Mueller Hinton (Difco Laboratories Incorporated, USA), por 24 horas em estufa microbiológica à temperatura de 37°C. Posteriormente, este cultivo foi semeado em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Difco Laboratories Incorporated, USA), para a obtenção de colônias isoladas. Os demais passos foram realizados conforme item 3.1. Além dos antibióticos cuja resistência havia sido relatada na literatura, foram testados outros a título de comparação e identificação de possíveis novas resistências. Foram utilizados os seguintes discos de antibióticos nas seguintes concentrações: vancomicina 30µg (BioRad, USA), ampicilina 10 µg (BioRad, USA), cloranfenicol 30µg (BioRad, USA), penicilina 6µg (BioRad, USA) e oxacilina 5µg (BioRad, USA). O diâmetro dos halos foi comparado a valores padrão para a determinação do fenótipo de resistência/suscetibilidade.

1.2 Teste de susceptibilidade ao metanol

Todas as bactérias foram testadas com relação à tolerância ao crescimento em metanol, pois os extratos a serem testados estavam em soluções metanólicas, descartando-se assim interferências do diluente. O teste realizado foi o método de Kirby-Bauer, de forma semelhante a descrita para o teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos na seção 1.1. A única diferença foi que ao invés do uso de discos contendo antibiótico, foram aplicados discos comerciais sem antimicrobianos, mas embebidos em 10 µL de metanol P.A.. Além do uso dos discos, foi realizada uma variação do teste

de disco-difusão, com o gotejamento direto de 10 µL de metanol na placa previamente semeada com as bactérias.

2. Produção de extratos

2.1 Escolha das cepas bacterianas associadas a insetos

Estes experimentos foram todos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli (ESALQ-USP) e sua equipe, utilizando-se a infraestrutura dos laboratórios na ESALQ. As cepas utilizadas para a produção de extratos são bactérias isoladas de diversas partes do corpo de insetos conhecidos por serem pragas da lavoura. Essas amostras pertencem à coleção de culturas do Laboratório do Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli e foram isoladas e identificadas previamente, por sequenciamento do gene 16S rDNA (ZUCCHI *et al.*, 2011). A Tabela II mostra as cepas utilizadas e sua origem.

Tabela II: Cepas utilizadas para a produção de extratos, inseto de origem e parte do corpo de onde foram extraídas

<i>Cepa</i>	<i>Inseto</i>	<i>Local de obtenção</i>
<i>Serratia nematodiphila</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório
<i>Bacillus simplex</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Euschistus heros</i> (percevejo marrom da soja)	Sistema digestório
<i>Micromonospora endolithica</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório
<i>Acinetobacter junii</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório

<i>Microbacterium indicum</i>	<i>Armitermes euamignathus</i> (cupim)	Sistema digestório
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Acromyrmex subterraneus brunneus</i> (formiga cortadeira)	Tegumento
<i>Arthrobacter nicotinivorans</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> (lagarta do cartucho)	Sistema digestório

2.2 Preparação dos extratos orgânicos

Os estoques bacterianos foram semeados em placas de Petri contendo meio ISP-2 (extrato de levedura 0,4%, extrato de malte 1%, glicose 0,4%, ágar 1,6%), e após o crescimento de colônias, algumas foram inoculadas em 1000mL de caldo ISP-2. As bactérias foram cultivadas em incubador sob agitação por 24 horas, e no caso de amostras de actinobactérias, por 7 dias.

Após o período de cultivo, o fermentado foi aliqotado em tubos de centrífuga com capacidade para 50 mL e as culturas submetidas à centrifugação a 10.000 rpm e 4°C por 10 minutos (Centrífuga Hettich Rotina 38R, rotor com 119mm de raio). O sobrenadante foi coletado e acidificado com solução de ácido clorídrico 2% até alcançar pH 2,5. Depois de ajustado o pH das preparações, estas foram submetidas a filtração a vácuo para a retirada de resíduos celulares.

O sobrenadante proveniente da filtração foi colocado em um funil de separação e misturado com acetato de etila P.A. na proporção de 50 mL de solvente para cada 100 mL de amostra. Agitou-se bem para a separação dos compostos presentes na amostra, com a formação de duas fases distintas, uma leitosa e outra transparente. A fase leitosa e rica em água foi separada, com a coleta da fase orgânica, transparente, em um frasco à parte. A fase leitosa foi submetida ao mesmo processo de extração com acetato de etila por mais duas vezes para garantir uma melhor extração da fase orgânica.

A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro P.A. em quantidade suficiente para a retirada de água da amostra (aproximadamente 50-80 g), e esta foi então filtrada em filtros de papel para a retirada dos cristais de sulfato de sódio. A amostra foi então colocada em um balão de fundo chato de 500mL para a retirada do solvente em evaporador rotativo (Tecnal Artigos para Laboratório, Brasil) em banho-maria a 45°C. Após a completa evaporação do acetato de etila, foram adicionados 5 mL de metanol P.A. no balão para a solubilização da amostra. O material foi então colocado em frascos de vidro previamente identificados e pesados e o processo de lavagem do balão com metanol foi repetido. Os frascos contendo as amostras foram colocados em capela por cerca de 16 horas para a evaporação do metanol, e após a completa secagem, os frascos foram pesados novamente para a determinação da quantidade final de extrato. Os extratos secos foram diluídos em metanol P.A., de forma que a concentração final fosse de 5µg/µL. Algumas etapas de preparação dos extratos estão apresentadas na Figura 1.

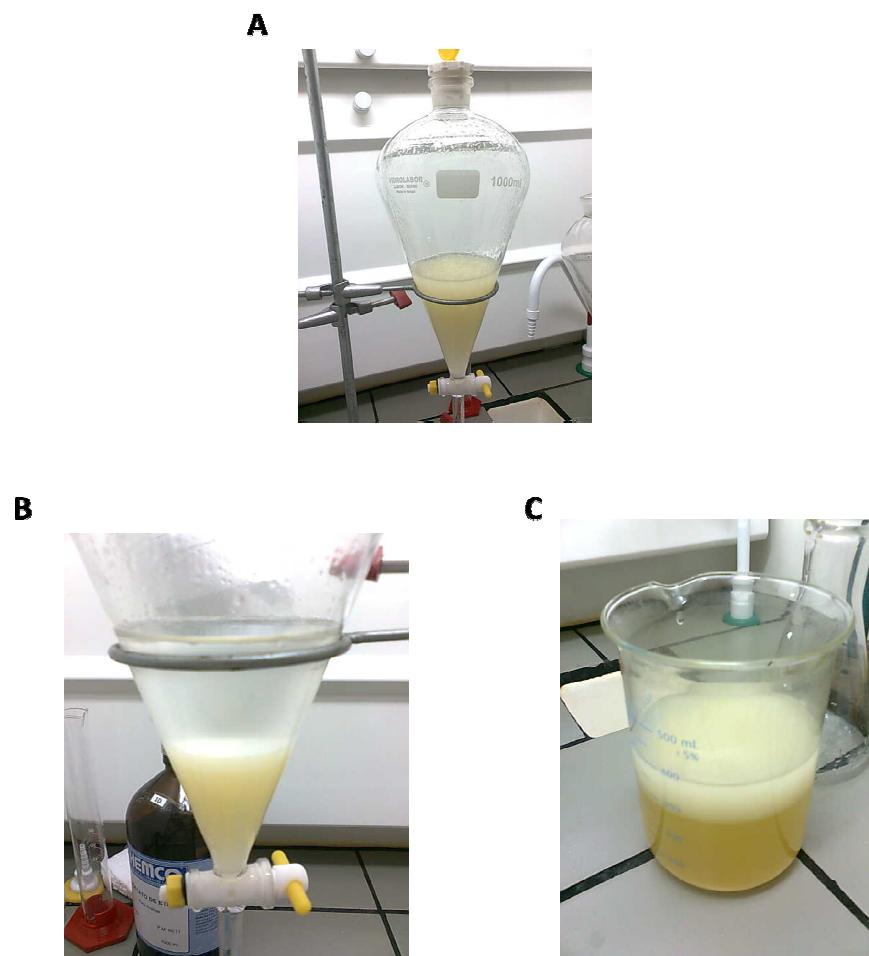


Figura 1: Preparação dos extratos. A) funil de separação contendo acetato de etila e fermentado bacteriano; B) Separação das fases em fase orgânica (transparente) e aquosa (amarelo leitoso); C) Fase aquosa contendo resíduos celulares e meio de cultura.

2.3 Preparação das fases proteicas (aquosas)

Para a preparação das frações ricas em peptídeos a serem testadas, a fase aquosa residual do processo de extração orgânica foi precipitada com acetona P.A., na proporção 20% / 80%. A média de volume de fase aquosa processada foi de 500mL. Após a precipitação, o material foi

centrifugado (Centrífuga Hettich Rotina 38R, rotor com 119mm de raio) a 10.000 rpm e 4°C por 10 minutos, e o sedimento foi pesado e ressuspensão em tampão fosfato (50mM pH7), de forma que a concentração final ficasse concentrada 100 vezes. As amostras tiveram sua quantidade de proteína determinada via teste de Bradford (BRADFORD, 1976).

3. Testes de susceptibilidade

3.1 Testes de disco-difusão

Para uma avaliação inicial da atividade antimicrobiana dos extratos, foi utilizado o teste de disco-difusão. A técnica tem como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana de um composto a partir da formação de uma zona de inibição de crescimento bacteriano em volta do local de aplicação do agente inibidor.

As amostras e linhagens indicadoras (Tabela I) foram cultivadas em tubos de propileno (15 mL) contendo de 5 a 6 mL de meio líquido nutritivo, como BHI ou caldo Müeller Hinton. O meio BHI foi utilizado para favorecer o cultivo de bactérias que apresentavam dificuldades de crescimento em Müeller Hinton. As amostras foram cultivadas por 24 horas em estufa de crescimento à temperatura de 37°C. Posteriormente, este cultivo foi semeado em placas de Petri contendo ágar Müeller Hinton para a obtenção de colônias isoladas. O inóculo bacteriano a ser utilizado no experimento foi preparado seguindo as normas padrão para testes de disco-difusão da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, documento M7-A6, 2003). De acordo com estas normas, o inóculo deve ser preparado retirando-se entre cinco e seis colônias bacterianas da placa de cultivo e diluindo-as em solução salina 0,9%, e a turbidez desta solução deve ser ajustada tendo-se como base a solução 0,5 da escala de MacFarland. A absorbância do inóculo também foi medida em espectrofotômetro a fim de uniformizar os dados, buscando-se equivalência à escala de MacFarland. Com base em várias análises, os valores de densidade ótica (DO) considerados foram de uma absorbância entre 0,07 e 0,1 ($\lambda 600$ nm), que equivalem a aproximadamente 1 a 2×10^8

UFC/mL. Paralelamente a isto, 10 µL dos extratos bacterianos já preparados e com concentração padronizada foram aplicados em discos de papel de filtro comerciais, utilizados em testes de susceptibilidade a drogas e deixados secar por completo em temperatura ambiente para sua posterior aplicação nas placas de teste.

O inóculo foi aplicado em placas contendo ágar Müller Hinton com o auxílio de um *swab*, de maneira que o meio ficasse com uma camada bacteriana homogênea. Esperou-se alguns minutos para a absorção da solução, e em seguida os discos contendo os extratos já devidamente secos foram aplicados, respeitando-se a quantidade de 6 discos por placa para não haver prejuízo na leitura dos resultados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 a 24 horas e os resultados foram analisados com o auxílio de uma régua para a realização das medidas dos halos de inibição, quando presentes.

3.2 Testes de microdiluição

O teste de microdiluição também foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos. Para a realização deste teste, as linhagens e amostras indicadoras (Tabela I) foram cultivadas conforme procedimento descrito para os testes de disco-difusão, com a diferença que 10 µL do inóculo bacteriano final foram diluídos em 990 µL de caldo Müller Hinton, sendo que a quantidade de bactéria presente neste volume fosse de aproximadamente 5×10^4 UFC. Os inóculos foram aplicados em microplacas contendo diluições seriadas de cada extrato em 50µL de caldo Müller Hinton. A concentração inicial do extrato ficou em 0,5 µg/µL e a final em 0,0625 µg/µL. Em todos os testes, foram incluídos controles de esterilidade do meio de cultura e controles de crescimento microbiano na presença e ausência de metanol. O material foi cultivado em estufa a 37°C por 18 a 24 horas, e procedeu-se a leitura das placas visualmente ou em leitor de microplacas

(λ 600nm), quando necessário. Através deste teste procurou-se estabelecer o MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) dos extratos.

4. Análise, fracionamento dos extratos, identificação e provável elucidação dos compostos bioativos

4.1 Cromatografia em Camada Delgada - CCD

A cromatografia em camada delgada foi realizada com a aplicação de 10 μ L dos extratos brutos e diluídos 100 vezes em placas laminadas contendo sílica gel (Alugram Xtra SIL G UV254, Macherey-Nagel, Germany) e mergulhadas em eluente para a separação baseada na polaridade dos compostos presentes na amostra. Neste trabalho, o eluente escolhido foi uma mistura de acetato de etila e metanol, utilizados nas proporções de 50% / 50% e 60% / 40%. As placas depois de secas foram observadas em câmara escura sob luz ultravioleta (λ 254 e 366nm), e as áreas com compostos visualizados foram marcadas a lápis.

4.1.2 Bioautografia dos extratos

Os extratos foram testados pela técnica de bioautografia, de forma a avaliar a ação de moléculas ativas nos extratos em Cromatografia em Camada Delgada. Foi realizada a cromatografia dos extratos (conforme item 4.1) e após o fim da corrida as placas cromatográficas foram posicionadas no fundo de placas de Petri. Sobre este sistema foi adicionado meio de cultura ágar Müeller Hinton contendo inóculo bacteriano padronizado na quantidade 1 a 2×10^8 UFC/mL, e o meio foi deixado solidificar em temperatura ambiente, sendo incubado em seguida em estufa a 37°C por 18-24 horas. Foi observado se ocorreu a inibição do crescimento bacteriano em regiões

específicas da placa de cromatografia, o que forneceria indícios da presença de moléculas com ação antibacteriana no extrato em questão.

