

**PROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR ACTINOMICETOS ISOLADOS DO
CAMPUS DA UFAM EM MANAUS FRENTE A PATÓGENOS CLÍNICOS**

Vitória Beatriz Cavalcante Mourão

Universidade Federal do Amazonas

Vitoriabcmourao@gmail.com / vitoria.mourao@ufam.edu.br

Rafael de Souza Rodrigues

Universidade do Estado do Amazonas- BIONORTE

rafaelsr.bio@gmail.co

Antônia Queiroz Lima de Souza

Universidade Federal do Amazonas

antoniaqueiroz@ufam.edu.br**RESUMO**

Hodiernamente, estão sendo apresentados cada vez mais casos de infecções por microrganismos no Brasil e no mundo, e os antibióticos atuais estão gradativamente perdendo a eficácia frente a patógenos resistentes. Tendo em mente que a biodiversidade do Campus da Universidade Federal do Amazonas em Manaus apresenta demasiado potencial para produção biotecnológica de produtos naturais, e pouca exploração de estudos em antibióticos, esse projeto apresenta um estudo biológico e químico acerca da antibiose desses microrganismos, visando investigar a produção de antibióticos por meio de bactérias pseudofilamentosas, ou seja actinomicetos, por meio da produção de metabólitos secundários avaliados frente a patógenos de interesse clínico para estudo químico bioguiado, sendo estes *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e outros. Pelo método de culturas pareadas foi selecionada uma linhagem P2-11, da qual feita uma curva de produção dos extratos e estes foram testados e feito o perfil químico, deste a melhor atividade encontrada foi para *E. coli*, *E. faecalis* e *B. cereus*. Após, também foram realizados o cultivo de mais 19 linhagens, em tempos de crescimento de 5 e 10 dias, dos quais os extratos do meio fermentado e da biomassa celular foram avaliados apenas contra quatro *Candida* spp e obtiveram resultados de inibição para *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*.

Palavras-Chave: Actinomicetos; antibióticos; metabólitos; patógenos humanos.



1. INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é conhecida como uma das maiores florestas do mundo, sendo uma das principais fontes da biodiversidade do Brasil, conhecida por deter 20% da variedade dos seres vivos presentes no mundo. Apesar de apresentar uma relevante biodiversidade em sua fauna e flora, a compreensão a respeito das interações dos microrganismos com o meio ambiente, mostra-se não totalmente explorada apresentando potencial para novos estudos (SOUZA et al., 2004). Esta destaca-se por apresentar um clima predominantemente equatorial e úmido que favorece o crescimento microbiano.

Portanto destaca-se a presença dos Actinomicetos, bactérias pseudofilamentosas, Gram-positivas e formadoras de esporos. Onde de acordo com o estudo realizado por SILVA et al (2012), a comunidade de actinomicetos constitui cerca de 10 a 50% da população presente no solo, interagindo com substâncias como: celulose, hemiceluloses, fenóis, quitina, queratina, ligninas e húmus, que de modo geral não são consumidas por outros microrganismos.

Dessa forma, (DE OLIVEIRA (2018), destaca o potencial antimicrobiano de actinomicetos de solos amazônicos em que reitera a importância da produção de metabólitos secundários bioativos provenientes de actinomicetos foram relatados na última década. Portanto, evidencia-se que os Actinomicetos se destacam como uma fonte biológica de substâncias antibióticas, antitumorais, anti-inflamatórios, antivirais, antiparasitários, imunossuppressores, produção de vitaminas e enzimas (YARBROUGH et al., 1993; JESUS, 2013; MINOTTO, 2014; DE SOUSA et al., 2019).

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de antibióticos de Actinomicetos isolados do Campus da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus-Amazonas, frente a patógenos de interesse clínico para estudo químico bioguiado.

3. METODOLOGIA

As linhagens foram obtidas por meio do selecionamento de 20 actinomicetos da coleção de trabalho de microrganismos do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (LABMICRA/CA/UFAM). A reativação das linhagens foi realizada em placas de petri contendo meio de cultura ISP2 ágar (Ágar 1,5%, extrato de levedura 0,4% e extrato de malte 1%) e cultivados a 28 °C durante 8 dias.

