

PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS E AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE SOLO FRENTE A *Staphylococcus aureus* METICILINO- RESISTENTES (MRSA)

LIMA, Daniella Vilela ¹; ARIMATEA, Gustavo Guilherme Queiroz ¹; VAZ, Fernando de Souza ¹; BATISTA, Lindon Johnson de Abreu ²; PIMENTA, Fabiana Cristina ¹; VIEIRA, José Daniel Gonçalves ¹

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - UFG. daniellavilela@hotmail.com

² Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas - UFG

Palavras-chave: Actinomicetos, biomoléculas, citotoxicidade, MRSA

1. INTRODUÇÃO

Actinomicetos são bactérias gram-positivas e constituem um dos principais grupos de microrganismos do solo. Apresentam um fenômeno de diferenciação celular, caracterizado por um processo de alteração morfológica bastante complexa, formando um micélio de substrato e um micélio aéreo, além de um processo de diferenciação química envolvendo uma extraordinária habilidade de produzir variados metabólitos secundários que apresentam aplicação agrícola, industrial, médico-farmacêutica, tais como herbicidas, pesticidas, anti-parasitários, enzimas, substâncias promotoras de crescimento vegetal, antibióticos e antitumorais (DEMAIN, 1989; VINING, 1990; BIBB, 1996; CONNELL, 2001). *Staphylococcus aureus* são bactérias gram-positivas, importantes patógenos causadores freqüentes de inúmeras infecções, dentre elas: artrites, pneumonias, meningites, conjuntivites purulentas, dermatites esfoliativas, intoxicações alimentares, piodermites, furúnculos, mastites, endocardites, osteomielites, infecções cirúrgicas e septicemia com taxas de morbimortalidade significativas. *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA) apresentam uma virulência intrínseca, ampla capacidade de disseminação e multirresistência, sendo atualmente considerados problemas mundiais de saúde pública, tanto no âmbito hospitalar quanto no comunitário (KLOSS & BANNERMAN 1995; CHAMBERS, 2001; DEBBIA et al, 2001). A emergência destes microrganismos, aliado ao aumento da sua resistência às drogas atualmente em uso, tem levado a um maior interesse pela busca de novos antimicrobianos, o que vem atraindo a atenção para os actinomicetos, devido ao seu potencial para a produção de moléculas bioativas, especialmente antibióticos, que são substâncias produzidas por seres vivos, antagonistas ao desenvolvimento ou à vida de outros microrganismos (SERRA, 2003). O Brasil possui uma enorme biodiversidade que, no entanto, é muito pouco explorada. Pesquisas que visem o descobrimento de microrganismos com potencial para a exploração em processos biotecnológicos são de grande interesse. Desta forma, o presente estudo objetivou o isolamento de actinomicetos a partir de amostras de solo de dois importantes biomas brasileiros (Cerrado e Mata Atlântica) visando encontrar microrganismos com capacidade para a produção de biomoléculas com atuação sobre *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA) e que apresentem baixa citotoxicidade.

2. METODOLOGIA

2.1 Isolamento dos Actinomicetos

Amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0-10cm em áreas de Cerrado (Bosque Rudyard, Parque Ecológico de Goiânia, Dermu Compav e Associação dos Docentes da Universidade Federal de Goiás) e Mata Atlântica (Canavial Marataízes-ES, Cafezal Timbó-ES e Costão do Santinho-SC). Para cada região, as coletas foram realizadas em 4 pontos distintos e posteriormente homogeneizadas. Cada amostra de solo foi submetida a um pré-tratamento de dessecação por 16 horas à temperatura ambiente e os actinomicetos foram isolados pelo método quimiotático, segundo Palleroni (1980). Para o adequado isolamento foi utilizado o ágar amido caseína (ACT) segundo Waskman (Palleroni, 1980). As colônias isoladas e purificadas foram analisadas quanto à forma e afinidade tintorial.

2.2. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Actinomicetos

Para a determinação da atividade antimicrobiana de cada isolado foram utilizados os *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA) isolados de população pediátrica e hospitalar, cujos perfis de multirresistência antimicrobiana foram confirmados pela técnica de difusão de disco no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG).