4.3 Fracionamento dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada - CCD

Os extratos que apresentaram resultados de inibição nos testes de sensibilidade foram fracionados por diversas técnicas, sendo a primeira delas a extração direta através das placas de cromatografia delgada. Quantidades entre 300-400µl dos extratos foram aplicados na placa de Cromatografia em Camada Delgada. Procedeu-se a eluição da amostra da mesma forma utilizada para a visualização dos compostos presentes nos extratos. As placas foram observadas e as regiões de fracionamento foram determinadas de acordo com os *spots* presentes. A sílica foi raspada e lavada com o eluente de corrida para a retirada dos compostos retidos. A fração foi filtrada com lã de vidro para a retenção de partículas de sílica e foi posteriormente mantida por 7 dias em capela para evaporação do solvente. Após a evaporação, o conteúdo do frasco foi ressuspenso em metanol no volume equivalente ao inicial (extrato aplicado).

4.4 Fracionamento em coluna cromatográfica

Os extratos com ação inibitória foram fracionados e pré-purificados em colunas cromatográficas empacotadas com resina Sephadex G-15 (Sigma-Aldrich, USA) com 10 cm de altura. Foram fracionados 3mL de extrato bruto, utilizando-se como solvente o isopropanol, e as frações foram recolhidas manualmente de acordo com o volume, fixado em 3,3 mL.

4.5 Espectrometria de massas

Os extratos brutos com ação inibitória e suas frações foram analisados para identificação dos compostos em espectrômetro de massas (Applied Biosystem Veriti, Invitrogen, USA), em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e sua equipe, da Faculdade de

Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) - USP. Esta etapa do trabalho foi realizada utilizando a infraestrutura do laboratório do Prof. Beraldo de Moraes.

Os extratos e as frações foram diluídos em acetonitrila para a obtenção de sinais não saturados pelo aparelho, e a coleta de dados foi realizada nos modos *FullScan* positivo e negativo, de onde se obtiveram os sinais completos do perfil das amostras, e no modo em *tandem* (MS/MS), com a fragmentação dos sinais inteiros para uma análise mais refinada dos picos obtidos. Os dados obtidos foram comparados com o Dictionary of Organic Compounds para a provável identificação das substâncias.

5. Teste de susceptibilidade à citrinina comercial

Os microrganismos que apresentaram inibição de crescimento com o extrato de *Streptomyces sp.* foram submetidos à testes com o uso de citrinina comercial (Sigma Aldrich, USA) a fim de comparar os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade com o uso do extrato e também as evidências moleculares provenientes da elucidação estrutural. Também foi escolhido um microrganismo, *K. pneumoniae* ATCC13883, que não teve o crescimento inibido pelo extrato, como controle do teste.

RESULTADOS

1. Triagem de extratos com ação antimicrobiana

1.1 Perfil de sensibilidade das cepas padrão e de interesse clínico ao metanol e aos antibióticos usuais

Todos os microrganismos escolhidos para teste foram avaliados quanto à susceptibilidade ao metanol utilizado como diluente das frações orgânicas. Além disso, o perfil de resistência a antimicrobianos foi conferido em todos esses microrganismos.

O teste utilizado foi o método de Kirby-Bauer (BAUER *et. al.*, 1959; AMBAYE *et al.*, 1997), com os seguintes discos de antibióticos nas seguintes concentrações: vancomicina 30µg, ampicilina 10 µg, cloranfenicol 30µg, penicilina 6µg e oxacilina 5µg. A interpretação dos resultados para os antibióticos foi feita com o uso de tabelas-padrão presentes nas normas do CLSI. A Tabela III demonstra a situação do microrganismo frente ao antibiótico, em comparação com os valores de resistência a um agente antimicrobiano, de acordo com as normas do CLSI. A Figura 2 ilustra alguns resultados para este teste, selecionados como representativos.

Tabela III: Resultados da avaliação do perfil de resistência aos antibióticos por disco-difusão

<i>Microrganismo</i>	<i>Resistência</i>	<i>Diâmetro do halo</i> <i>(média, mm)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Valor CLSI (mm)</i>	<i>Situação</i>
<i>S. aureus</i> BEC9393	Meticilina	0	0,00	0-10	Resistente
<i>S. aureus</i> Rib1	Meticilina	10	0,57	0-10	Resistente
<i>S. aureus</i> N315	Meticilina	0	0,00	0-10	Resistente
<i>K.pneumoniae</i> ATCC13883	Ampicilina	0	0,00	0	Resistente (intrínseco)
<i>E. coli</i> ATCC35218	Beta-lactâmicos	12	0,57	0-16	Resistente
<i>E. faecalis</i> 6778	Vancomicina	9	0,57	0-14	Resistente
<i>E. faecalis</i> 1614	Vancomicina	11	1,00	0-14	Resistente
<i>E. faecalis</i> ATCC51299	Vancomicina	0	0,00	0-14	Resistente

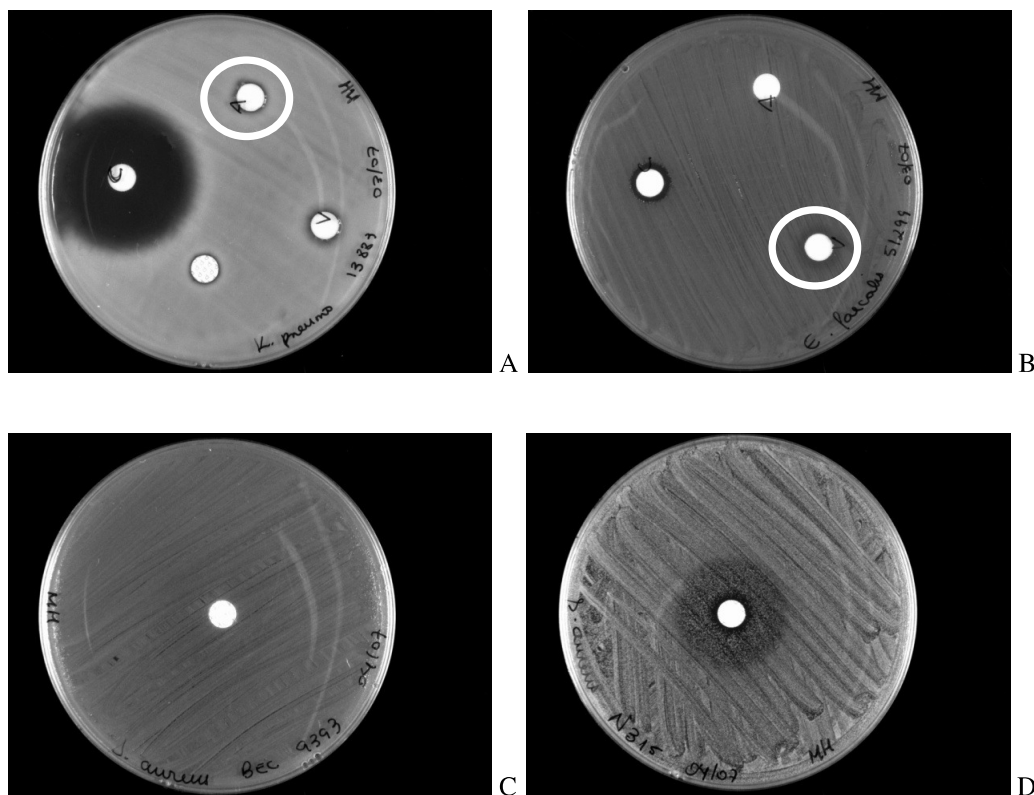


Figura 2: Resultados de teste de sensibilidade a antibióticos. A: *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883. Em destaque, resistência à ampicilina. B: *Enterococcus faecalis* ATCC51299, resistente à vancomicina. Em destaque, resistência à vancomicina. C: *Staphylococcus aureus* BEC9393, resistente à oxacilina. D: *Staphylococcus aureus* N315, resistente à oxacilina

Os testes utilizando metanol P.A. foram realizados de forma a excluir a possibilidade de interferência do reagente nos testes de disco-difusão e microdiluição, levando a falsos positivos. Em um dos testes os discos eram embebidos em metanol e colocados ainda úmidos sobre a placa, e em outro o metanol foi aplicado diretamente sobre a placa semeada. Não houve inibição do crescimento bacteriano, e no caso do gotejamento direto do álcool, o que se verificou foi o espalhamento do inóculo (Figura 3).

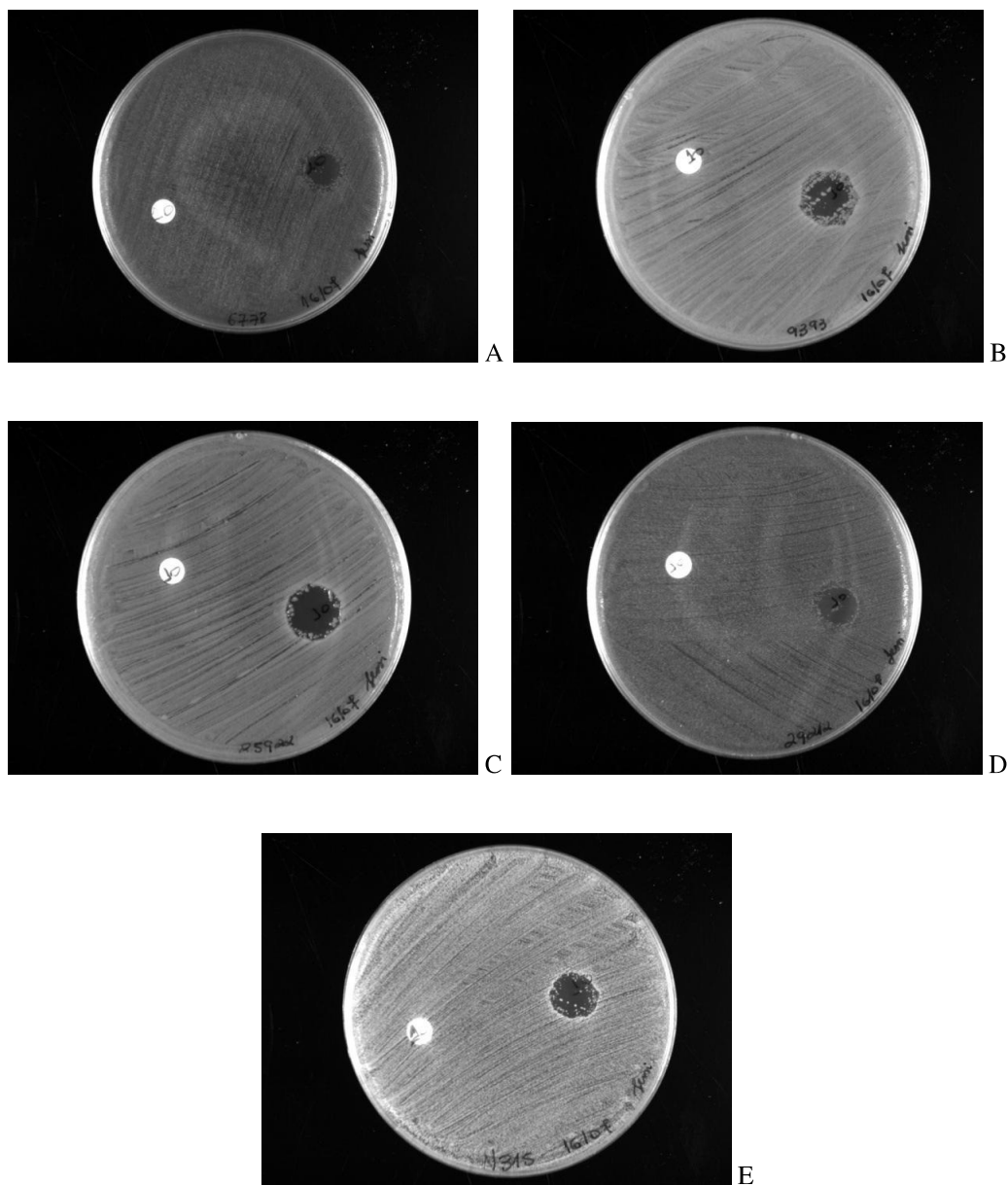


Figura 3: Teste de susceptibilidade ao metanol em cepas/amostras indicadoras. A: *E. faecalis* 6778. B: *S. aureus* BEC9393. C: *E. coli* ATCC25922. D: *E. faecalis* ATCC29212. E: *S. aureus* N315.

2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos brutos e material proteico bruto

2.1 Avaliação por disco-difusão dos extratos orgânicos brutos

Todos os extratos brutos produzidos foram avaliados quanto sua atividade antimicrobiana através da técnica de Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1959; AMBAYE *et al.*, 1997). Os discos preparados e secos com os extratos, na concentração de 50µg, foram aplicados nas placas semeadas com as bactérias representantes de espécies bacterianas causadoras de infecção hospitalar e na comunidade em seres humanos. A avaliação dos extratos consistiu na presença ou ausência de halo representando a inibição do crescimento.

Neste teste somente os extratos de *Arthrobacter nicotinivorans* apresentaram inibição do crescimento para *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecalis* 1614 e sobre *S. aureus* ATCC29213 (Tabela IV).

Tabela IV: Resultados de testes de disco-difusão dos extratos brutos de *A. nicotinivorans* contra *E. faecalis* e *S. aureus*.

