

2.12.02

AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces* spp. FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus*.

Susiele M. A. Lima^{1*}; Elizabeth F. O. Borba²; Sandrine M. A. Lima³; Teresinha G. Silva⁴

1. Enfermeira, Especialista em Traumatologia-Ortopedia pela Universidade Federal de Pernambuco
2. Bióloga, Doutoranda em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Pernambuco
3. Bióloga, Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco
4. Farmacêutica, Professora na Universidade Federal de Pernambuco

Resumo:

O surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* que podem apresentar elevada morbidade e mortalidade, consistem em relevantes problemas de saúde pública. Neste contexto, a comunidade científica tem empreendido esforços para desenvolver ou descobrir novas classes de antibióticos. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos por *Streptomyces* spp. frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. A metodologia empregada para produção de metabólitos bioativos por *Streptomyces* spp. foi realizada através de uma fermentação semi-sólida. Para a avaliação da atividade antimicrobiana destes metabólitos foi determinada a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) pelo método da microdiluição em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Todos os extratos provenientes da fermentação de *Streptomyces* spp. apresentaram atividade antimicrobiana com CMI \leq 15 mg/mL, sendo mais ativo os extratos EMeOH-3405 e EMeOH-3413. Os metabólitos de *Streptomyces* spp. apresentam potencial antimicrobiano. Esforços para isolar os compostos responsáveis por essa atividade estão em andamento.

Palavras-chave: Saúde Pública; Bactérias Multirresistentes; Antibióticos.

Apoio financeiro: CAPES e UFPE.

Introdução:

Streptomyces é um gênero de bactérias Gram-positivas encontradas em uma diversidade de habitats, em particular no solo (Chater, 2016). São conhecidas como produtoras de uma ampla variedade de antibióticos e outros compostos bioativos, sendo este gênero o maior produtor em número e diversidade de novos antibióticos, se comparados a outros gêneros bacterianos (Rashad et al., 2015). As principais classes de antibióticos produzidos por *Streptomyces* incluem aminoglicosídeos, antraciclina, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, polienos, poliésteres e tetraciclina (Antunes et al., 2013). Além da atividade antibiótica, os metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* são descritos na literatura como antifúngicos (Kavitha et al., 2010), antivirais (Ara et al., 2014), anticancerígenos (Tan et al., 2015) e antioxidantes (Lee et al., 2014).

Apesar de existir no mercado uma gama de fármacos antibióticos de várias classes químicas, ainda se faz necessário a investigação de novas moléculas, porque devido ao uso indiscriminado desses fármacos tem surgido, cada vez mais frequente, estirpes bacterianas multirresistentes⁸. O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um problema importante no tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos (Wright, 2012).

Um exemplo de bactéria muito propagada em ambientes hospitalares é *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (também conhecida como ORSA - Oxacillin-resistant *S. aureus*) que se tornou resistente a vários antibióticos e devido a sua resistência crescente é chamada de super-bactéria (CDC, 2017). Infecções causadas por ORSA estão associadas com uma taxa de mortalidade de 15-60% (Hemachandran et al., 2011). De acordo com o centro para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC), infecções causadas por *Staphylococcus* ocasiona mais óbito nos EUA do que a AIDS (Mahajan; Balachandran, 2012)

A evolução da resistência aos antibióticos por importantes patógenos humanos tornou os antibióticos originais (penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina) e a maioria dos seus sucessores ineficazes. O interesse da pesquisa em investigar a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de *Streptomyces* spp. é justificado pelo potencial que o gênero *Streptomyces* apresenta em produzir metabólitos úteis na indústria farmacêutica.

Metodologia:

Streptomyces spp.

As linhagens bacterianas *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 foram isoladas do solo da rizosfera de *Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, uma planta nativa do Amazonas-Brasil, conhecida como guaraná. As cepas encontram-se depositadas na Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) sob imersão em óleo mineral e liofilizada.

Obtenção dos Metabólitos de *Streptomyces* spp. na Fermentação Semi-Sólida

O inóculo foi obtido pelo cultivo de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413 em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio ISP-2 líquido com inoculação de 20 blocos de gelose de 10 mm de diâmetro retirados do crescimento em forma de tapete da linhagem em ISP-2 ágar, cultivada por 14 dias a 30 °C, e submetidos à agitação por 48 h (200 rpm, 30 °C). Para fermentação, 10 mL do inóculo foi adicionado em frasco Erlenmeyer contendo 90 g de arroz parboilizado cozido incubado por 21 dias a 30 °C.