Os actinomicetos isolados foram inoculados em ágar ACT e ISP2 e incubados a 28-30°C por até 14 dias. Em seguida, cilindros de 7mm de diâmetro foram cortados deste ágar e colocados sobre placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton, em cuja superfície foram previamente inoculados os *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA) indicadores, que foram diluídos para a metade da concentração do tubo nº 1 da Escala de MacFarland. As placas de Petri foram incubadas a 37°C. A leitura da atividade antimicrobiana foi realizada medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento (em milímetros) dos estafilococos após 24 horas de crescimento. Os actinomicetos que produzirem um halo de inibição \geq 8mm foram considerados capazes de produzir substância bioativa frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes.

2.3. Produção e Extração da Substância Antibiótica

Para a produção de substâncias bioativas foram empregados os meios líquidos e sólidos ACT e ISP2. Foi preparado um pré-inóculo dos isolados de actinomicetos em um Erlenmeyer contendo 15 ml do caldo. O pré-inóculo foi incubado sob agitação em “shaker” a 180 rpm, 30°C por 48 horas. Decorrido este período, foram adicionados 50mL de caldo novo e todo o conteúdo do Erlenmeyer foi novamente incubado sob as mesmas condições anteriores, por 14 dias. A produção em meio sólido foi realizada inoculando uma alçada nos respectivos meios e crescidas por 14 dias sob as mesmas condições anteriores.

Após o término da fermentação procedeu-se à produção do extrato etanólico bruto utilizando-se etanol absoluto e acetato de etila. Os extratos etanólicos brutos foram concentrados e armazenados em tubos Eppendorf em freezer a -20°C.

2.4. Determinação da Atividade Citotóxica de Extrato Etanólico Bruto

Para a determinação da atividade citotóxica utilizou-se da metodologia com *Artemia salina*. Para o experimento, ovos de *Artemia salina* foram eclodidos em

uma solução salina contendo 3,5% de sal marinho em água mineral. Os ovos foram incubados, sob iluminação e aeração constante, a 30°C por 24 horas.

Uma solução de extrato etanólico bruto foi preparada, solubilizado o extrato bruto em Dimetilsulfóxido a 1:1 e o volume completado para 10mL com a solução salina, previamente preparada. Essa solução foi utilizada para a preparação das demais diluições empregadas, o experimento foi realizado em triplicata. Foram realizadas diluições de 20.000, 10.000, 5.000 e 2.500 ppm. Aos tubos, contendo 1,0 mL destas diluições foram adicionados 10 náupilos de *Artemia salina*. Os tubos foram incubados sob iluminação a 30°C por 24 horas. Após este período, o número de náupilos mortos ou com perda de movimento foram contados. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da DL₅₀. A DL₅₀ foi calculada pela análise de regressão dos resultados obtidos, após a determinação da porcentagem de mortalidade das larvas pela fórmula:

$$\% \text{ Mortalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de mortos ou imóveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de } Artemia \text{ salina}} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 50 morfoespécies de actinomicetos foram isoladas das diferentes amostras de solo processadas. Destas, 7 (14,0%) (OCTX4, PEG30, RKF3, RKF7, RKF8, RKX3 e RKX13) apresentaram atividade antimicrobiana frente aos *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes.

As características das colônias após 7 dias de crescimento a 30°C podem ser observadas na Tabela 1. Observa-se que dos 7 actinomicetos, apenas 1 é proveniente de solo de Mata Atlântica, demonstrando neste trabalho um maior potencial dos actinomicetos presentes em solos de Cerrado quando comparado ao de Mata Atlântica, para a produção de moléculas bioativas com capacidade para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes.

Tabela 1 – Características macroscópicas do cultivo dos actinomicetos isolados após 14 dias de cultivo.

Isolado	Procedência	Meio de Cultivo Ideal	Pigmento	Micélio de Substrato	Micélio Aéreo
RKX3	Cerrado	ACT	Amarelo	Amarelo	Branco
RKX13	Cerrado	ACT	-	Branco	Branco
RKF3	Cerrado	ACT	-	Branco	Branco
RKF7	Cerrado	ISP2	-	Rosa	Rosa
RKF8	Cerrado	ISP2	-	Amarelo	Branco
OCTX4	Mata Atlântica	ACT	-	Branco	Branco
PEG30	Cerrado	ACT	Violeta	Violeta	Branco