<i>Extrato</i>	<i>Cepa inibida</i>	<i>Diâmetro do halo de inibição</i> (média, em mm).	<i>Desvio padrão</i>
<i>A. nicotinivorans</i>	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	10	0,57
<i>A. nicotinivorans</i>	<i>E. faecalis</i> 1614	12	1,52
<i>A. nicotinivorans</i>	<i>S. aureus</i> ATCC29213	4	1,15

2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição dos extratos orgânicos brutos

Todos os extratos brutos foram testados através da técnica de microdiluição (MARYMONT, J.H. e WENTZ, R.M., 1966), com o uso de microplacas esterilizadas de fundo chato com 96 *wells*. Todos os extratos produzidos a partir dos microrganismos apresentados na Tabela II foram testados para avaliação de seu poder de inibição do crescimento bacteriano dos microrganismos apresentados na Tabela I.

Foi realizada a diluição seriada de 1/10 de cada um dos extratos metanólicos na concentração 5 µg/µL em caldo Müeller Hinton. O volume final dos poços ficou em 100 µL (10 µL de extrato, 40 µL de caldo Müeller Hinton e 50 µL de inóculo bacteriano em caldo Müeller Hinton, com 5×10^4 UFC/ µL). Tomou-se o cuidado de realizar o controle de inóculo bacteriano sem e com a presença de 10 µL de metanol, a mesma quantidade de extrato utilizada nos testes, para que fosse descartada qualquer possibilidade de interferência no crescimento. As placas foram cultivadas em estufas a 37°C por 18-24 horas, e após este período, os resultados foram observados com o uso de fundo escuro para a determinação do crescimento microbiano, o que permitiu que fosse dispensada a leitura em leitor de microplacas, uma vez que a visibilidade dos resultados acabou se mostrando adequada.

O extrato de *Streptomyces sp.* inibiu o crescimento de todas as cepas testadas de *S. aureus*, de *E. faecalis* ATCC 29212 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 na diluição inicial (concentração 0,5 µg/µL), não apresentando atividade inibitória em nenhuma das outras diluições. A Figura 4 mostra a atividade inibitória do extrato para dois dos microrganismos testados.

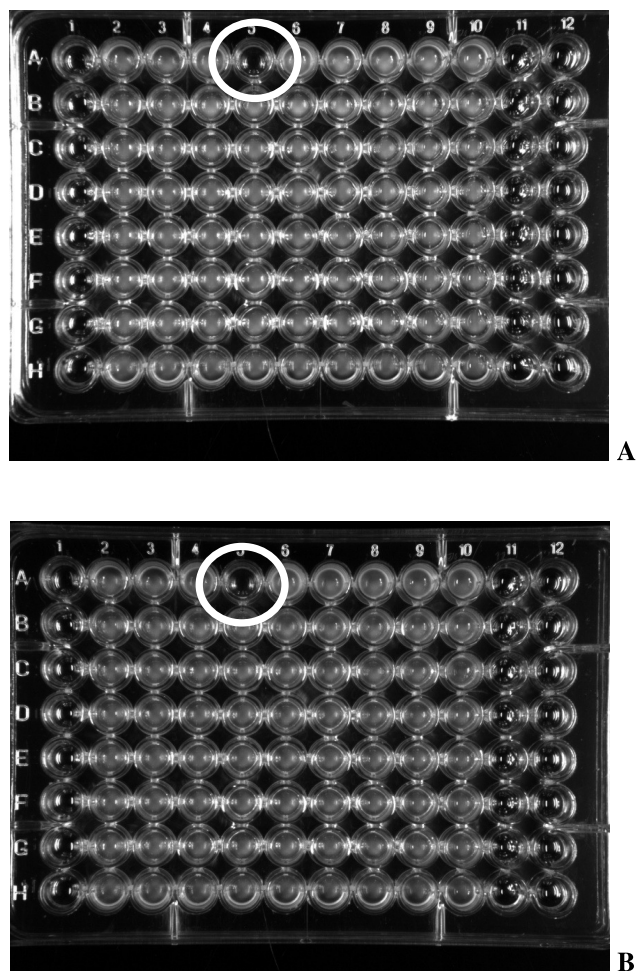


Figura 4: Teste de microdiluição dos extratos brutos. A: *P. aeruginosa* ATCC27853. B: *S. aureus* Rib1. Destaque para o poço 5A, mostrando inibição do crescimento microbiano na coluna que representa o extrato de *Streptomyces sp.* Colunas 1 a 3: controles do meio de cultura, do crescimento do inóculo puro e em presença de metanol. Colunas 4 a 10: diluição seriada dos diferentes extratos bacterianos testados. 11 e 12: controles do meio de cultura.

Com base nesses dados, resolveu-se ampliar a faixa de concentrações iniciais de extrato testadas para verificar se haveria alguma diferença nos resultados de inibição. Desta forma, testaram-se os extratos através da técnica de microdiluição, em concentrações de $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$,

1µg/µL, 0,5µg/µL, 0,25µg/µL, 0,125µg/µL e 0,0625µg/µL. Os valores da menor concentração inibitória apresentados nos testes estão expressos na Tabela V.

Tabela V: Resultados de MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dos extratos bacterianos para diferentes bactérias patogênicas em concentrações iniciais diferenciadas.

<i>Extrato</i>	<i>Concentração extrato (µg/µL)/ Bactéria Inibida</i>		
	3	0,5	0,25
<i>Arthrobacter nicotinivorans</i>	<i>E. faecalis</i> 6778		
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>S. aureus</i> Rib1, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
<i>Microbacterium indicum</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
	<i>S. aureus</i> BEC 9393, <i>S. aureus</i> N315 e <i>S. aureus</i> ATCC 25923		

2.3 Avaliação do material protéico bruto

A fração peptídica bruta oriunda do processo de produção de extratos bacterianos também foi avaliada quanto ao seu potencial inibitório, mas não foram observadas atividades inibitórias de crescimento.

As frações proteicas de cada microrganismo foram testadas em placas de ágar Mueller Hinton, porém sem o uso de discos de papel filtro para evitar interferências na difusão dos peptídeos pelo Agar, sendo aplicados diretamente sobre a placa semeada. Foram utilizadas 3 microrganismos como indicadores, escolhidos de acordo com as características estruturais da parede (Gram-positivo ou Gram-negativo). Foram escolhidas para a realização do teste *E. faecalis* 1614, *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* N315. As concentrações dos extratos ficaram entre 0,005 e 0,1 µg/mL, conforme quantificação proteica realizada via teste de Bradford (BRADFORD, 1976).

As amostras não apresentaram resultados inibitórios, porém o extrato protéico de *Serratia nematodiphila* apresentou o crescimento de uma bactéria, e a formação de um grande halo de inibição em torno desta colônia. Este material foi coletado, o DNA bacteriano extraído e submetido a amplificação de sequências 16S rDNA e sequenciamento e identificação, realizada pela equipe do Prof. Dr. Fernando Luís Cõnsoli, da ESALQ. Os resultados sugerem que esta bactéria pertence ao gênero *Enterococcus*. O extrato proteico de *Serratia nematodiphila* foi filtrado em filtros de membrana 0,22µm, mas não apresentou atividade na repetição dos testes.

Foram realizados testes de microdiluição de forma semelhante àquela empregada nos testes de extratos orgânicos brutos e não foram observadas inibição do crescimento bacteriano para nenhuma das amostras testadas.

3. Análise dos extratos brutos

3.1 Análise de compostos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Todos os extratos orgânicos que estavam sendo testados foram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada (referência), para traçar um perfil das amostras, auxiliando a identificação e separação de compostos presentes nas mesmas. A fase móvel escolhida foi uma mistura de acetato de etila e metanol, os solventes que já estavam sendo utilizados para a diluição e extração das moléculas, em três proporções diferentes (60/40, 70/30 e 30/70 v/v), para a avaliação de possíveis diferenças nas diluições. Após o tempo de corrida, que variou entre 1 a 3 horas, as placas foram observadas em luz UV. Todas as amostras apresentaram compostos visíveis sob luz UV, não mostrando diferenças devido a polaridades diferentes da fase móvel. As regiões fluorescentes foram marcadas para serem recuperadas.

3.2 Bioautografia dos extratos brutos

Foi realizada a bioautografia dos extratos brutos como forma de identificação de frações com atividade antimicrobiana. Os extratos foram aplicados cromatoplasmas, e após a eluição, as placas foram colocadas em placas de Petri e cobertas com meio ágar Müller Hinton acrescido dos inóculos bacterianos. Após a solidificação, o material foi incubado em estufa a 37°C por 18-24 horas. Não houve a inibição do crescimento bacteriano neste teste.

3.3 Fracionamento dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada

Os extratos escolhidos para a realização de fracionamento foram os extratos de *Streptomyces sp.* e *Arthrobacter nicotinivorans*, devido ao bom desempenho apresentado nos testes de inibição de crescimento microbiano.

Cerca de 300 a 400 µL de cada extrato foram eluídos com o uso de fase móvel composta por acetato de etila e metanol (60/40 v/v). A extração foi realizada conforme descrito em material e métodos. Foram obtidas 8 frações para o extrato de *Streptomyces sp.* e 6 frações para *Arthrobacter nicotinivorans*, que foram testadas quanto a atividade antimicrobiana através de disco-difusão. As frações do extrato de *Strptomyces sp.* exibiram atividade inibitória frente *E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* BEC9393 e *S. aureus* ATCC25923. O extrato de *Arthrobacter nicotinivorans* não apresentou atividade contra nenhum dos microrganismos testados. Os resultados estão apresentados na Tabela VI.

Tabela VI: Diâmetros dos halos de inibição das frações do extrato de *Streptomyces sp.* obtidas por Cromatografia em Camada Delgada

<i>Frações do Extrato</i>	<i>Halos (mm)</i>		
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> BEC 9393	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Fração 1	12	16	12
Fração 2	13	-	-
Fração 3	13	14	-
Fração 4	15	-	16
Fração 5	11	14	15
Fração 6	10	12	18
Fração 7	-	15	17
Fração 8	-	-	-

3.4 Fracionamento dos extratos brutos por cromatografia em coluna de Sephadex G15

Para este fracionamento foi escolhido o extrato bruto de *Streptomyces sp.*, devido aos resultados positivos apresentados até então. O extrato foi fracionado em coluna de 10 cm de altura, empacotada com resina Sephadex G15 (GE Healthcare Lifesciences, USA), e o solvente utilizado para o fracionamento foi o isopropanol. O volume de extrato bruto fracionado foi de 3 mL. O fracionamento deu origem a 40 frações com volume aproximado de 3,3 mL cada, além de mais duas frações finais com volume de 13,2 mL, que não foram utilizadas para testes.

4. Avaliação da atividade inibitória das frações dos extratos

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana das frações por microdiluição

Para estas análises, as cepas e amostras utilizadas foram as mesmas que apresentaram inibição de crescimento na presença do extrato bruto, conforme resultados apresentados na seção 2.2.

As frações foram concentradas em três proporções diferentes (2, 3 e 5 vezes) para assegurar uma quantidade mínima de compostos inibitórios em cada uma. Sendo assim, três grupos de 150 μL de cada fração do extrato de *Streptomyces sp.* foram secos em capela, em temperatura ambiente, pelo tempo aproximado de 3 dias. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em metanol P.A. nos volumes de 75 μL (concentração 2x), 50 μL (concentração 3x) e 30 μL (concentração 5x).

O teste de microdiluição foi realizado conforme já descrito no item 2.2. Os testes com as frações concentradas 2 e 3 vezes não apresentaram resultados inibitórios, mas os testes com a fração concentrada 5 vezes levaram a ausência de crescimento de *E. faecalis* ATCC29212, *S. aureus* Rib1, *S. aureus* BEC9393, *P. aeruginosa* ATCC27853 e *S. aureus* N315 para várias frações, que podem ser agrupadas em cinco blocos. O grupo 1 é composto pelas frações 3 a 8, o grupo 2, pelas frações 11 a 15, o grupo 3, pelas frações 19 a 22, o grupo 4 pelas frações 27 a 30 e o grupo 5 apresenta as frações 35 a 39. Todas as frações representadas nestes grupos mostraram resultados inibitórios. A Figura 5 apresenta os resultados de inibição para os testes com as frações mais concentradas.

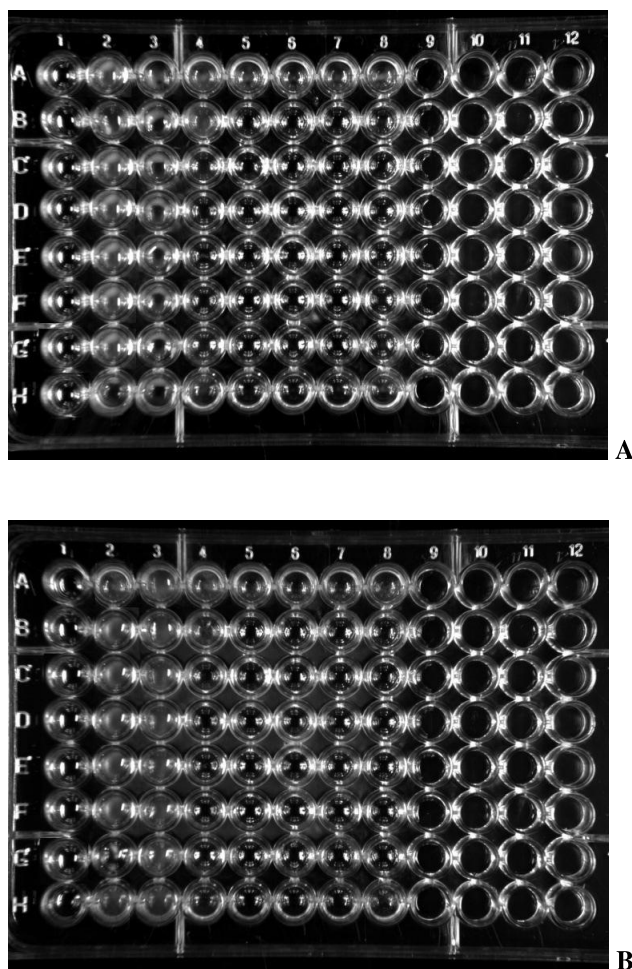


Figura 5: Teste de frações concentradas 5 vezes do extrato de *Streptomyces sp.* em *E. faecalis* ATCC29212 (A) e em *S. aureus* N315 (B). Coluna 1 a 3: controles do meio, do metanol e do inoculo bacteriano. Colunas 4 a 8: teste de frações. Cada *well* representa uma fração diferente. Colunas 9 a 12: vazias.

