

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Nathalie Scaramussa Paludo

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* spp. crescidos em diferentes fontes de carbono contra isolados de *Klebsiella pneumoniae*

Atividade antimicrobiana de *Streptomyces*

Porto Alegre

2018

Nathalie Scaramussa Paludo

Avaliação da atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp. crescidos em diferentes fontes de carbono contra isolados de *Klebsiella pneumoniae*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharela em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia Ambiental, na forma de artigo científico a ser submetido à Revista Brasileira de Biociências.

Orientadora: Prof. Dr^a Sueli Teresinha Van Der Sand

Coorientadora: M^a Marcela Proença Borba

Porto Alegre

2018

Apresentação

Optou-se por apresentar este trabalho na forma de artigo científico a ser submetido à Revista Brasileira de Biociências e obedece aos padrões de apresentação exigidos pela mesma. No entanto, decidiu-se por apresentar as figuras e tabelas no decorrer do texto, devido à praticidade na leitura e correção pelos membros da Banca Examinadora.

Nathalie Scaramussa Paludo^{1*}, Marcela Proença Borba¹, Sueli Teresinha Van Der Sand (Or.)¹

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170. Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: nathaliespaludo@gmail.com

RESUMO

O gênero *Streptomyces* spp. é muito conhecido pela sua capacidade de produzir um grande número de metabólitos secundários com ação antimicrobiana. Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência da mudança da fonte do carbono e do tempo na produção de compostos com atividade antimicrobiana de 30 isolados de *Streptomyces* spp. provenientes de solo da Antártida. Para a definição do período de incubação, foi realizada uma curva de produção para determinar o início da produção dos compostos antimicrobianos. Para esse fim, foi utilizado o meio de cultivo ágar amido caseína contendo 1% de amido e incubação por dez dias. Para os ensaios com as diferentes fontes de carbono foi utilizado: 0,5% de amido, 1% de sacarose e 1% de glicose. Para verificação da produção de compostos, foi realizada a técnica de dupla camada, utilizando para isso, três isolados de *Klebsiella pneumoniae* com perfil de resistência aos β -lactâmicos. No meio contendo 1% de glicose, com cinco dias de crescimento, nenhum dos isolados produziu compostos com ação antimicrobiana, porém, após dez dias de incubação, houve um aumento na produção desses compostos. A melhor produção de compostos com ação antimicrobiana foi verificada no meio de cultivo contendo sacarose como fonte de carbono, pois tanto com cinco quanto com dez dias de crescimento, todos os isolados produziram compostos bioativos. O meio contendo 0,5% de amido também pode ser considerado adequado para a produção de compostos, contanto que os isolados fiquem incubados por dez dias. Assim, o meio de cultivo mais adequado para produção, foi contendo sacarose.

Palavras-chave: *Streptomyces* spp.; antimicrobianos; fontes de carbono; resistência antimicrobiana

ABSTRACT

Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Streptomyces* spp. grown on different carbon sources against *Klebsiella pneumoniae* isolates

The genus *Streptomyces* spp. is well known for its ability to produce a large number of secondary metabolites with antimicrobial action. This work aims to evaluate the influence of the change in the carbon source and period of incubation on the production of compounds with antimicrobial activity of 30 *Streptomyces* spp. isolates from Antarctica. For the definition of the incubation period, a production curve was taken to determine the start of production of the antimicrobial compounds. For this purpose, the starch agarose culture medium containing 1% starch was used with incubation for ten days. For the tests with the different sources of carbon was used: 0.5% of starch, 1% of sucrose and 1% of glucose. To verify the production of compounds, the double-layer technique was performed using three isolates of *Klebsiella pneumoniae* with β -lactam resistance profile. In the medium containing 1% glucose, with five days of growth, none of the isolates produced compounds with antimicrobial action, while after ten days of incubation, there was an increase in the production of these compounds. The best production of compounds with antimicrobial action was verified in the culture medium containing sucrose as carbon source, because with both five and ten days of growth, all the isolates produced bioactive compounds. The medium containing 0.5% starch may also be considered suitable for the production of compounds, provided that the isolates are incubated for ten days. Thus, the most suitable medium for production was sucrose.

Keywords: *Streptomyces* spp.; antimicrobials; carbon sources; antimicrobial resistance

INTRODUÇÃO

O filo Actinobacteria é uma das maiores unidades taxonômicas dentre as principais linhagens atualmente reconhecidas dentro do domínio Bacteria (Ludwig *et al.* 2015). Eles são mais abundantes em solos, onde desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica do solo e na ciclagem de nutrientes (Alef & Nannipieri 1995), especialmente em solos alcalinos e ricos em matéria orgânica, onde constituem uma parte importante da população microbiana (Barka *et al.* 2016). Este filo tem recebido muita atenção da comunidade científica, principalmente devido à sua habilidade em produzir diversos compostos bioativos com interessantes estruturas químicas (Barka *et al.* 2016).

Esses compostos são conhecidos por possuírem atividades antibacterianas, antifúngicas, neurogênicas, anticancerígenas, imunossupressoras, antimaláricas e anti-inflamatórias (Valli *et al.* 2012, Naine *et al.* 2011). Quase 80% dos antibióticos de uso clínico humano, veterinário e agrícola são provenientes de actinomicetos, principalmente dos gêneros *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp. (Pandey *et al.* 2018).