Ao fermentado semi-sólido foi adicionado 150 mL de metanol e deixados por 48 h a 30 °C. Em seguida, o extrato foi filtrado e adicionado mais 100 mL de metanol por 24 h a 30 °C. O extrato foi novamente filtrado e concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C.

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada aplicando-se o teste de susceptibilidade para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB). Os extratos testados foram analiticamente pesados (0,03 g), solubilizados em 100 µL de DMSO e acrescentados 900 µL de meio de cultura líquido Mueller Hinton (MH), obtendo-se uma solução estoque de concentração 30 mg/mL.

Os micro-organismos utilizados no ensaio foram isolados clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 700 (Secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 ORSA (Ferida operatória), *S. aureus* UFPEDA 707 (Secreção traqueal) e *S. aureus* UFPEDA 729 ORSA (Secreção nasal), pertencentes a Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Durante o experimento, os isolados clínicos foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em água destilada estéril, correspondente a uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL.

A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição, em multiplacas com 96 poços cultivadas a 37 °C por 18-24 horas, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2010). A CMB foi definida como a menor concentração da droga que mata 99,9% do micro-organismo utilizado no teste dentro de um período de tempo definido (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Sendo determinadas pela subcultura dos poços azuis do teste de determinação da CMI em placa de Petri contendo o meio sólido MH, incubada a 37 °C por 18-24 horas. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Resultados e Discussão:

Todos os extratos provenientes da fermentação de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413 apresentaram atividade antimicrobiana em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* com CMI ≤ 15 mg/mL. Os extratos mais ativos foram o EMeOH-3405 e o EMeOH-3413 com CMI de 1,87 mg/mL frente a *S. aureus* UFPEDA 700, *S. aureus* UFPEDA 707 e *S. aureus* UFPEDA 729 ORSA.

A CMI de diferentes compostos não é constante porque é influenciada por muitos fatores, incluindo: a natureza do micro-organismo empregado no ensaio, o tamanho do inóculo, a composição do meio de cultura, o tempo de incubação e aeração. Esta concentração dá uma ideia de qual nível da diluição tem atividade (Zgurskaya; Nikaido, 2000). Na literatura muitos trabalhos relatam a atividade antimicrobiana de metabólitos provenientes de *Streptomyces* spp. Uma série de novos antibióticos glicopeptídeos (manopeptimicinas) foram isolados do gênero *Streptomyces* e apresentaram atividade contra *S. aureus* resistente à metilina (He et al., 2002). Recentemente, Lima et al (2017) também encontrou extratos e frações de metabólitos do gênero *Streptomyces* com atividade frente isolados clínicos de *S. aureus*.

Conclusões:

Streptomyces spp. produz metabólitos secundários com potencial antimicrobiano. Esforços para identificação das espécies, juntamente com o isolamento, a elucidação e o mecanismo de ação dos compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana estão em andamento.

Referências bibliográficas

Antunes et al. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 131-138, 2013.

Ara et al. Antiviral activities of *Streptomyces* against tobacco mosaic virus (TMV) in *Datura* plant: evaluation of different organic compounds in their metabolites. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2130-2138, 2014.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. General Information About MRSA in the Community. Disponível em <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 29 de setembro de 2017.

Chater, K. F. Recent advances in understanding *Streptomyces*. **F1000 Research**, v. 5, p. 1-16, 2016.

CLSI (2008) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi. Approved standard: M27-A3 e M38-A2. Wayne (PA): CLSI, 2008.

CLSI (2010) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010.

He et al. Mannopeptimycins, novel antibacterial glycopeptides from *Streptomyces hygroscopicus*, LL-AC98. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 9729-9736, 2002.

Hemachandran et al. Studies on extended beta lactamase producing, biofilm forming clinical bacterial pathogens and its *in vitro* inhibition by actinobacterial extracts. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v.1, p. 210-213, 2011.

Kavitha et al. Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL_333. **Research Microbiology**, v. 161, p. 335-345, 2010.

Lee et al. Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. 962-967, 2014.

Lima et al. Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, p. 711-123, 2017.

Mahajan GB, Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes - A review. **Frontiers in Bioscience E4**, v. 4, p. 240-253, 2012.

Rashad et al. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. **Microbiological Research**, v. 175, p. 34-47, 2015.

Taechowisan et al. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity. **Microbiology**, v. 151, p. 1691-1695, 2005.

Tan et al. Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 isolated from Malaysia mangrove soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-22, 2015.

Wright GD. Antibiotics: a new hope. **Chemistry Biology**, v. 19, p. 3-10, 2012.

Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 219-225, 2000.