4.2 Avaliação da atividade das frações por disco-difusão

Paralelamente à avaliação das frações por microdiluição, foi feito o teste das mesmas em disco-difusão, como forma de confirmação dos resultados obtidos. Os testes foram realizados da mesma forma que os de extratos brutos, descritos na seção 2.1. Cada fração foi aplicada em discos de papel filtro próprios para este teste, tomando-se o cuidado de aplicá-los já secos na placa

semeada. Após a incubação das placas em estufa a 37°C por 18-24 horas, realizou-se a avaliação da presença de halos de inibição. A Figura 6 ilustra os resultados do teste.

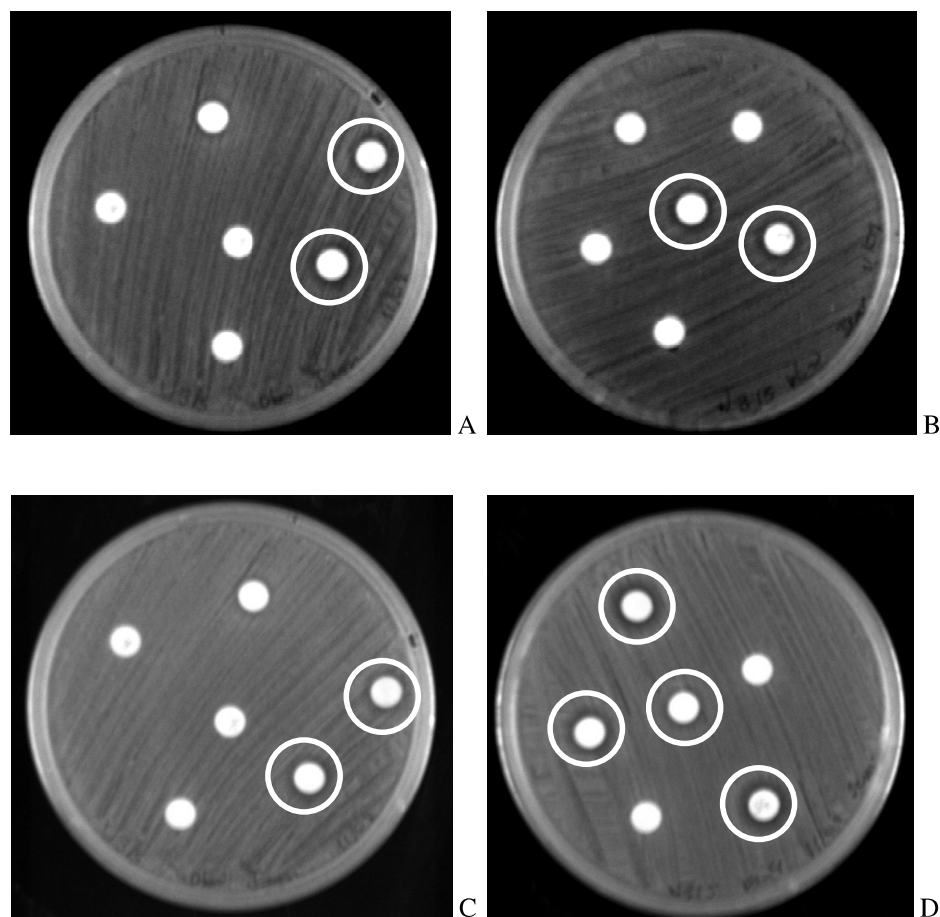


Figura 6: Resultados do teste de disco-difusão da cepa *S. aureus* N315 com as frações do extrato de *Streptomyces* sp. Em destaque, as frações que apresentaram halo de inibição de crescimento. Cada disco apresenta uma fração do extrato, sendo testadas 6 frações por placa.

As frações que apresentaram resultados inibitórios foram: 5, 6, 12, 19, 21, 28, 35, 37, 38 e 39, com halos de inibição entre 8 e 12mm.

5. Identificação provável dos compostos ativos

5.1 Espectrometria de Massas pelo método *FullScan*

A identificação dos prováveis compostos presentes no extrato bruto de *Streptomyces sp.* e em suas frações se deu com o uso de espectrometria de massas, em parceria com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e sua equipe, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) - USP. Para tanto, o extrato bruto e as frações que apresentaram resultados inibitórios foram analisadas em espectrômetro de massas (XevoTQ acoplado a UPLC Aquity, Waters Corporation, USA), no modo *FullScan* positivo e negativo. As amostras foram diluídas em acetonitrila para a ionização pelo aparelho, de forma a não saturar os sinais a serem obtidos. Ao todo, 400µL de cada amostra foram injetados para a captura dos picos. Os resultados obtidos estão expressos nas figuras 7 a 10.

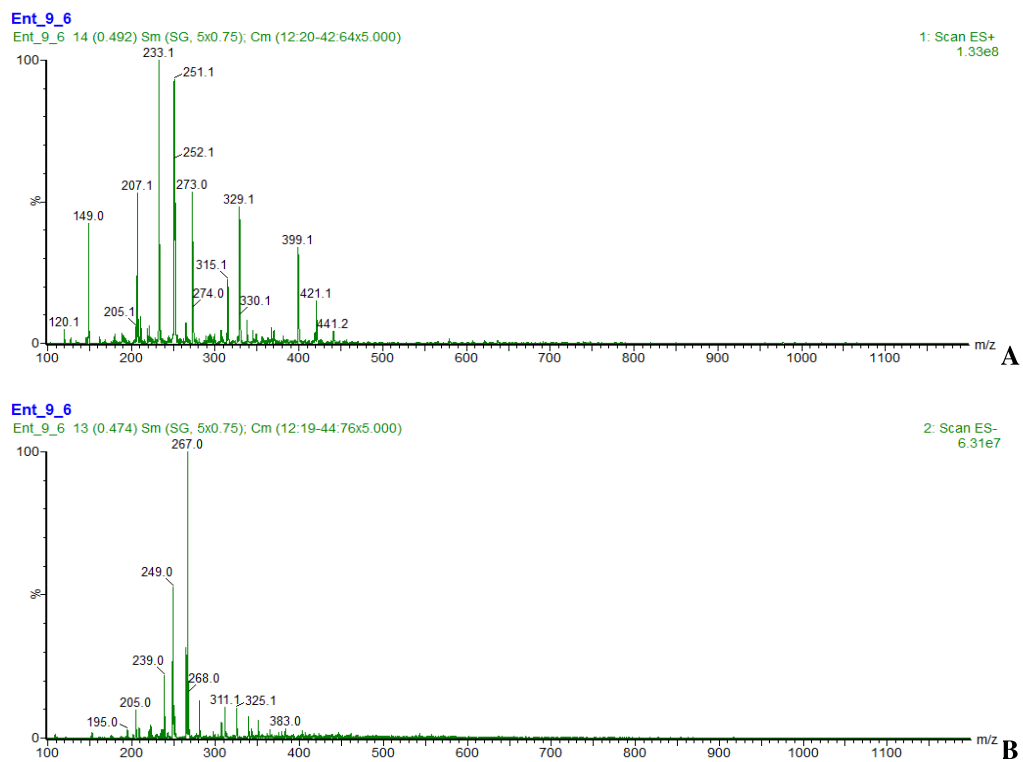
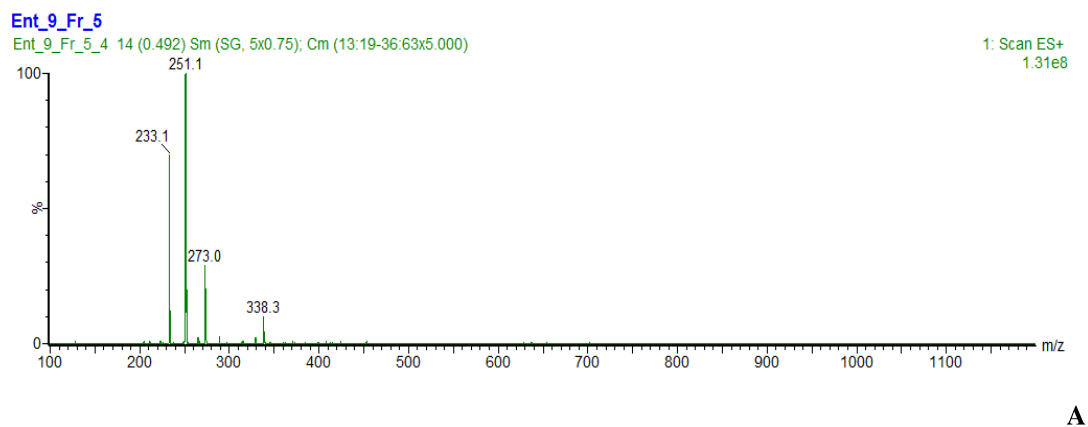


Figura 7: Espectrometria de Massas - Extrato Bruto. A: modo positivo B: modo negativo



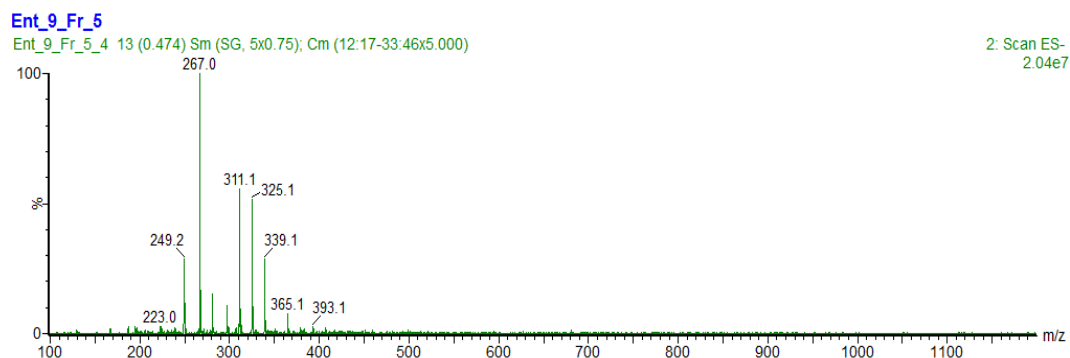
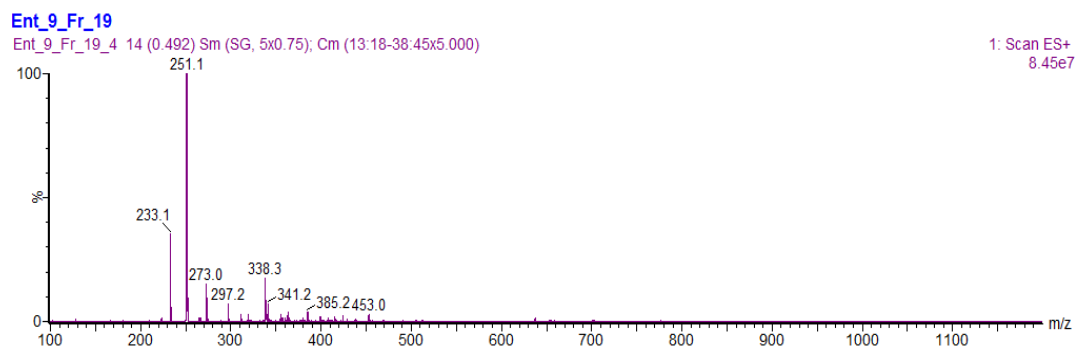
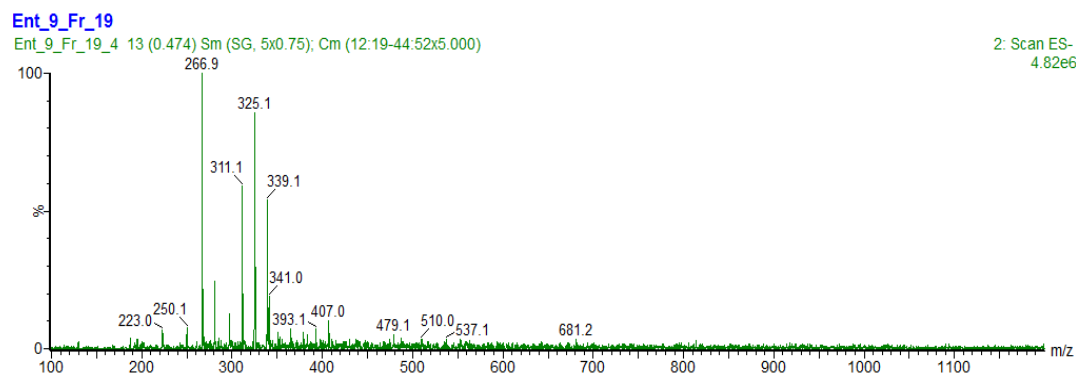
**B**

Figura 8: Espectrometria de Massas das Frações Ativas: Fração 5 (início do fracionamento). A: modo positivo de análise. B: modo negativo de análise.

**A**

B

Figura 9: Espectrometria de Massas das Frações Ativas: Fração 19 (meio do fracionamento). A: modo positivo de análise. B: modo negativo de análise.