A maioria das cepas produtoras de compostos bioativos extracelulares pertence a espécies do gênero *Streptomyces* spp., que produzem dois terços dos antibióticos clinicamente importantes (Maleki & Mashinchian 2011, Bérdi 2005). A este gênero foram atribuídas espécies promissoras, conhecidas pelo seu potencial em produzir um grande número de metabólitos secundários inibidores de microrganismos usados na indústria farmacêutica (Maleki & Mashinchian 2011). Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos por microrganismos durante modificações de algum metabólito primário (Pandey *et al.* 2018). Esses compostos não têm um papel no crescimento e desenvolvimento do microrganismo e são geralmente formados na fase estacionária do crescimento microbiano (Cunha *et al.* 2010). Os antibióticos são um dos mais importantes e

amplamente empregados metabólitos secundários produzidos por microrganismos (Pandey *et al.* 2018). Porém, a habilidade das culturas de *Streptomyces* spp. na produção de antibióticos não é uma propriedade fixa, mas pode ser aumentada ou perdida sob diferentes condições de nutrição e cultivo (Waksman 1961). Portanto, a constituição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do microrganismo produtor, afeta a síntese do antibiótico (Hassan *et al.* 2001). Fontes nutricionais como carbono, nitrogênio e minerais, além de fatores ambientais como tempo de crescimento, temperatura e pH tem uma grande influência na produção dos antimicrobianos (Narayana & Vijavalakshimi 2008).

A eficácia dos antibióticos vem diminuindo desde que foram introduzidos na medicina moderna, há mais de 70 anos (Jorgensen *et al.* 2016). O alto uso de antibióticos, as rápidas disseminações de bactérias resistentes a múltiplos fármacos e a falta de antibióticos novos e eficazes levaram a uma ameaça iminente aos sistemas de saúde e ao desenvolvimento global (Mölstad *et al.* 2017).

O mecanismo mais comum e importante de resistência em bactérias Gram-negativas é a produção de β -lactamases (Pathak *et al.* 2017), enzimas que são capazes de degradar diferentes classes de antimicrobianos. Podem-se destacar duas principais enzimas: KPC e ESBL. As ESBL (β -lactamases de espectro estendido) são enzimas responsáveis pela resistência deste microrganismo a penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Já a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é uma enzima capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico de carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações e monobactâmicos (Zanol & Cantarelli 2016), perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (Williams 1999).

Entre os principais microrganismos causadores de infecções hospitalares e que apresentam importantes mecanismos de resistência a antimicrobianos podem-se destacar bacilos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, como é o caso de

Klebsiella pneumoniae (Zanol & Cantarelli 2016). A *K. pneumoniae* é uma espécie clinicamente relevante pois é responsável por mais de 70% das infecções humanas causadas por esse gênero (Hansen 1998). A bactéria *K. pneumoniae* é um relevante agente etiológico em doenças como bacteremias, pneumonias, endocardite, meningite, entre outras, sendo considerado um organismo oportunista, visto que pode estar presente nas fezes de até 30% da população, e possui uma ampla facilidade de colonização de mucosas (Correa 2017). A partir dos anos 80, o manejo de infecções por *K. pneumoniae* tornou-se complicado devido ao surgimento da resistência deste microrganismo aos antibióticos existentes (Pitout *et al.* 2015)..

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a mudança da fonte de carbono e o tempo de incubação alteram a produção de compostos com ação antimicrobiana produzidas por cepas de *Streptomyces* spp., provenientes de solo da Antártida, e se esses compostos são capazes de inibir o crescimento de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos β -lactâmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local da Pesquisa

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da UFRGS, no ano de 2018.

Isolados de *Streptomyces* spp.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras da coleção do laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS. A coleta do solo foi realizada pelo Doutor Paris Lavin, do Instituto Ártico Chileno. As amostras de solo foram enviadas ao nosso laboratório, onde estão armazenadas, e

posteriormente, os microrganismos foram isolados pelo grupo de pesquisa. Foram recuperadas 49 cepas de *Streptomyces* spp., que estavam armazenadas em glicerol 20%, das quais 30 foram selecionadas aleatoriamente para esta pesquisa. Nenhum teste para a verificação da produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana havia sido feito antes deste trabalho. Para a recuperação dos isolados, foi realizado o esgotamento das culturas em placas contendo o meio ACA (ágar bacteriológico 1,5%, amido 1%, KNO₃ 0,2%, NaCl 0,2%, K₂HPO₄ 0,2%, caseína 0,03%, MgSO₄ 0,005%, CaCO₃ 0,002% e FeSO₄ 0,001%). Para a verificação da pureza das colônias foi realizada a coloração de Gram. Após, os isolados foram armazenados em tubos contendo ACA inclinado na temperatura de 4 °C.

Isolados de *Klebsiella pneumoniae*

As amostras utilizadas neste trabalho pertencem à coleção do laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – ICBS/UFRGS e foram obtidas por Oliveira (2016). Os microrganismos são oriundos de esgoto hospitalar e do Arroio Dilúvio da cidade de Porto Alegre, e mostraram-se altamente resistentes aos antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos, especificamente aos carbapenêmicos e as cefalosporinas (Tab. 1). Os isolados estavam conservados em glicerol 20%, e armazenados a -20 °C. Para a recuperação das células, uma alíquota foi retirada com a alça de platina, inoculada em Caldo Triptona de Soja (TSB), e incubada a 37 °C por 24 horas. Após este período de crescimento foi verificada a pureza das colônias, através da coloração de Gram. Após, os isolados foram armazenados em Ágar Triptona de Soja (TSA) a 4 °C.