No presente experimento, o ágar ACT apresentou melhores condições para a produção de moléculas bioativas quando comparado ao ágar ISP2. Este fato pode ser devido a diferentes constituintes presentes nos meios de cultura podem influenciar a produção de moléculas antimicrobianas. Geralmente a produção de metabólitos secundários é observada em meios ricos, capazes de manter um rápido crescimento, e onde os nutrientes, provavelmente, reprimem a formação das enzimas inibidoras da síntese de metabólitos. Na Tabela 2 pode ser observada a

capacidade de produção de moléculas com atividade antimicrobiana pelos actinomicetos.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana dos actinomicetos isolados frente aos *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA)

Actinomiceto	Halo de inibição do crescimento (mm)					
	MRSA1	MRSA2	MRSA3	MRSA4	MRSA5	MRSA6
RKX3	23	21	22	21	22	21
RKX13	15	14	13	13	14	14
RKF3	15	14	14	13	13	13
RKF7	13	11	12	11	11	11
RKF8	21	17	17	17	12	15
OCTX4	12	10	11	10	9	9
PEG30	11	10	11	10	12	10

O extrato etanólico bruto dos isolados crescidos em meios líquido apresentou maior inibição do crescimento dos MRSA quando comparado ao crescimento em ágar. Isso se deve a uma maior concentração de biomoléculas no extrato em detrimento do ágar como também a aeração que pode ser fundamental para a produção das biomoléculas.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto dos isolados actinomicetos frente aos *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA)

Amostra	Halo de inibição do crescimento (mm)						
	MRSA1	MRSA2	MRSA3	MRSA4	MRSA5	MRSA6	ATCC
Etanol	-	-	-	-	-	-	-
RKX3 (ACT)	29	28	30	30	27	30	30
RKX13 (ACT)	25	25	26	27	25	28	27
RKF3 (ACT)	25	25	25	26	27	26	27
RKF7(ISP2)	20	20	21	20	23	21	19
CHF1 (ISP2)	19	18	15	16	18	13	18
OCTX4 (ACT)	17	17	18	17	16	16	17
PEG30 (ACT)	15	16	17	16	17	17	17

A atividade citotóxica frente a *Artemia salina* foi determinada para os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana. Somente o isolado PEG30 apresentou atividade citotóxica em baixa concentração, como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4 – Atividade citotóxica dos actinomicetos

Actinomicetos	Concentração Letal 50% (LC50) em ppm de extrato etanólico bruto
RKX3	3.000
RKX13	2.500
RKF3	5.000
RKF7	3.000
RKF8	18.000
OCTX4	7.500
PEG30	78,13

4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem um grande potencial dos actinomicetos, especialmente aqueles isolados de solo de Cerrado, como produtores de moléculas bioativas com capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes. Testes em sistemas de cultivo de tecidos deverão ser realizados para a confirmação ou não da baixa toxicidade dessas biomoléculas para posterior pesquisa e uso na terapêutica de infecções causadas por MRSA.

Apoio: FUNAPE, PPGMT/IPTSP, CAPES

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBB M 1996. **The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2).** Microbiology, 142: 1335-1344.

CHAMBERS HF 2001. **The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?** Emer Infect Dis, 7:178-182

CONNELL ND 2001. **Expression systems for use in actinomycetes and related organisms.** Current Opinion in Biotechnol 12: 446-449.

DEBIA EA, SCHITO GC, ZORATTI A, GUALCO L, TONOLI E, MARCHESE A 2001. **Epidemiology of major respiratory pathogens.** J Chemoter, 1: 205-211

DEMAIN AL 1989. **Functions of secondary metabolites.** In: Genetic and molecular biology of industrial microorganisms. Hershberger, C.L., Queener, S.W., Hegeman, G. (eds). American Society for Microbiology, Washington, DC, 1-11.

KLOOS WE, BANNERMAN TL 1995. ***Staphylococcus* and *Micrococcus*.** In: Mahon CR, Manuselis G Jr. Text Book of Diagnostic Microbiology. Saunders, p. 264-277.

PALLERONI NJ 1980. **A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*.** Arch Microbiol, 128: 53-55.

SERRA, H. A. **A história dos antibióticos.** Disponível em <<http://www.medstudents.com.br/historia/fleming/fleming.htm>> Acesso em 10 set. 2006.

VINING LC 1990. **Functions of Secondary Metabolites.** Ann Rev Microbiol 44: 395-427.