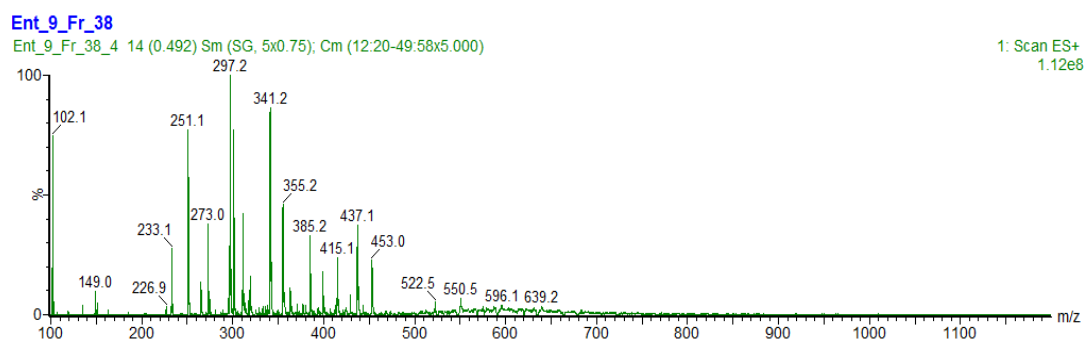
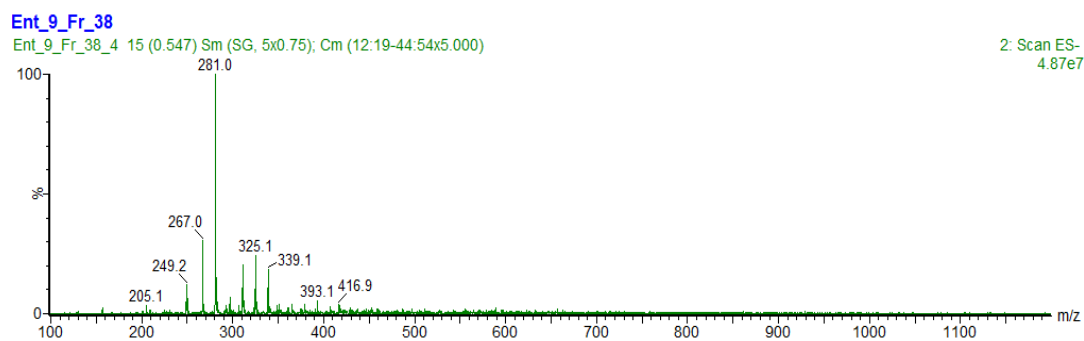
**A****B**

Figura 10: Espectrometria de Massas das Frações Ativas: Fração 38 (fim do fracionamento). A: modo positivo de análise. B: modo negativo de análise.

Pode-se observar pelo padrão dos espectros, que a amostra bruta apresenta um perfil simples, e as frações são muito parecidas entre si e com o extrato bruto, pois diversos picos se repetem em todos os resultados.

5.2 Espectrometria de Massas in Tandem (MS/MS)

Para refinar os resultados, foi realizada a espectrometria de massas in *tandem*, também conhecida por MS/MS, para decompor os sinais obtidos e assim facilitar o trabalho de identificação estrutural. Foram escolhidos alguns picos obtidos no sinal *FullScan* do extrato bruto para a decomposição: o pico m/z 251, do espectro positivo de análise, e os picos m/z 265, m/z 267 e m/z 281 do espectro negativo. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 11 a 14.

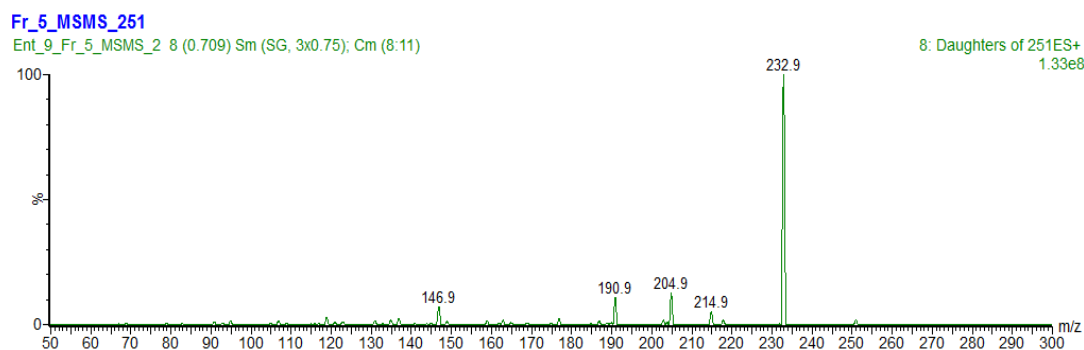


Figura 11: Espectro de íons produtos (MS/MS) do pico m/z 251 em modo positivo de análise

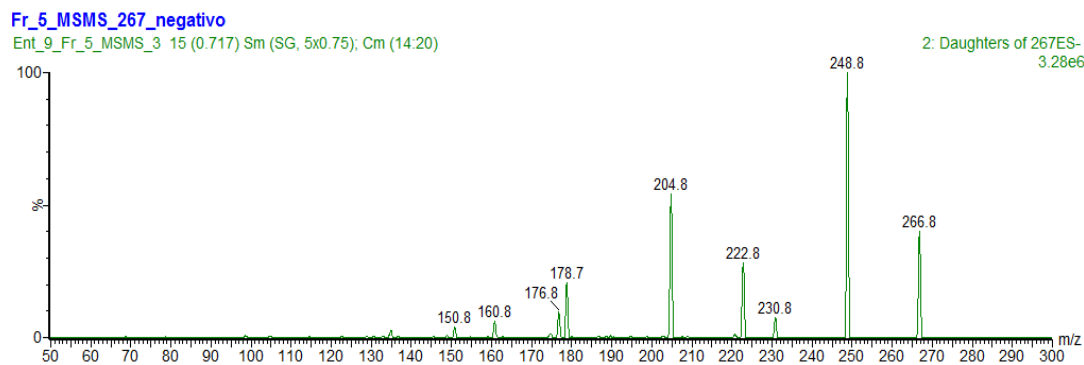


Figura 12: Espectro de íons produtos (MS/MS) do pico m/z 267 em modo negativo de análise.

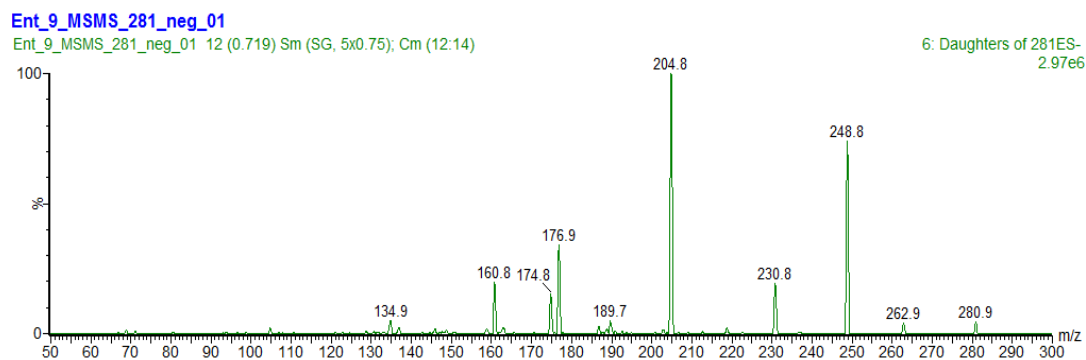


Figura 13: Espectro de íons produtos (MS/MS) do pico m/z 281 em modo negativo de análise.

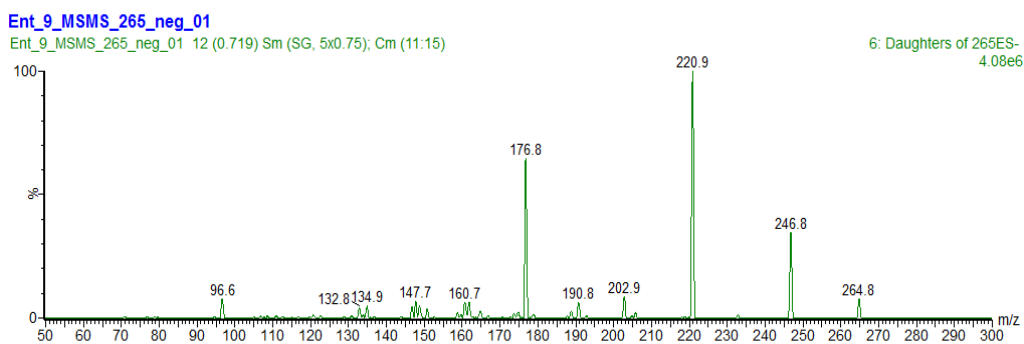
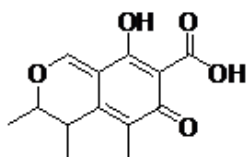


Figura 14: Espectro de íons produtos (MS/MS) para o pico m/z 265 em modo negativo de análise

De posse destes dados, procedeu-se, com o uso de dados da literatura, como a versão *on-line* do Dictionary of Organic Compounds e a biblioteca de espectros obtidos através de testes realizados no laboratório, a tentativa de elucidação estrutural dos compostos presentes no extrato. Os indícios apontam para a presença de citrinina (Figura 15), além de compostos fenazínicos, como a fencomicina e seus derivados (Figura 16).



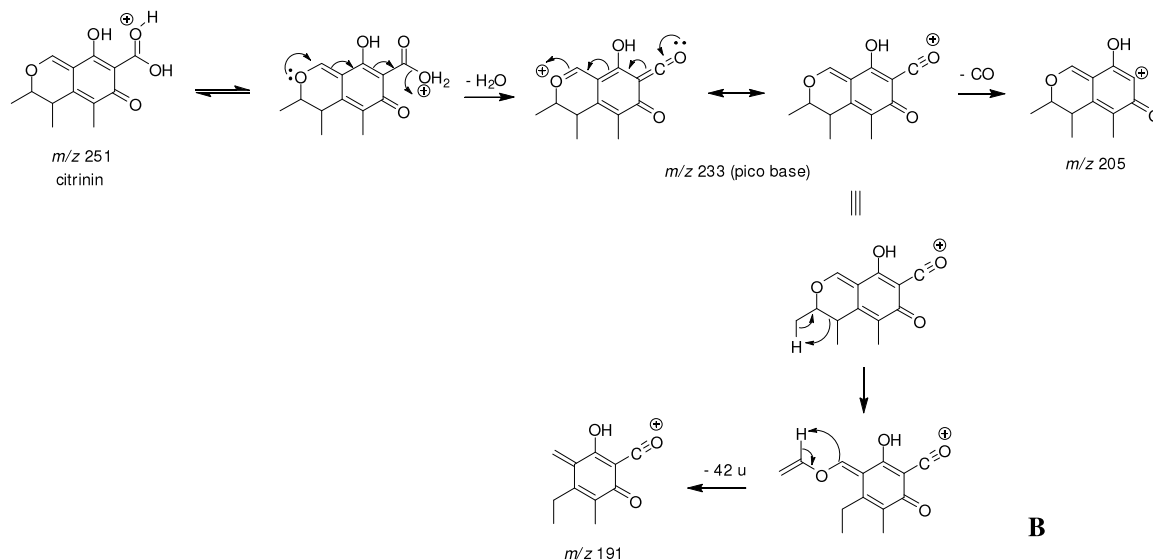


Figura 15: A: Fórmula estrutural da citrinina ($C_{13}H_{14}O_5$). (Fonte: Dictionary of Organic Compounds). B: Proposta de fragmentação dos principais íons presentes no espectro de massas de íons produtos do pico m/z 251 (Figura 11) modo positivo de análise para a confirmação estrutural.

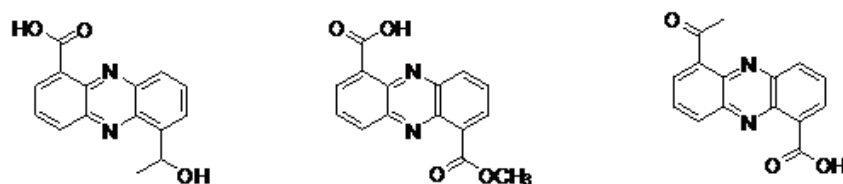


Figura 16: Prováveis estruturas químicas dos alcalóides fenazinas identificados pelo espectro de massas em modo negativo de análise. A: ácido safênico ($C_{15}H_{12}N_2O_3$). B: Fencomicina ($C_{15}H_{10}N_2O_4$). C: Ácido 6-acetil-1-fenazinocarboxílico (Fonte: Dictionary of Organic Compounds).

5. Teste de susceptibilidade à citrinina comercial

Os microrganismos que apresentaram inibição do crescimento nos testes realizados com o extrato de *Streptomyces sp.* (vide Tabela V) foram submetidos a testes com o uso de citrinina comercial, isolada do fungo *Penicillium citrinum*. Foram realizados tanto testes em meio sólido, com o gotejamento de solução de citrinina sobre a placa, quanto testes de microdiluição. Além das bactérias que tiveram inibição do crescimento na presença do extrato, a citrinina foi testada também em *K. pneumoniae* ATCC13883, que não apresentou inibição de crescimento em contato com o extrato de *Streptomyces sp.*, como forma de controle e verificação de uma possível toxicidade da molécula.

Nos testes de gotejamento, todos os microrganismos testados apresentaram uma zona de inibição de crescimento no local de aplicação da citrinina, menos *K. pneumoniae* ATCC13883, que não apresentou inibição do crescimento. Já no teste de microdiluição, somente *S. aureus* Rib1, *E. faecalis* ATCC29212 e *P. aeruginosa* ATCC27853 apresentaram inibição de crescimento, na mesma concentração que o extrato bruto de *Streptomyces sp.* (0,5µg/µL). As figuras 17 e 18 ilustram os resultados dos testes.