Tabela 1: Isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos β -lactâmicos utilizados no estudo.

Amostra n°	Genes de Resistência	
	ESBL	Carbapenemase
6	SHV, GES-4	-
15	CTX _{M-8}	KPC-2
26	GES-4	KPC-2

Fonte: Oliveira (2016) modificado.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana:

Teste da Dupla-Camada

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de *Streptomyces* spp. foi realizada a técnica de dupla-camada. Primeiramente foi realizado um ensaio com sete isolados para se avaliar com quantos dias de crescimento iniciava a produção de compostos com atividade antimicrobiana. Os estreptomicetos foram inoculados com uma agulha de platina, em forma de picada, em placas de Petri contendo meio de cultura ACA com 1% de amido. Após o crescimento das colônias, a cada 24 h, durante dez dias, 1 mL de suspensão de *K. pneumoniae* contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (na diluição 0,5 da escala McFarland) foi misturado com 9 mL de meio Mueller Hinton fundido e vertido sobre as culturas nas placas. As placas contendo os dois meios de cultura ficaram incubadas por 24 horas a 37 °C. Esse primeiro ensaio teve como objetivo a verificação do início da produção de compostos antimicrobianos. A partir do resultado deste ensaio foi definido o período mínimo de incubação para que os isolados produzam metabólitos bioativos detectáveis nessa técnica. A presença de compostos antimicrobianos foi avaliada qualitativamente, a partir da observação ou não de halos transparentes ao redor das

colônias de *Streptomyces* spp., indicando ausência de crescimento bacteriano de *K. pneumoniae*. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Diferentes fontes de carbono e tempos de crescimento

Três meios de cultura, contendo fontes de carbono diferentes, foram utilizados para a avaliação da produção de metabólitos secundários, foram utilizados conforme segue: ágar amido caseína substituindo o amido por 1% de glicose, 1% de sacarose ou 0,5% de amido. As placas foram incubadas a 28 °C por cinco e dez dias. Após o crescimento, 1 mL de uma suspensão de *Klebsiella pneumoniae* contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL foi misturado em 9 mL de meio Mueller Hinton fundido e vertido sobre as culturas de *Streptomyces* spp. nas placas. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A presença de compostos antimicrobianos foi avaliada qualitativamente, a partir da observação ou não, de halos transparentes ao redor das colônias de *Streptomyces* spp, indicando ausência de crescimento bacteriano. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de metabólitos secundários foi avaliada a partir da alteração na fonte de carbono e do tempo de incubação, através da técnica de dupla-camada. Foi possível observar que o tempo de incubação interferiu na produção de compostos. Todos os isolados de *Streptomyces* spp. produziram compostos capazes de inibir o crescimento de pelo menos uma das cepas de *K. pneumoniae* em pelo menos uma fonte de carbono e em um dos períodos de crescimento, de cinco ou dez dias.

Inicialmente foram testados sete isolados de *Streptomyces* spp para verificar em que dia de crescimento iniciava a produção de metabólitos secundários, e assim foi realizada uma

curva de produção. Esse ensaio indicou que com cinco dias de crescimento, todos os oito isolados testados já produziam compostos com características antimicrobianas (Tab. 2). Foi considerado então, que os ensaios com as outras fontes de carbono seriam realizados com cinco e dez dias de crescimento dos *Streptomyces* spp.

Tabela 2: Curva de produção de sete isolados de *Streptomyces* spp.

		Curva de Produção									
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> 6					<i>Klebsiella pneumoniae</i> 15		<i>Klebsiella pneumoniae</i> 26		
		Isolados de <i>Streptomyces</i>									
		30	31	33	38	41	44	42	43	41	42
Dias	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	4	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+) = Atividade antimicrobiana positiva; (-) = Sem atividade antimicrobiana.

A partir desses resultados, todos os 30 isolados foram testados em meio ACA com 1% de amido (Tab. 3). Pode-se observar que 10% dos isolados apresentaram ação antimicrobiana contra as três *K. pneumoniae*, enquanto 13,3% não formaram halo contra nenhuma. Dos demais isolados, 16,7% apresentaram compostos com ação antimicrobiana contra a *Klebsiella pneumoniae* nº 6, e 46,7% dos isolados contra as *Klebsiella* nº 6 e 15.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp sobre as cepas de *K. pneumoniae*, em meio contendo 1% de amido e com crescimento por cinco dias.

Isolados <i>Streptomyces</i> <i>spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	6	15	26
16	-	-	-
17	+	+	-
18	+	+	-
19	+	+	+
20	+	+	-
21	+	+	-
22	+	+	+
23	+	+	-
24	+	-	-
25	+	+	-
26	+	+	-
27	+	+	-
28	+	+	-
29	+	+	-
30	+	+	-
31	+	+	-
32	+	-	+
33	+	+	+
34	-	-	-

35	-	+	-
36	+	+	-
37	+	-	-
38	+	-	-
39	+	-	-
40	-	-	-
41	+	-	+
42	-	+	+
43	+	+	-
44	+	-	-
45	-	-	-
<hr/>			
Percentual			
de Isolados	80%	63,33%	20%
Positivos			

Legenda: (+) = Atividade antimicrobiana positiva; (-) = Sem atividade antimicrobiana.