Das linhagens a serem selecionadas para os ensaios de antibiose, foi realizada a curva de crescimento da P2-11 para análise de consumo da glicose, acompanhamento do pH, perfil químico e ensaio de antibiose. Foi realizado o microcultivo em ISP2, em lâminulas inclinadas para visualização em microscópio Feldmann com captura de imagem e Software de medidas na objetiva de 100x. Para a curva de crescimento, foram inoculados em erlenmeyer de 250 mL contendo meio de cultura ISP2, em incubadora Shaker a 120 rpm e retirado de acordo com os pontos de coleta para a construção da curva de crescimento. Ao retirar cada ponto de coleta do experimento de acordo com os pontos, foram medidos em cabine de segurança biológica o pH, glicose, densidade, nitritos e proteínas por meio de fitas de urinálise.

Os extratos foram levados a centrifugação em tubo falcon de 50 mL, para a separação do meio fermentado do meio celular. O meio celular foi submetido à maceração com acetato de etila e metanol em concentração 1:1 e colocado em dessecador contendo sílica. O meio fermentado foi particionado em funil de separação com Acetato de Etila e Isopropanol com proporção 9:1 em 3 particionamento com 40 mL, 30 mL e 30 mL e logo em seguida concentrado por rotaevaporação. Os extratos foram testados em Screening em placa de 96 poços frente a linhagens clínicas de *C. glabrata*, *E. coli*, *S. coccus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *E. Faecalis*. Ainda, ocorreu as análises espectrométricas dos extratos em ESI/LC/MS referentes a cada tempo de coleta.

Em seguida foram realizados extratos de metabólitos das 19 linhagens restantes em tempo



de crescimento de 5 e 10 dias, liofilizados e testados frente a *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Ainda foram realizadas análises por meio de ESI/LC/MS e estudo acerca de seus íons de interesse.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os extratos da linhagem alvo, por meio da figura abaixo é possível notar que o estes apresentaram inibição parcial frente às bactérias e pouca inibição frente a levedura.

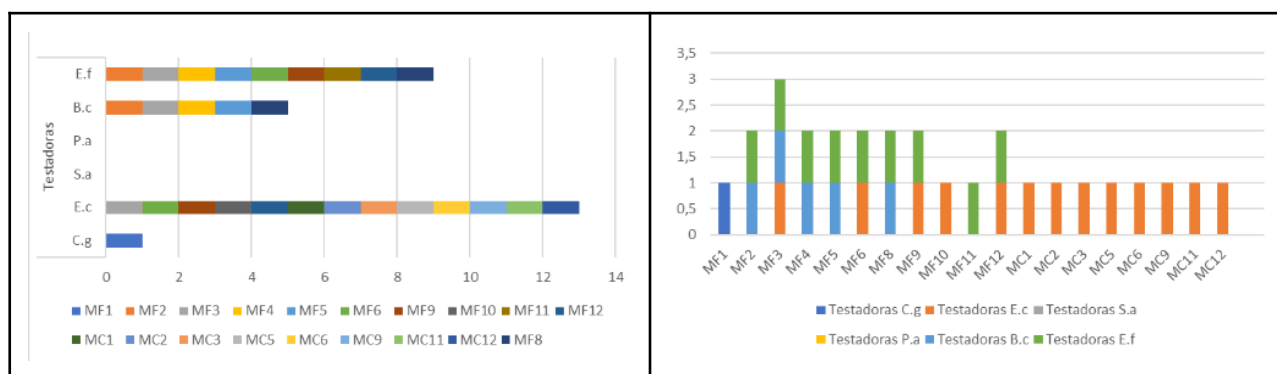


Figura 1: Testadoras frente a linhagem alvo.

Por meio da figura abaixo, em crescimento de 5 e 10 dias, é possível notar que em 5 dias de cultivos 18 linhagens, já haviam produzido algum metabólito secundário bioativo, apenas as linhagens 10 e 17 ainda não haviam produzido. Vale ressaltar o extrato MF-7A com atividade para *C. glabrata* e *C. haemulonii*. Outro fato interessante desta triagem são os resultados para *C. krusei* com sete extratos positivos (1, 2, 3, 4, 16, 18 e 19). Dos sete extratos ativos contra *C. albicans* seis também tem atividade contra *C. haemulonii*. Destes 40 extratos produzidos com 5 dias de cultivo, 12 foram extracelular e apenas um intracelular (15 – biomassa celular) apresentaram antibiose. Porém é importante destacar que o metabolismo de algumas linhagens são claramente mais lentas que outras e os seus melhores metabólitos secundários bioativos foram produzidos com 10 dias