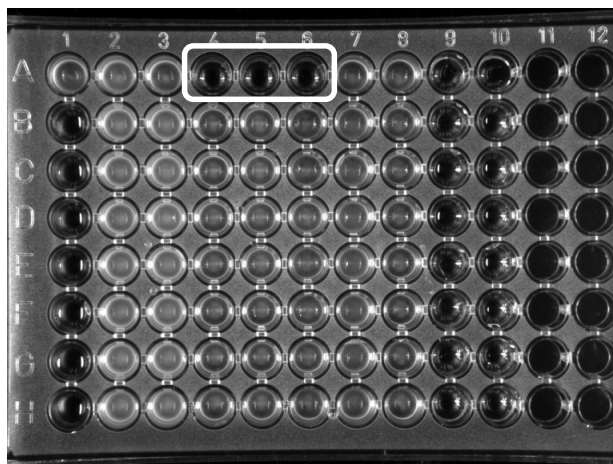


Figura 17: Teste de microdiluição utilizando citrinina comercial. No destaque, inibição do crescimento de *S. aureus* Rib1 (poço 4A), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (poço 5A) e *E. faecalis* ATCC 29212 (6A). Colunas 1 a 3: controles do meio, do inóculo e de metanol. Colunas 4 a 8: testes. Colunas 9 e 10: controle do meio. Colunas 11 e 12: vazias.

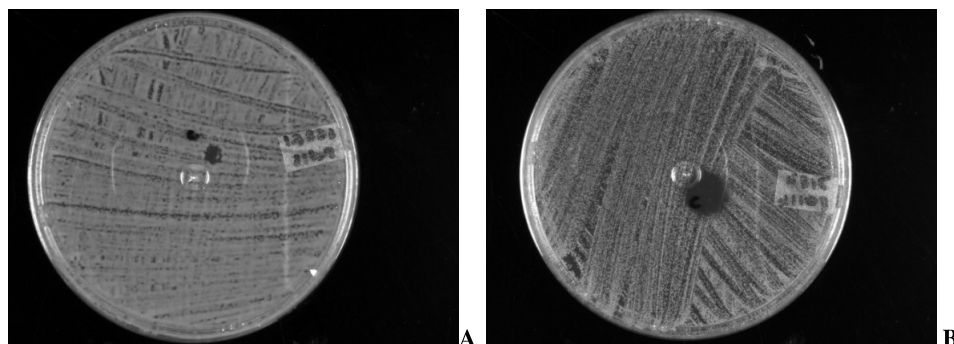


Figura 18: Teste de placas com citrinina comercial. A: *K.pneumoniae* ATCC13883, controle do teste, cujo crescimento não foi inibido pela citrinina. B: *S. aureus* N315 apresentando inibição do crescimento.

6. Resumo das etapas de pesquisa

A Figura 19 resume todas as etapas percorridas para a avaliação dos extratos, para facilitar o entendimento dos processos:

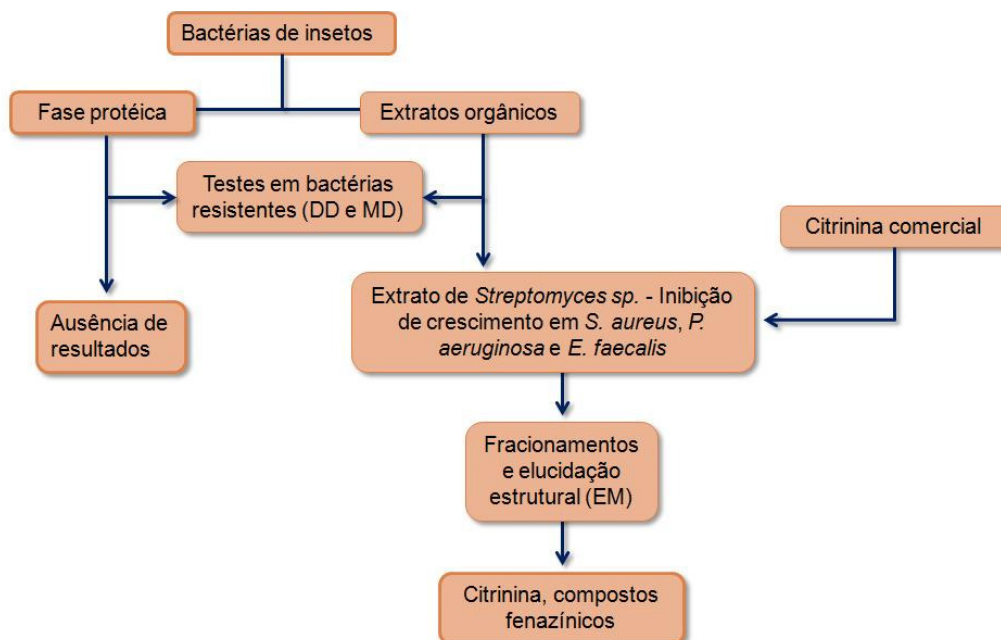


Figura 19: quadro ilustrativo das etapas de pesquisa, sintetizando os passos percorridos no projeto

DISCUSSÃO

A resistência bacteriana a antibióticos não é um problema recente, e cada vez mais tem se procurado alternativas para o desenvolvimento de novas drogas eficazes no combate a infecções, em especial a microrganismos resistentes aos medicamentos comumente utilizados para tratamento. O excesso e o mau uso dos antibióticos, aliados à capacidade adaptativa dos microrganismos no sentido de desenvolver diferentes mecanismos de resistência sob pressão seletiva são os principais fatores para o aumento deste quadro em proporções mundiais. O aumento de notificações de aparecimento de microrganismos resistentes, especialmente no ambiente hospitalar, aponta para uma situação de grande risco para os pacientes, pois muitos estão em situação delicada como internados em unidades de tratamento intensivas (CAI *et al.*, 2008) ou em cuidados pós-cirúrgicos (GOSWAMI *et al.*, 2011; MANUNGA *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de alternativas é urgente, porém diversas barreiras socioeconômicas e biológicas tem dificultado esse avanço. O investimento em pesquisas de longo prazo e alto custo, muitas vezes com baixo retorno, acaba por se tornar o principal motivo da desistência da pesquisa no segmento de antimicrobianos (LIVERMORE, D. 2012). No entanto diversas iniciativas mostram o quanto é importante que os setores de pesquisa invistam de forma incisiva nesta área, pois o problema da resistência bacteriana tem proporções globais, afetando um grande número de pessoas todos os anos, o que demonstra que o tema não pode ser negligenciado.

Um dos locais com grande potencial de novas fontes de antibióticos é o solo. Diversos microrganismos, como actinobactérias e mixobactérias, produzem uma infinidade de substâncias com aplicações variadas, inclusive antimicrobianas (GERTH *et al.*, 2003; REICHENBACH, 2001). Apesar dos apelos e da eminente importância destas alternativas, poucas pesquisas tem sido feitas atualmente para investigar o “resistoma” do solo cultivável, incluindo as actinobactérias com sabido

potencial, como as pertencentes ao gênero *Streptomyces* (WALSH, F. 2013). O solo é um potencial reservatório de genes de resistência aos antibióticos, mas ao mesmo tempo a presença de antibióticos na terra aponta para a existência de outros seres portadores de genes produtores destas substâncias, e este sistema pode ser observado pelo ponto de vista clínico (D’COSTA *et al. apud* WALSH, F., 2013), pois mesmo que uma pequena parcela dos microrganismos possa ser cultivada, já há boas evidências que apontam para a existência de um grande número de substâncias com potencial pouco explorado. Neste trabalho decidiu-se pela pesquisa dos microrganismos associados a insetos que habitam o solo pelo potencial já descrito, além da parceria estabelecida com o Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli e sua equipe, que já realizam o estudo do potencial destas bactérias na área agrícola, com sucesso, e puderam fornecer as amostras para que pudéssemos contribuir na ampliação da caracterização do potencial antibacteriano desses microrganismos.

A escolha das bactérias a serem testadas foi realizada de acordo com as espécies de microrganismos que mais apresentavam notificações de casos de resistência. Há diversos materiais na literatura que apontam para *S. aureus*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* como recorrentes em casos de infecções hospitalares e frequentemente associados a resistência aos antimicrobianos (JANSEN *et al.*, 2006; CUZON e NORDMANN, 2009). O laboratório contava com várias destas espécies, incluindo isolados clínicos e exemplares com resistência a antibióticos, e foi dada preferência para as espécies com maior facilidade de cultivo e cuja manipulação fosse possível dentro das normas de segurança do laboratório. Os testes de resistência ou susceptibilidade aos agentes antimicrobianos comerciais que foram realizados serviram para certificação da manutenção dos perfis de resistência relatados, o que foi confirmado com os experimentos, cujo resultado se pode observar na Figura 1. A resistência ao metanol também foi testada, mesmo com o uso em pequena quantidade, para garantir que não houvesse

interferência no crescimento bacteriano. Não houve alteração no crescimento, o que comprovou a segurança na utilização do metanol como diluente dos extratos.

O uso de técnicas como o método de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER *et. al.*, 1959; AMBAYE *et al.*, 1997) e microdiluição (MARYMONT, J.H. e WENTZ, R.M., 1966; ANDREWS, J, 2001) para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos foram preferidas por serem amplamente utilizadas, o que possibilita comparações de resultados. Os testes de microdiluição se apresentaram mais interessantes do que os testes de disco-difusão pela maior facilidade de contato dos agentes testados com os microrganismos, inclusive oferecendo os melhores resultados. De todos os extratos brutos testados, na técnica de microdiluição observou-se maior número de resultados positivos (3) do que com o uso dos discos (1). Acredita-se que isto ocorreu por conta da menor difusão do extrato no meio de cultura sólido, o que não ocorreu em meio líquido por conta da diluição homogênea do extrato no meio de cultura.

Os resultados obtidos com os testes de microdiluição para a avaliação da inibição de crescimento bacteriano com o uso dos extratos brutos (Tabela IV), indicaram que houve a inibição de crescimento na presença de extratos de *Streptomyces sp.*, *Microbacterium indicum* e *Arthrobacter nicotinivorans*, todas espécies de actinobactérias, o que ilustra a importância deste grupo como fonte potencial de moléculas antimicrobianas, reforçando a necessidade de pesquisas para ampliar as descobertas. O número de extratos ativos foi alto comparado com o número total de extratos testados, cerca de 30% do total (3 positivos/11 extratos), muito possivelmente por haver grande parte de material de actinobactérias, que possuem um histórico de produção de moléculas bioativas. Destaca-se ainda que os extratos inibiram o crescimento de bactérias resistentes a antimicrobianos, como *S. aureus* resistentes à metilicina (Tabela I), o que se torna outro ponto positivo para a ampliação do estudo desses microrganismos. As concentrações inibitórias mínimas ficaram em 3 µg/µL para os extratos de *Arthrobacter nicotinivorans* e *Microbacterium indicum* e

em 0,5 e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o extrato de *Streptomyces sp.*, dependendo da cepa ou amostra inibida. Estes valores de CIM para o extrato de *Streptomyces sp.* fizeram com que o prosseguimento dos testes fosse realizado com este material, pois por não haver valores teóricos para comparação segura, levou-se em conta um dos pontos importantes dentro da pesquisa de substâncias com potencial terapêutico, que é uma potencialidade de ação em baixas concentrações.

O enfoque dado ao extrato de *Streptomyces sp.*, devido ao seu melhor desempenho com relação aos valores de concentração inibitória mínima e ao número de cepas e/ou amostras inibidas levou ao fracionamento e à análise das frações para a identificação de moléculas bioativas presentes neste extrato. O fracionamento por cromatografia em camada delgada apontou que a maioria das frações obtidas possuía atividade inibidora frente os microrganismos testados (Tabela V). Das 8 frações obtidas, somente a Fração 8 não apresentou atividade inibitória contra nenhuma das cepas e/ou amostras testadas, ao passo que as Frações 1, 5 e 6 foram efetivas em todos os microrganismos testados. As Frações 2, 3, 4 e 7 apresentaram resultados variáveis, com algumas bactérias apresentando sensibilidade e outras não.

Ao se partir para uma análise de fracionamento mais refinada, com o uso de cromatografia em coluna, o número de frações do extrato de *Streptomyces sp.* aumentou significativamente (5 vezes), porém houve uma maior seleção das frações que apresentaram resultados inibitórios (Figuras 5 e 6). Além da seleção, também foi possível verificar uma maior homogeneidade nos resultados, pois os grupos de frações inibidoras foram os mesmos para todas as bactérias testadas, muito provavelmente pela padronização de separação que foi possível de ser obtida com o uso de colunas cromatográficas com resinas, como é o caso da Sephadex G15, cujo fracionamento se dá pela variação de massa molecular dos compostos existentes na amostra.

A espectrometria de massas, utilizada para a elucidação estrutural dos compostos presentes no extrato de *Streptomyces sp.*, revelou um padrão espectrométrico simples, além de frações com

um perfil muito parecido entre si e entre a amostra bruta, o que poderia indicar a presença de compostos de natureza química muito semelhante ou a presença de um único composto em abundância, ou ainda uma ou poucas moléculas com maior capacidade de ionização. De acordo com estes resultados, analisaram-se os picos do extrato bruto para a elucidação estrutural, com o uso de espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS), o que forneceu, junto com dados da literatura, obtidos no Dicionário de Compostos Orgânicos (<http://doc.chemnetbase.com/>) a sugestão da presença da molécula citrinina e de compostos fenazínicos, como a fencomicina (Figuras 15 e 16). Através das estruturas destas moléculas, deduziu-se, junto da análise dos valores de fragmentos formados na ionização, um caminho para a produção das substâncias identificadas, que se mostrou bastante satisfatório (Figura 15).