O meio de cultura com sacarose foi o mais eficiente para a produção de metabólitos secundários com propriedade antimicrobiana, já que produziu metabólitos em menor tempo e contra todos os isolados de *K. pneumoniae*. Tanto na condição de crescimento em cinco quanto em dez dias, todos os isolados de *Streptomyces* spp. produziram compostos com atividade antimicrobiana (Tab. 4).

Tabela 4: Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp sobre as cepas de *K. pneumoniae*, em meio contendo sacarose e com crescimento por cinco dias e dez dias.

Isolados <i>Streptomyces</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	6		15		26	
	Tempo de incubação (dias)					
	5	10	5	10	5	10
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+

33	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+
<hr/>						
Percentual de						
Isolados	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Positivos						

Legenda: (+) = Atividade antimicrobiana positiva

Borba (2013) avaliando a produção de antimicrobianos do isolado de *Streptomyces* 8S observou que a sacarose foi a fonte de carbono mais efetiva, visando a produção de antimicrobiano com atividade contra bactérias Gram positivas, em um menor tempo crescimento. Sathi *et al.* (2001) relataram que o meio contendo sacarose foi o mais apropriado para a produção em larga escala de antibióticos. Antunes (2010) constatou a presença de dois picos de atividade antimicrobiana quando utilizado o meio contendo sacarose. Isso pode indicar que o isolado, ao degradar o dissacarídeo em glicose e frutose, pode utilizar esses monossacarídeos como saldo energético para a produção de material

celular e de compostos secundários com propriedade antimicrobiana. Outra explicação pode ser obtida através do trabalho de Brown (1976), que observou uma espécie do gênero *Streptomyces* spp. sendo capaz de produzir um inibidor da enzima β -lactamase, sendo esta última produzida por uma espécie de *Klebsiella* spp.. Os inibidores de β -lactamase são estruturalmente semelhantes à penicilina, permitindo aos inibidores ligar-se irreversivelmente às β -lactamases, como substratos suicidas, mantendo-as inativas (Stefaniak *et al.* 2005). Na clínica, a combinação de um beta-lactâmico e um inibidor de β -lactamase tem demonstrado ser uma boa opção de tratamento já que o inibidor da enzima β -lactamase restaura a eficácia do antibiótico permitindo que estes continuem a tratar as mais variadas infecções (Williams 1999). No trabalho de Narayana & Vijayalakshmi (2008) a produção de antibióticos foi totalmente ausente no meio contendo sacarose.

O meio de cultura com adição de 0,5% de amido obteve um resultado similar ao meio com sacarose. Em crescimento por cinco dias, apenas dois isolados de *Streptomyces* spp. não apresentaram halos de inibição, um contra a *K. pneumoniae* 15 e outro contra a *K. pneumoniae* 15 e 26 (Tab. 5). Já quando os isolados de *Streptomyces* spp. cresceram por dez dias observou-se halo de inibição contra todas as amostras de *K. pneumoniae* (Tab. 5). Segundo Heck (2007), o meio amido caseína é utilizado para o crescimento dos isolados, pois possui uma fonte de carbono facilmente utilizável, o amido, que permite aos actinomicetos um rápido crescimento, sem necessariamente entrar em metabolismo secundário. Antunes (2010) e Zitouni *et al.* (2005) observaram que a melhor atividade antimicrobiana ocorreu com amido como fonte de carbono.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp sobre as cepas de *K. pneumoniae*, em meio contendo 0,5% de amido e com crescimento por cinco dias e dez dias.

Isolados Streptomyces	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	6		15		26	
	Tempo de incubação (dias)					
	5	10	5	10	5	10
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+
28	+	+	-	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+

33	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
37	+	+	-	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+
45	+	+	-	+	-	+
<hr/>						
Percentual de						
Isolados	100%	100%	90%	100%	96,66%	100%
Positivos						

Legenda: (+) = Atividade antimicrobiana positiva; (-) = Sem atividade antimicrobiana.

O meio de cultura com glicose gerou resultados diferentes dos outros meios. Com crescimento por cinco dias, nenhum isolado de *Streptomyces* spp. apresentou atividade antimicrobiana com formação de halo. 13,3% dos isolados (nº 31, 34, 35 e 39) apresentaram crescimento reduzido e outros 13,3% (nº 25, 26, 28 e 45) não apresentaram crescimento neste período (Tab. 6). Thakur *et al.* (2009) constataram que o crescimento celular não está relacionado com a produção de metabólitos secundários. Isto quer dizer que o meio pode promover o crescimento do microrganismo, porém a produção de moléculas com ação antimicrobiana pode ser baixa. Nascimento *et al.* (2014) relatam que a adição de glicose 1%

ao meio de cultivo favoreceu o crescimento da biomassa. Porém, essa mesma concentração apresentou em efeito negativo na produção de compostos antimicrobianos. Segundo Heck (2007) a falta de produção de compostos pode ocorrer já que a glicose é uma fonte de carbono prontamente disponível no meio, assim, com nutrientes em abundância, não é necessário entrar em metabolismo secundário, contribuindo assim somente para a síntese de material celular. Heck (2007) observou uma diminuição no pH do meio contendo glicose. Isso pode ser explicado devido à abundância de glicose no meio, assim o estreptomiceto segue a via glicolítica de Embden-Meyerhof, no qual a glicose é convertida em ácido pirúvico, que acaba por acidificar o meio.