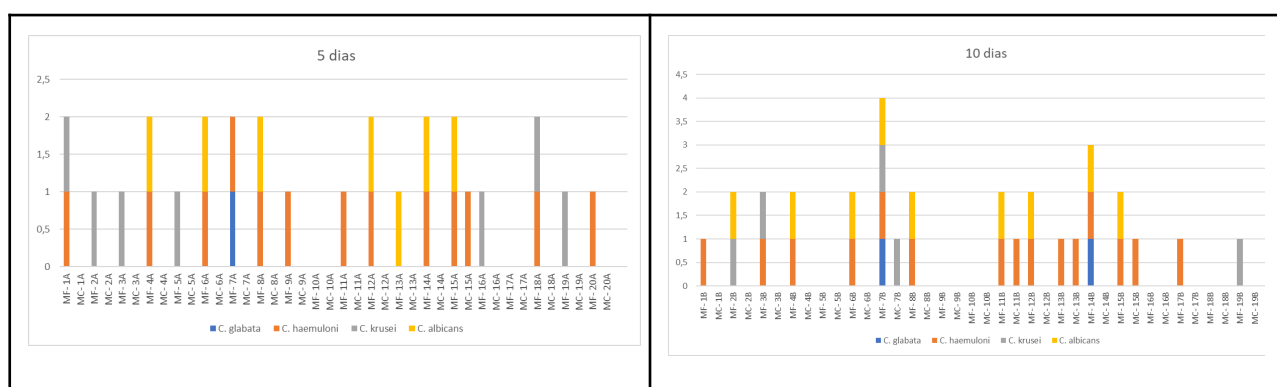


Figura 2: Testadoras frente aos extratos de linhagens de actinomicetos.

5. CONCLUSÕES

A produção de antibióticos por Actinomicetos isolados do Campus da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus-Amazonas, avaliada frente a patógenos de interesse clínico mostrou das 20 linhagens avaliadas, duas promissoras contra *Candida* spp. e atividades contra outros patógenos humanos com *E. coli*, *B. cereus* e *E. faecalis* com a linhagem P2-11.



Os extratos do meio fermentado e da biomassa celular foram avaliados apenas contra *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

DA CONCEIÇÃO, Beatriz Souza. GESTÃO DE ÁREAS PROTEGIDAS NA AMAZÔNIA-MPGAP.

DE SOUSA, Sara Freitas et al. *Streptomyces* sp. isolados da Amazônia como agentes de biocontrole de fungos aflatoxigênicos. *Diversidade Microbiana da Amazônia*, p. 46, 2019.

DE OLIVEIRA, RAIMUNDO CARMO; BRANCO-AC, R. I. O. POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ACTINOMICETOS DE SOLOS AMAZÔNICOS. 2018.

JESUS, J. A. Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas. 2013. Campos dos Goytacazes-RJ.(M. Sc Dissertação. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro). 88f, 2013.

LOBATO, Ana Katerine de Carvalho Lima. Análise de fluxos metabólicos para otimização da Síntese do antibiótico cosmomicina por *Streptomyces olindensis* ICB20. 2010.

MINOTTO, Elisandra. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o Biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. 2014.

SILVA, Ingrid Reis da et al. Compostos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* Spp. 2012.

SOUZA, Antonia Queiroz Lima de et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazônica*, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

YARBROUGH, GEORGE G. et al. Triagem de metabólitos microbianos para novas drogas – questões teóricas e práticas. *O Jornal de antibióticos*, v. 46, n. 4, pág. 535- 544, 1993.

WANG, Mingxun et al. Mass spectrometry searches using MASST. *Nature biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 23-26, 20

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Universidade Federal do Amazonas pelo apoio durante a realização do projeto e ainda por meio do Programa de Iniciação Científica pela bolsa e apoio financeiro. Agradeço também aos órgãos de fomento pelo amparo à pesquisa na Universidade, a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, a Central Analítica Multidisciplinar-CAM, ao laboratório de bioensaios e microrganismos da Amazônia (LABMICRA), LABCEM, LAEQ e LAQUA.

A minha orientadora Antonia Queiroz Lima de Souza e ao meu coorientador Afonso Duarte Leão de Souza, agradeço a todos os ensinamentos e orientações. Aos meus colegas de laboratório, em destaque ao Rafael de Souza Rodrigues, pelo auxílio e ensinamento.

E principalmente a minha família e amigos pelo apoio durante o projeto.