A análise dos dados da literatura sobre a citrinina e a fencomicina trazem poucas informações, sendo a maioria deles ligados a identificação estrutural e química das moléculas. A citrinina é uma micotoxina produzida por fungos, como *Penicillium citrinum*, *Guanomyces polythrix*, *Aspergillus terreus* e *Monascus* spp. (FLAJS, D; PERAICA, M., 2009; Dicionário de Compostos Orgânicos, 2012). Não há dados na literatura da produção deste composto por actinobactérias do gênero *Streptomyces*, o que sugere uma nova fonte de produção para esta molécula, que originalmente é obtida para fins comerciais de *P. citrinum* ou *Monascus* spp. (LIN *et al.*, 2008). Apesar de sua utilização como corante de alimentos, é mais conhecida por sua ação nefrotóxica e teratogênica em animais como porcos e ratos, sendo pouco influente em cães (FLAJS, D; PERAICA, M., 2009). Com relação a toxicidade em seres humanos, em testes *in vitro* com células embrionárias HEK293 (HSU *et al.*, 2012) e de leucemia promielocítica HL-60 houve a indução de apoptose em baixas doses (YU *et al. apud* FLAJS, D; PERAICA, M., 2009). Há então uma possibilidade de uso da citrinina como droga no combate ao câncer, mas não há na literatura estudos contundentes e de longo prazo. Além da ação citotóxica, sugere-se uma ação antimicrobiana (Dicionário de Compostos Orgânicos, 2012), evidenciada pela presença de trabalhos

que relatam seu desempenho, inclusive comparando-o a medicamentos como a ciprofloxacina (MAZUMDER *et al.*, 2002). A ação antimicrobiana sugerida para a molécula é o rompimento do DNA cromossomal bacteriano (MARTIN *et al.*, 1986)

O uso da citrinina comercial como uma forma de comparação entre os resultados obtidos com o extrato de *Streptomyces sp.* se mostrou satisfatório, uma vez que foi observada a inibição do crescimento de cepas que também foram inibidas com o extrato e o crescimento normal de uma cepa que não apresentou resultados positivos nos testes com os extratos, o que pode ser um reforço aos resultados da elucidação estrutural.

A fencomicina, outra molécula cuja presença foi sugerida pela análise espectrométrica, é fruto do metabolismo de *Pseudomonas spp.* e *Streptomyces spp.* (Dicionário de Compostos Orgânicos, 2012). Primeiramente descrita por Chatterjee *et al.* (1995), poucas informações estão disponíveis na literatura, sendo a maioria relacionadas a sua síntese e identificação estrutural (Dicionário de Compostos Orgânicos, 2012). Sugere-se uma ação antimicrobiana, através de sua intercalação na molécula de DNA, além de sugerida ação antitumoral (MAUL *et al.*, 1999).

Através dos dados da literatura, verifica-se que há alguns indícios de utilização das moléculas encontradas como agentes antimicrobianos e antitumorais, porém não há muita clareza sobre as vias metabólicas nem tampouco sobre seus mecanismos de ação, o que mostra que há muito a se descobrir sobre estes compostos, levando a uma definição mais clara sobre o uso efetivo destes como alternativas na cura de infecções ou tumores. O que é indiscutível é a importância das fontes pouco exploradas de novas drogas na busca de alternativas para contornar a situação atualmente enfrentada. Diante destes fatos, deve-se inclusive levar em conta se a questão da toxicidade não seria um fator mínimo diante dos benefícios que o uso destas moléculas poderia trazer no combate destas doenças.

As frações protéicas de todos os microrganismos utilizados para a preparação de extratos foram analisadas em busca de bacteriocinas, peptídeos produzidos por microrganismos, que podem apresentar funções antimicrobianas contra grupos próximos (KLAENHAMMER, T.R., 1993). É sabida que a ação das bacteriocinas é bastante eficaz, sendo estas utilizadas amplamente na indústria alimentícia na conservação de vários tipos de produtos (MILLS *et al*, 2011). Além disto, dentre as bactérias identificadas e selecionadas para produção de extratos orgânicos, diversas delas são notadamente produtoras de peptídeos com função antimicrobiana, como *Bacillus subtilis*, produtor de subtilisina (KAWULKA *et al.*, 2004) e *Streptomyces spp.*, produtor de diversos peptídeos (WANG *et al.*, 2012). Na extração dos compostos orgânicos produzidos pelos microrganismos, a fase aquosa, onde se encontravam peptídeos produzidos e resíduos celulares, foi processada e aproveitada para a exploração deste potencial.

As frações peptídicas foram processadas com acetona, para precipitação e concentração destes peptídeos, um método tradicionalmente utilizado e com muitas vantagens em relação a outros, como a extração utilizando-se sulfato de amônio, pois há maior recuperação de peptídeos em menor intervalo de tempo (PHAM *et al.*, 2011). A determinação da concentração protéica, realizada via teste de Bradford (BRADFORD, 1976), revelou uma baixa concentração de peptídeos nas amostras, com valores entre 0,005 e 0,1 µg/mL, o que pode ter interferido negativamente nas análises, levando a ausência de atividade inibitória frente aos microrganismos testados. Como a presença de peptídeos já era esperada devido à natureza dos microrganismos cultivados, a quantidade insuficiente de peptídeos com atividade antimicrobiana ou até mesmo sua ausência - pois o teste de Bradford é inespecífico e não tem função de identificar os tipos de peptídeos presentes - acabaria sendo responsável pela incapacidade de ação inibitória do crescimento das cepas e/ou amostras causadoras de infecção hospitalar.

Outra hipótese cogitada para o insucesso dos testes com peptídeos foi a desnaturação protéica. Variações no pH, bem como condições inadequadas de armazenamento e temperaturas inapropriadas poderiam levar à inativação dos peptídeos presentes. Há também relatos descritos na literatura que resíduos de acetona oriundos da precipitação proteica podem levar à modificação de aminoácidos na cadeia proteica, por exemplo, com a substituição de glicina por prolina (SIMPSON, D.M; BEYNON, R.J., 2010). Com a modificação na sequência, há a consequente perda de função, o que acarretaria a ineficácia do peptídeo como agente antimicrobiano. Esta modificação poderia agravar ainda mais o quadro de baixa concentração de peptídeos na amostra, diminuindo ou anulando a presença de material ativo.

De uma forma geral, os resultados obtidos neste trabalho permitem dar um novo fôlego à pesquisa de novas moléculas com potencial antimicrobiano, uma vez que o enfoque foram microrganismos associados a insetos do solo, uma parte importante do ecossistema e fonte de recursos diversos ainda pouco explorados. Eles também reforçam a ideia apresentada por Walsch (2013) de que toda fonte de compostos ativos, especialmente o “resistoma” do solo, deve ser observada com atenção na busca de soluções para o problema de resistência antimicrobiana, em especial os microrganismos, uma excelente fonte de agentes antimicrobianos desde o advento deste tipo de drogas. Mesmo diante das dificuldades de cultivo e do pequeno número de espécies com manutenção viável no laboratório, as vantagens desta fonte de moléculas ainda são muito grandes.

Alem disto, nossos resultados corroboram as hipóteses da literatura de que as actinobactérias são uma excelente fonte de moléculas bioativas, uma vez que de todos os extratos testados, os que apresentaram resultados promissores foram os oriundos de bactérias pertencentes a este grupo. A diversidade de moléculas e versatilidade de ação das mesmas são pontos positivos e relacionados com os artigos de Gerth (2003) e Reichenbach (2001), pois os dados da literatura sugerem que há uma produção de moléculas variadas pelas actinobactérias, além de uma grande

diversidade de atividades relacionadas a estas moléculas, e muito possivelmente ainda existem outras substâncias e mecanismos de ação que não foram descritos.

Um ponto importante a ser ressaltado é a grande variedade de microrganismos produtores de uma mesma molécula bioativa, que foi observado na consulta a dados da literatura, muito provavelmente por conta de sua ação benéfica nos casos de competição por recursos do ambiente (FOLSE, H.J; ALLISON, S.D. 2012). Porém, os resultados se mostram inovadores ao apontar a produção de uma destas moléculas, a citrinina, por uma fonte ainda desconhecida, o gênero *Streptomyces*, e mais interessante, por apresentar a produção de compostos com alguma função competidora mesmo em culturas puras cultivadas a partir de estoques dos microrganismos. Não se sabe ao certo os motivos pelos quais esta produção ocorreu, mas acredita-se que o estresse do ambiente de cultivo, que permanece inalterado durante o período de crescimento, possa influenciar na produção destas substâncias, ou que estas acabem sendo somente produtos residuais do metabolismo normal celular.

O estudo foi realizado utilizando-se como base culturas puras, porém o uso de diferentes condições de cultivo poderia ser interessante para a indução da produção dos compostos que conseguimos identificar em quantidades diferentes das obtidas, ou até mesmo a produção de novas moléculas que não foram identificadas em nossos testes. Uma outra maneira de estimular esta produção diferenciada seria o uso de co-culturas ou o uso de meios condicionados com outros organismos, simulando assim uma condição de competição que favoreceria as condições de aparecimento de moléculas novas e com potencial interesse antimicrobiano.

Os resultados obtidos não permitiram identificar peptídeos com ação antimicrobiana, devido às dificuldades de obtenção de moléculas com potencial ativo, mas investigações futuras são necessárias para confirmar a produção destes compostos por parte das bactérias analisadas, uma vez

que há relatos na literatura apontando para esta produção por *Streptomyces spp* (WANG *et al.*, 2012).

Como passos futuros pode-se ressaltar a continuidade de pesquisas para a elucidação de mecanismos biossintéticos que levam à produção destas moléculas, além de mais testes para avaliação de novas potencialidades de uso para estas moléculas e o aperfeiçoamento dos experimentos para o levantamento de mais dados a respeito da potencialidade já conhecida. Outra possibilidade de continuidade destes estudos é a detecção de compostos em culturas mistas e/ou em situações de estresse, para avaliar moléculas produzidas nessas condições.

CONCLUSÕES

Ao observar a ação de extratos de bactérias oriundas de diversos insetos, considerados pragas agrícolas, no combate a infecções causadas por bactérias causadoras de infecções hospitalares, e realizar o fracionamento químico e identificação das moléculas bioativas presentes nos extratos nos permite concluir que:

Os extratos que apresentaram resultados inibitórios nos testes de susceptibilidade foram os extratos de *Arthrobacter nicotinivorans*, *Streptomyces sp.* e *Microbacterium indicum*, contra diversas cepas e/ou amostras de *S. aureus*, em especial as cepas resistentes à meticilina, *E. faecalis* ATCC29212 e *E. faecalis* 6778, além de *P. aeruginosa* ATCC27853. O extrato de *Streptomyces sp.* apresentou o maior número de cepas/amostras inibidas, além dos menores valores de Concentração Inibitória Mínima.

A análise das frações e do extrato bruto de *Streptomyces sp.* por meio de Cromatografia em Coluna e Espectrometria de Massas nos modos *FullScan* positivo e negativo indicou um perfil cromatográfico semelhante em todas as análises, com destaque para alguns picos. Ao se realizar a Espectrometria de Massas *in Tandem* (MS/MS) destes picos, juntamente com dados da literatura, pode-se sugerir a presença dos compostos citrinina e fencomicina, além de outros alcaloides fenazínicos. Estes, de acordo com dados da literatura, apresentam diversas funções, como papel antimicrobiano, o que foi observado neste trabalho, além de uma suposta função antitumoral.

Pode-se concluir também que as fontes biológicas de obtenção dos compostos verificados na análise podem ser diferentes das indicadas na literatura, pois não existem relatos da produção de citrinina por *Streptomyces spp.*, o que foi observado neste trabalho.

Pudemos concluir que microrganismos oriundos de associações com insetos presentes no solo são fontes bastante ricas de compostos com função antimicrobiana ou com outras funções, se

mostrando então uma alternativa para contornar o problema da resistência antimicrobiana enfrentada atualmente, especialmente no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias que infectam os seres humanos.

Este trabalho sugere que novas potencialidades das moléculas que foram identificadas podem ser estudadas, bem como novos testes devem ser realizados para ampliar as informações do poder antimicrobiano destas substâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBAYE *et al.* (1997). **Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex.** Journal of Clinical Microbiology, v. 35(4): 847-52.
- ANDREWS, J. (2001). **Determination of Minimum Inhibitory Concentrations.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.48:5-16.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A. (2005). **Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors.** Trends in Parasitology, v. 21 (12): 568-571.
- BARKER, K.F. (1999). **Antibiotic resistance: a current perspective.** British Journal of Clinical Pharmacology, v. 48(2): 109-124.
- BAUER, A.W.; PERRY, D.M.; KIRBY, W.M. (1959). **Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci; an analysis of technique and results.** A.M.A Archives of Internal Medicine, v.104(2): 208-216.
- BRADFORD, M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v. 72: 248-254.
- CAI *et al.*; (2008). **Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediate carbapenem-hydrolyzing-beta lactamase KPC-2 in intensive care units from a Chinese hospital.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52: 2014-2018.

CAZZOLA, M.; ROGLIANI, P.; CURRADI, G.(2007). **Bacterial extracts for the prevention of acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: a point of view.** Respiratory Medicine, v. 102: 321-327.

CHATTERJEE *et al.*(1995). **Phencomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* species HIL Y-9031725.** The Journal of Antibiotics, v.48(11):1353-1354.

CLEVELAND, J. et al.(2001). **Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation.** International Journal of Food Microbiology, v.71: 1-20.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2003). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio; Norma Aprovada – Sexta Edição. Norma M7-A6.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

COLLIN,F; KARKARE, S.; MAXWELL, A. (2011). **Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 92 :479–497

COURVALIN, Patrice. (2006). **Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci.** Clinical Infectious Diseases, v.42:S25–34.