Quando em crescimento por dez dias, somente o isolado nº 28 não apresentou crescimento. Um total de 21 isolados produziram halo: 17 isolados de *Streptomyces* spp. formaram halos contra a *K. pneumoniae* 6, dois isolados contra a *K. pneumoniae* 15 e dois isolados somente com a *K. pneumoniae* 26. Quatro isolados formaram halos contra as *K. pneumoniae* 6 e 26. Com dez dias de crescimento houve aumento no número de estreptomicetos que foram capazes de produzir compostos com ação inibitória sobre as cepas de *K. pneumoniae*. Provavelmente, com este período de incubação, a glicose foi consumida, diminuindo a quantidade de nutrientes no meio e acelerando a produção de antimicrobianos. O percentual de halos entre as *K. pneumoniae* também variou (Tab. 6). Esses resultados diferem dos encontrados por Carvalho (2011), Fguira *et al.* (2004) e Sujatha *et al.* (2005), em que os meios mais eficientes na produção de metabólitos foram os contendo glicose como fonte de carbono.

Tabela 6: Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp sobre as cepas de *K. pneumoniae*, em meio contendo glicose e com crescimento por cinco dias e dez dias.

Isolados Streptomyces	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	6		15		26	
	Tempo de incubação (dias)					
	5	10	5	10	5	10
16	-	+	-	-	-	-
17	-	+	-	-	-	-
18	-	+	-	-	-	-
19	-	+	-	-	-	+
20	-	+	-	-	-	-
21	-	+	-	-	-	-
22	-	+	-	-	-	-
23	-	+	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	SC	-	SC	-	SC	-
26	SC	-	SC	-	SC	-
27	-	-	-	-	-	-
28	SC	SC	SC	SC	SC	SC
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	+	-	-	-	-
32	-	+	-	-	-	-

33	-	+	-	-	-	-
34	-	+	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-
36	-	+	-	-	-	-
37	-	+	-	-	-	+
38	-	+	-	-	-	+
39	-	-	-	-	-	+
40	-	+	-	-	-	+
41	-	-	-	-	-	+
42	-	+	-	-	-	-
43	-	-	-	+	-	-
44	-	-	-	+	-	-
45	SC	-	SC	-	SC	-

Percentual de

Isolados	0%	56,66%	0%	6,66%	0%	20%
----------	----	--------	----	-------	----	-----

Positivos

Legenda: (+) = Atividade antimicrobiana positiva; (-) = Sem atividade antimicrobiana; SC = Sem Crescimento.

Quando os estreptomicetos foram incubados por dez dias, independentemente da fonte de carbono utilizada, observou-se uma maior produção de compostos com potencial antimicrobiano para inibir o crescimento das diferentes *K. pneumoniae*. No meio contendo sacarose foi observado que tanto em cinco quanto em dez dias os percentuais de produção de antimicrobiano foram iguais (100%) para todas as *K. pneumoniae*. Já no meio de cultura com glicose em crescimento por dez dias e o meio com 0,5% de amido com crescimento por cinco dias isso não foi observado, ou seja, os percentuais de produção de metabólitos não foram

mantidos para as três *K. pneumoniae* testadas e nem nos dois períodos de incubação. Por exemplo, no ágar com glicose com crescimento por cinco dias os percentuais de formação de compostos foram iguais para as três *K. pneumoniae* (0%); já em crescimento por dez dias, além do percentual aumentar, houve variações entre cada *K. pneumoniae*. O mesmo ocorreu com o ágar com 0,5% de amido, que com cinco dias de crescimento apresentou variações na produção de compostos entre as *K. pneumoniae*, mas com dez dias de crescimento, os percentuais de produção de antimicrobiano foram mantidos iguais (100%) para todas as *K. pneumoniae*.

Os antimicrobianos produzidos por esses isolados de *Streptomyces* spp. sobre as amostras de *K. pneumoniae* devem ser estudados mais profundamente, pois os resultados apresentados demonstram um grande potencial de produção de compostos interessantes para a indústria farmacêutica. Este trabalho corrobora com a ideia de que bactérias do solo e aquelas que habitam ambientes com condições extremas são muito promissoras na busca de novos antimicrobianos.

CONCLUSÃO

Todos os isolados de *Streptomyces* produziram compostos que se mostraram capazes de inibir o crescimento de uma ou mais amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos β -lactâmicos. O meio contendo 1% de sacarose foi considerado o mais eficiente para a produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas, tanto em crescimento por cinco quanto em dez dias. O meio contendo 0,5% de amido também foi considerado eficiente para a produção destes compostos, contanto que os isolados cresçam por dez dias. Os isolados que se mostraram eficientes na inibição do crescimento das três cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos β -lactâmicos podem ser estudados futuramente, visando a descoberta de novos e mais eficientes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

ALEF, K, NANNIPIERI, P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Londres: Academic Press. 576 p.

ANTUNES, T.C. 2010. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. 26fls. - Trabalho de Conclusão de Curso. UFRGS, Porto Alegre, 2010.

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., JACQUARD, C., GAVEAU-VAILLANT, N., KLENK, H-P., CLÉMENT, C., OUHDOUCH, Y., WEZEL, G.P.V. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. American Society for Microb. 80 (1): 1-44.

BÉRDY, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. The Journal of Antibiotics. 58: 1-26.

BORBA, M. P. 2013. Avaliação das condições ideais de crescimento para *Streptomyces* sp.: visando o potencial antimicrobiano. 28fls. -Trabalho de Conclusão de Curso. UFRGS, Porto Alegre, 2013.

BROWN, A. G.; COLE, M., BUTTERWORTH, D., HANSCOMB, G., HOOD, J. D., READING, C., ROLINSON, G. N. 1976. Naturally-occurring β - lactamase inhibitors with antibacterial activity. The Journal of Antibiotics. 29 (6): 668 – 669.

CARVALHO, T. S. 2011. Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos. 26fls. – Trabalho de Conclusão de Curso. UFRGS, Porto Alegre, 2011.

CORREA, A. S. 2017. Identificação do gene bla kpc em amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos em um hospital municipal. 34fls. – Trabalho de Conclusão de Curso. UFU, Uberlândia, 2017.

CUNHA, M. N. C., SILVA, M. N. V., TEIXEIRAS, M. F. S., MOTA, R.A., LIMA-FILHO, J. L., PORTO, T. S., PORTO, A.L.F. 2010. Actinomicetos produtores de inibidores de β -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 62 (6): 1312 – 1319.

FGUIRA, L.F.B., FOTSOB, S., AMEUR-MEHDIA, R. B., MELLOULIA, L., LAATSCHB,H. 2004. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Research in Micr. 156 (3): 341-347.

HANSEN, D.S., GOTTSCHAU, A., KOLMOS, H.J. 1998. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. J Hosp Infect. 38(2): 119-132.

HASSAN, M.A, EL-NAGGAR, M.Y, E SAID, W. Y. 2001. Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures.Egyptian Journal of Biology. 3: 1-10

HECK. M.G. 2007. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S. 112fls. Dissertação – Mestrado em Microbiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. UFRGS, Porto Alegre, 2007.

JORGENSEN, P.S., WERNLI, D., CARROLL, S.P., DUNN, R.R., HARBARTH, S., LEVIN, S.A., SO, A.D., SCHLÜTER, M., LAXMINARAYAN, R. 2015. Use antimicrobials wisely. Nature Article.537 (7619).

LUDWIG W., EUZÉBY, J., SCHUMANN, P., BUSSE, H.J., TRUJILLO, M.E., KÄMPFER, P., WHITMAN, W.B. 2015. Road map of the phylum Actinobacteria. Bergey's manual of systematic bacteriology. 5: 1–28.

MALEKI, H.; MASHINCHIAN, O. 2011. Characterization of *Streptomyces* isolates with UV, FTIR spectroscopy and HPLC analyses. Bioimpacts. 1(1): 47 - 52.

MÖLSTAD.S., et al. 2017. Lessons learnt during 20 years of the Swedish strategic programme against antibiotic resistance. *Bull World Health Organ.* 95: 764–773.

NAINE, J., SRINIVASAN,V., DEVI,C.S. 2011. Novel anticancer compounds from marine actinomycetes. *Journal of Pharmacy Research.* 4(4): 1285 - 1287.

NASCIMENTO, T.P., PORTO, C.S., Teixeira, M.F.S., Porto, T.S; Porto, A.L.F. 2014. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces*sp. ante isolados de mastite caprina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Vol. 66(1).

NARAYANA, K.J.P.; RAVIKIRAN, D.; VIJAYALAKSHMI, M. 2004. Production of antibiotics by *Streptomyces* species isolated from virgin soils. *Indian J. Microbiol.* 44: 147-148.

OLIVEIRA, D.V. 2016. Análise e caracterização de isolados ambientais da família Enterobacteriaceae quanto à presença de genes de resistência a B-lactâmicos. 58fls. Dissertação– Doutorado em Microbiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde.UFRGS, Porto Alegre, 2016.

PANDEY, A., CHANDRA.N., ANKITA SRIVASTAVA, A., KUMAR, D., KUMAR, S. 2018. Antimicrobial Metabolites Producing Soil Microorganisms: An update. *Indian Journal of Applied Microbiology.* 21(1): 1 - 12., ANKITA SRIVASTAVA, A., KUMAR, D., KUMAR, S.

PATHAK, P., JAISHI, N., YADAV, B.K., SHAH, P.K. 2017. Prevalence of Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) and Metallo Beta Lactamases (MBL) Mediated Resistance in Gram Negative Bacterial Pathogens. *Tribhuvan University Journal of Microbiology.* 4 (1): 49 -54.

PITOUT, J. D. D., NORDMANN, P., POIREL, L. 2015. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a key pathogen set for global nosocomial dominance. *American Society for Microbiology.*1-54.

SATHI,Z.S.; RAHMAN,M.A.A & GAFUR,M.A. 2001. Identification and in vitro anti microbial activity of a compound isolated from *Streptomyces* species. Pak J Biol Sci. 4(12): 1523 – 1525.

SUJATHA, P., BAPI, K.V.V.S.N., RAMANA, R.T. 2005. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microb.Research. 160 (2): 119 – 126.

STEFANIAK, L.A., DUARTE, E.L., NISHIYAMA, S.A.B., NAKANO, V. 2005. Resistência bacteriana: a importância das beta-lactamases. Revista Uningá. 4: 123 – 137.