CUZON et al. (2010). **Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumonia* Isolates in France.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55(5): 2420-2423

CUZON, G.; NORDMANN, Naas P. (2009). **Carbapénèmases de type KPC: quel enjeu en microbiologie clinique?** Pathologie Biologie, v. 58: 39-45.

DEL PELOSO, P.; BARROS, M.; SANTOS, F.(2010). **Sepse por *Serratia marcescens* KPC.** Jornal Brasileiro de patologia e Medicina Laboratorial, v. 46(5):365-367.

DICTIONARY OF ORGANIC COMPOUNDS. Versão *on-line*. Disponível em: www.doc.chemnetbase.com. Acesso em 23 mar. 2013.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M.(2003). **The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions**. Annual Review of Entomology, v. 49: 71-92.

DŽIDIC S, ŠUŠKOVIC J, KOS B.(2008). **Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects**. Food Technolgy and Biotechnology , v. 46:11-21.

ELSTON, J.W.T.; BARLOW, G.D. (2009). **Community-associated MRSA in the United Kingdom**. Journal of Infection, v. 59: 149-155.

FLAJS, D; PERAICA, M. (2009). **Toxicological properties of citrinin**. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju, v. 60(4):457-464.

FOLSE, *H.J. 3rd*; ALLISON, S.D. (2012) **Cooperation, competition, and coalitions in enzyme-producing microbes: social evolution and nutrient depolymerization rates**. Frontiers in Microbiology, v. 3:338.

GALES et al. (2006). **Emergence of linezolid resistant *Staphylococcus aureus* during treatment of pulmonary infection in a patient with cystic fibrosis**. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 27: 300-302.

GARCÍA et al. (2010). **Clinical Outbreak of Linezolid-Resistant *Staphylococcus aureus* in an Intensive Care Unit**. Journal of American Medical Association, v. 303(22): 2260-2264.

GERTH et al. (2003). **Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities – past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium***. Journal of Biotechnology, v.106: 233-253.

GEDRAITIENÉ *et al.*, (2011). **Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria.** Medicina (Kaunas), v. 47(3):137-46.

GOSWAMI *et al.* (2011). **Antibiotic sensitive profile of bacterial pathogens in postoperative wound infections at a tertiary care hospital in Gujarat, India.** Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, v.2(3):158-164.

GRUDMANN, H.; AIRES-DE-SOUSA, M.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. (2006) **Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat.** Lancet, v.368:874-85.

GUPTA *et al* (2003). **Extended Spectrum β Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature.** Journal of Perinatology v. 23:439–443

GUTTMAN *et al.* (1984). **The Possible Role of Porins in Bacterial Antibiotic Resistance.** Annals of Internal Medicine, v. 101(4):554-557.

HERRANZ *et al.* (2006). **Use of bacterial extracts to enhance amino acid breakdown in dry fermented sausages.** Meat Science, v. 72: 318-325.

HILL *et al.*, (2010). **Linezolid-resistant ST36 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with prolonged linezolid treatment in two paediatric cystic fibrosis patients.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65: 442–445.

HIRAMATSU, K. *et al.* (1997). **Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin.** The Lancet, 350: 1670-1673.

HSU *et al.* (2012). **Protective effect of deferricoprogen isolated from *Monascus purpureus* NTU 568 on citrinin-induced apoptosis in HEK-293 cells.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60(32): 7880-7885.

HUBER *et al.* (2000). **Immunogenicity of an *E. coli* extract after oral or intraperitoneal administration: induction of antibodies against pathogenic bacterial strains.** International Journal of Immunopharmacology, v. 22: 57-68.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA (IDSA) (2010). **The 10X'20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020.** Clinical Infectious Diseases v. 50:1081–1083

INGEN *et al.* (2012). **Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria.** Não publicado.

JACK, R.W; Tagg, J.R.; Ray, B. (1995). **Bacteriocins of Gram-positive bacteria.** Microbiology Reviews, v.26(2): 171-200.

JANSEN, E. F.; HIRSCHMANN, D. J. (1944) **Subtilin, an antibacterial substance of *Bacillus subtilis*. Culturing conditions and properties.** Archives of Biochemistry, v. 4, p. 297-309, 1944.

JANSEN, W.T.M *et al.* (2006). **Bacterial resistance: a sensitive issue Complexity of the challenge and containment strategy in Europe.** Drug Resistance Updates, v. 9: 123-133.

KAMBOJ *et al.* (2011). **Emergence of Daptomycin-Resistant VRE: Experience of a Single Institution.** Infection Control and Hospital Epidemiology, v. 32(4): 391-394

KAMBOJ *et al.* (2011). **Emergence of daptomycin-resistant VRE: experience of a single institution.** Infection Control and Hospital Epidemiology, v.32(4):391-394.

KANAFANI et al. (2007). **Infective endocarditis caused by daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: A case report.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases, v. 39(1): 75-77.

KANAFANI, Z.A.; FEDERSPIEL, J.J., FOWLER, V.G.(2007). **Infective endocarditis caused by daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis*: a case report.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases, v.39(1):75-77.

KAWULKA *et al.*(2004) **Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives.** Biochemistry, v. 43(12): 3385-3395.

KLAENHAMMER, T.R. (1993). **Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.** FEMS Microbiology Reviews, v.12(1-3): 39-85.

KOLÁŘ, Milan; URBÁNEK, Karel; LÁTAL, Tomáš. (2001). **Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 17: 357-363.

LAMBERT, P.A. (2002). **Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria.** Symposium series (Society for Applied Microbiology), (31):46S-54S.

LEÃO et al. (2010). **KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter-related infection.** Clinical Microbiology and Infection, v.17(3):380-382.

LENCASTRE,H.; OLIVEIRA, D.; TOMASZ, A.(2007). **Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power.** Current Opinion in Microbiology,v.10:428-35.

- LIN *et al.* (2008). **Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.77(5):965-973.
- LIVERMORE, D. (2012). **Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram- Negative Pathogens.** Korean Journal of Internal Medicine, v.27:128-142
- LONG *et al.*(2005). **Daptomycin resistant *Enterococcus faecium* in a patient with acute myeloid leukemia.** Mayo Clinic Proceedings, v. 80: 1215-1216.
- MAHAMOUD *et al.*(2007). **Antibiotic efflux pumps in Gram negative bacteria: the inhibitor response strategy.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.59:1223–1229.
- MANUNGA, J. *et al* (2012). **Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Elective Surgical Patients at a Public Teaching Hospital: An Analysis of 1039 Patients.** The American Surgeon, v.78(10):1096-1099.
- MARTIN *et al.* (1986). **Action of Citrinin on Bacterial Chromosomal and Plasmid DNA In Vivo and In Vitro.** Applied and Environmental Microbiology, v. 52(6):1273-1279.
- MARTY *et al.* (2006). **Emergence of a clinical daptomycin resistant *Streptococcus aureus* isolate during a clinical treatment of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis.** Journal of Clinical Microbiology, v. 44: 595-597.
- MARYMONT, J.H. JR; WENTZ, R.M.(1966). **Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtitrator system.** American Journal of Clinical Pathology, v.45(5):548-551.
- MAUL *et al.*(1999). **Biomolecular-chemical screening: a novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites.** The Journal of Antibiotics, v. 52(12):1124-1134.

- MAZUMDER et al. (2002). **Antimicrobial activity of the mycotoxin Citrinin obtained from the fungus *Penicillium citrinum***. Ancient Science of Life, v.21(3):191-197.
- MILLS *et al.*(2011). **New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods**. Annual Review of Food Science and Technology, v. 2:299-329.
- MONROE, Sara; POLK, Ronald (2000). **Antimicrobial use and bacterial resistance**. Current Opinion in Microbiology, v. 3: 496-501.
- MONTEIRO et al. (2009). **First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumonia* strains in Brazil**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.53(10): 333-334.
- MONTERO, C; STOCK, F; MURRAY, P. (2008). **Mechanisms of Resistance to Daptomycin in *Enterococcus faecium***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.52(3) :1167–1170.
- MORAES et al. (2008). ***Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*. Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects**. Experimenal Parasitology, v. 118: 561-568.
- MOREIRA, M.A.; SOUZA, E.C.; MORAES, C.A. (2004). **Multidrug efflux systems in gram-negative bacteria**. Brazilian Journal of Microbiology , v. 35:19-28
- MOURA et al.(2010). **Resistência à mupirocina entre isolados de *Staphylococcus aureus* de profissionais de enfermagem**. Acta Paulista de Enfermagem, v. 3 (3): 399-403.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. (2011). **Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae***. Emerging Infectious Diseases v. 17(10) :1791-1798.
- NORDMANN, P; CUZON, G.; NAAS, T. (2009). **The real threat of *Klebsiella pneumonia* carbapenemase-producing bacteria**. Lancet infect, v. 9: 228-236.

PANKEY, G.; ASHCRAFT, D.; PATEL, N. (2005). **In vitro synergy of daptomicyn plus rifampicin against *Enterococcus faecium* resistant to both linezolid and vancomycin.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49:5166-5168.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A.(2005).**Extended spectrum beta lactamases: a dinamical update.** Clinical Microbiology Reviews, v. 28: 657-686.

PAVEZ et al.(2008). **Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2 type AmpC beta-lactamase in Brazil.** Journal of Medical Microbiology, v. 57: 1590-1592.

PEIRANO et al.(2008). **Carbapenem –hydrolysing beta lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil.** Journal of Infectious Diseases, v.10(4): 251-253.

PHAM et al.(2011). **Purification and characterization of novel fibrinolytic proteases as potential antithrombotic agents from earthworm *Perionyx excavatus*.** AMB Express, v. 1:26.

POIREL et al. (2005). **Association of plasmid mediated quinolons resistance with extended spectrum beta lactamase VEB 1.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49: 3091-3094.

PROJAN, S. (2003). **Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery?.** Current Opinion in Microbiology, v. 6:427–430

PUMPUNI et al. (1993). ***Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by Gram-Negative bacteria.** Experimental Parasitology, v. 77: 195-199.

RAGHUNATH, D. (2008). **Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India.** Journal of Biosciences, v. 33(4):593-603.

REICHENBACH, H. (2001). **Myxobacteria, producers of novel bioactive substances.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 27: 149-156.

RICE, L.B. (2006). **Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria**. The American Journal of Medicine, v. 119(6) Suplemento 1:S11-S19.

RÜTTIMANN *et al.*(2004). **Long-term antibiotic cost savings from a comprehensive intervention program in a Medical Department of a University-Affiliated Teaching Hospital**. Clinical Infectious Diseases, v. 38 (3):348-356.

SADER et al. (2011). **Antimicrobial activity of daptomycin tested against gram-positive strains collected in European hospitals: results from 7 years of resistance surveillance (2003-2009)**. Journal of Chemotherapy, v. 23(4): 200-206.

SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; JONES, R.N. (2011). **Antimicrobial activity of daptomycin tested against gram-positive strains collected in European hospitals: results from 7 years of resistance surveillance (2003-2009)**. Journal of Chemotherapy, v. 23 (4): 200-206

SCHMITZ, FRANZ J.; JONES, Mark E. (1997). **Antibiotics for treatment of infection caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices?** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 9: 1-19.

SCHULZ et al., (2005). **Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus sp.* para conservação e processamento de alimentos**. Alimentos e Nutrição Araraquara, V. 16(4): 403-411.

SEDELMEIER, Eva; BESSLER, W.G. (1995). **Biological activity of bacterial cell-wall components: immunogenicity of the bacterial extract OM-89**. Immunopharmacology, v. 29: 29-36.

SERAL *et al.*(2012). **Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study**. Clinical Infectious Diseases, 54(5):621-629.

SERAL, C.; GUDE, J.; CASTILLO, F.J. (2012). **Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options.** Revista Espanhola de Quimioterapia, v.25(2):89-99.

SIMPSON, D.M; BEYNON, R.J. (2010). **Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides.** Journal of Proteome Research, v. 9(1):444-450.

SOMOSKOVI et al. (2001). **The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*.** Respiratory Research, v.2:164-168.

SOUZA, R.B.; MAGNANI, M.;OLIVEIRA, T.C., (2010). **Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp.** Semina:Ciências Agrárias, v. 31(2): 413-428.

STEED et al.(2011). **Characterizing Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Strains with Various Mechanisms of Daptomycin Resistance Developed in an *In Vitro* Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55: 4748-4754.

TAVARES, Walter.(2000). **Bactérias gram-positivas problema: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 33 (3):281-301.

TENOVER, F.C.(2006). **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria.** The American Journal of Medicine, v.119(6A): S3–S10.

TWILLA et al. (2011). **Vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteremia: An evaluation of treatment with linezolid or daptomycin.** Journal of Hospital Medicine, v. 7(3) : 243-248.

- VAN HOEK *et al.* (2011). **Acquired antibiotic resistance genes: an overview.** *Frontiers in Microbiology*, v.2:203.
- VILLA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPED, J. (2007). **Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.59:1210–1215.
- WALSCH, F. (2013). **Investigating antibiotic resistance in non-clinical environments.** *Frontiers in Microbiology*, v. 4:19.
- WANG *et al.* (2012). **Draft Genome Sequence of *Streptomyces* sp. Strain SS, Which Produces a Series of Uridyl Peptide Antibiotic Sansanmycins.** *Journal of Bacteriology*, v.194(24): 6988-6989.
- WRIGHT, G.D. (2005). **Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57: 1451– 1470.
- WUNDERINK *et al.*, (2012) **Linezolid in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nosocomial Pneumonia: A Randomized, Controlled Study.** *Clinical Infectious Diseases*, v.54(5) : 621-629.
- ZAVASCKI *et al.* (2009). **KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.34(3): 286-288.
- ZUCCHI, T.D.; GUIDOLIN, A.S.; CÔNSOLI, F.L. (2011). **Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae).** *Microbiological Research*, v.16(1):68-76.