THAKUR, D., BORA,C., BORDOLOI,G.N., MAZUMDAR, S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. J. Méd. Myc. 19 (3): 161-167.

VALLI, S., SUVATHI, S.S., AYSHA, O.S., NIRMALA, P., VINOTH, K.P., REENA, A. 2012. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2: 469-473.

.WAKSMAN S. A. 1961. The Actinomycetes: Classification, identification and descriptions of genera and species. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 2:61-292.

WILLIAMS, J.D. 1999. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. Inter. J. Antimicrob. Agents, 12: 3-7.ZANOL, F., M.; CANTARELLI. V.V. 2016. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): um mecanismo de resistência emergente. RBAC. 48(3): 4-9.

ZITOUNI. A., BOUDJELLA, H., LAMARI, L., BADJI, B., MATHIEU, F., LEBRIHI, A., SABAOU, N. 2005. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Research in Microbiology, 156: 984–993.

Anexo:

Instruções da Revista Brasileira de Biociências para envio do artigo.



DIRETRIZES PARA OS AUTORES

Versão atual, deste documento, disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/public/diretrizes.pdf>

SUMÁRIO DO PROCESSO DE SUBMISSÃO

Manuscritos deverão ser submetidos por um dos autores, em português, inglês ou espanhol. Para facilitar a rápida publicação e minimizar os custos administrativos, a **Revista Brasileira de Biociências aceitará somente submissões on-line. Não envie documentos impressos pelo correio.** O processo é compatível com os navegadores Internet Explorer versão 3.0 ou superior, Netscape Navigator e Mozilla Firefox. Outros navegadores não foram testados.

O autor da submissão será o responsável pelo manuscrito no envio eletrônico e em todo o acompanhamento do processo de avaliação.

Figuras e tabelas deverão ser organizadas em arquivos submetidos separadamente, como documentos suplementares. Documentos suplementares de qualquer outro tipo, como filmes, animações, ou arquivos de dados originais, podem ser submetidos como parte da publicação.

Se você estiver usando o sistema de submissão on-line pela primeira vez, vá para a página de **Cadastro** e registre-se, criando um 'login' e 'senha'. Se você está realmente registrado, mas esqueceu seus dados e não tem como acessar o sistema, clique em '**Esqueceu sua senha**'.

Você verá que o processo de submissão on-line é fácil e auto-explicativo. São apenas 5 (cinco) passos.

Se você tiver problemas de acesso ao sistema, cadastro ou envio de trabalhos, por favor, entre em contato com o nosso **Suporte Técnico**.

CUSTOS DE PUBLICAÇÃO

Os autores não terão nenhum custo para a publicação dos seus trabalhos. Figuras e gráficos coloridos também são livres de despesas (veradiante).

Seguindo a política do Open Access do Public Knowledge Project, assim que publicados, os autores receberão a URL que dará acesso ao arquivo em formato Adobe® PDF (Portable Document Format). Os autores não receberão cópias impressas do seu manuscrito publicado.

PUBLICAÇÃO E PROCESSO DE AVALIAÇÃO

Durante o processo de submissão, será solicitado que os autores enviem uma carta de submissão, explicando o porquê de publicar na Revista, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância

científica do mesmo.

Os manuscritos serão enviados para avaliadores, a menos que não sejam enquadrados na Revista. Antes de serem submetidos para consultores especializados, os trabalhos são avaliados pelo Editor-Chefe, o qual decide se o trabalho recebido é de suficiente relevância para a Revista Brasileira de Biociências. Os trabalhos serão sempre avaliados por dois especialistas que terão a tarefa de fornecer um parecer, tão logo quanto possível. Um terceiro avaliador poderá ser consultado caso seja necessário. Os avaliadores não serão obrigados a assinar os seus relatórios de avaliação.

Uma "**Carta de submissão**", explicando o motivo de publicar na Revista, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo, deverá ser digitada no campo "**Comentários ao Editor**", durante o processo de submissão eletrônica. Caso os autores decidam enviar uma versão assinada (em formato DOC ou PDF, por exemplo), a Carta de submissão pode ser enviada na forma de documento suplementar, separadamente.

Os autores **deverão fornecer informações de contato detalhado (e-mail) de pelo menos quatro potenciais revisores para o seu trabalho.** Estas informações deverão ser digitadas, também, no campo "Comentários ao Editor", durante a submissão, logo após a "Carta de submissão". Os potenciais revisores deverão ser especialistas na área de concentração do trabalho enviado. **Qualquer um dos revisores sugeridos não deverá ter publicado qualquer trabalho com os autores nos últimos cinco (5) anos, nem ser membro da mesma Instituição.** Revisores sugeridos serão considerados revisores em potencial de acordo com a análise e recomendação dos Editores.

Desde que um manuscrito é avaliado, aceito, revisado e editorado, ele é imediatamente publicado na edição corrente da Revista Brasileira de Biociências, em formato PDF. Todos os autores têm a capacidade de acompanhar o progresso de submissão do seu trabalho no sistema a qualquer tempo, desde que esteja logado no sistema da revista.

PREPARANDO OS ARQUIVOS

Os textos deverão ser formatados em **uma coluna, usando a fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo e todas as margens com uma polegada (2,54 cm), em formato de papel A4.** Todas as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Não numere as linhas. O manuscrito deverá estar em formato Microsoft® Word DOC (versão 2 ou superior). Arquivos

em formato RTF também serão aceitos. **Não submeta arquivos em formato Adobe® PDF.**

O arquivo que contém o texto principal do manuscrito não deverá incluir qualquer tipo de figura ou tabela. **Estas deverão ser submetidas como documentos suplementares, separadamente.**

Ao submeter um manuscrito, o autor responsável pela submissão deverá optar por uma das seguintes seções: ‘Artigo completo’, ‘Revisão’ ou ‘Nota científica’.

Todos os trabalhos submetidos no envio on-line deverão ser subdivididos nas seguintes seções:

1. Documento Principal:

Primeira página. Deverá conter as seguintes informações:

- Título do trabalho, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações.
- Nome completo e por extenso do(s) autor(es), com iniciais em maiúsculo.
- Título resumido do trabalho, com até 75 caracteres (incluindo espaços).
- Afiliações e endereço completo de todos os autores (instituição financiadora (auxílio ou bolsas), deverá constar nos Agradecimentos).
- Autor para contato e respectivo e-mail (apenas o autor para contato deverá fornecer um e-mail).

Segunda página. Deverá conter as seguintes informações:

- Resumo: incluir o título do trabalho em português, quando o trabalho for escrito em inglês.
- Abstract: incluir o título do trabalho em inglês, quando o texto for em português. Tanto o Resumo como o Abstract deverão conter, no máximo, 250 (duzentos e cinquenta) palavras, estruturados em apresentação, contendo o contexto e o propósito do estudo, resultados e conclusões (por favor, omita o título).
- Palavras-chave e key words para indexação: no máximo cinco, não devendo incluir palavras do título.

Páginas subsequentes. ‘Artigos completos’ e ‘Notas científicas’ deverão estar estruturados em **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (Resultados e Discussão podendo ser reunidos), Agradecimentos e Referências**, seguidos de uma **lista completa das legendas das figuras e tabelas** (se forem submetidas como documentos suplementares).

2. Documentos Suplementares:

Figuras e tabelas. Todas as imagens (ilustrações, fotografias, fotomicrografias, eletromicrografias e gráficos) são consideradas ‘figuras’. **Figuras e tabelas devem ser fornecidas como arquivos separados (documentos suplementares), nunca incluídos no texto do documento principal.** Figuras coloridas serão permitidas e os editores estimularão que os autores assim façam. **Não haverá cobrança de custos adicionais para figuras a cores,** já que a impressão das mesmas (quando houver) será sempre feita em preto e branco.

A Revista Brasileira de Biociências **não aceitará figuras submetidas no formato GIF ou comprimidas em arquivos do tipo RAR ou ZIP.** Se as figuras no formato TIFF são um obstáculo para os autores, por seu tamanho muito elevado, os autores podem convertê-las para o formato JPEG, antes da sua submissão, resultando em uma significativa redução no tamanho. Entretanto, não se esqueça que a compressão no formato JPEG pode causar prejuízos na qualidade das imagens. Assim, é recomendado que os arquivos JPEG sejam salvos nas qualidades ‘Alta’ (High) ou ‘Máxima’ (Maximum).

Não forneça imagens em arquivos Microsoft® PowerPoint (geralmente geradas com baixa resolução), nem em arquivos do Microsoft Word (DOC). Arquivos contendo imagens em formato Adobe® PDF também não serão aceitos. **A submissão será arquivada se conter figuras em arquivos DOC, PDF ou PPT.**

Cada figura deverá ser editada para minimizar as áreas de espaços em branco, otimizando o tamanho final da ilustração. Se a figura consiste de diversas partes separadas, é importante que uma simples figura seja submetida, contendo todas as partes da figura.

Escalas das figuras deverão ser fornecidas com os valores apropriados e devem fazer parte da própria figura (inseridas com o uso de um editor de imagens, como o Adobe® Photoshop, por exemplo), **sendo posicionadas no canto inferior esquerdo de cada figura.**

Ilustrações em preto e branco deverão ser fornecidas com aproximadamente 300 dpi de resolução, em formato TIFF ou JPG. Para fotografias (em preto e branco ou coloridas), fotomicrografias ou eletromicrografias, forneça imagens em TIFF ou JPG, com pelo menos, 300 dpi. **ATENÇÃO!** Como na editoração final dos manuscritos o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura mínima das figuras deve ser **2000 pixels**. Para figuras de uma coluna (82 mm de largura), a largura mínima das figuras (para 300 dpi), deve ser pelo menos **1000 pixels**. **Submissões de figuras fora destas características (larguras mínimas em pixels) serão imediatamente arquivadas.**

As imagens que não contêm cor devem ser salvas como ‘grayscale’, sem qualquer tipo de camada (‘layer’), como as geradas no Adobe® Photoshop, por exemplo (estes arquivos ocupam até 10 vezes mais espaço que os arquivos TIFF e JPG).

Os tipos de fontes nos textos das figuras deverão ser Arial ou Helvetica. Textos deverão ser legíveis. Abreviaturas nas figuras (sempre em minúsculas) devem ser citadas nas legendas e fazer parte da própria figura, inseridas com o uso de um editor de imagens (Adobe® Photoshop, por exemplo). **Não use abreviaturas, escalas ou sinais (setas, asteriscos), sobre as figuras, como “caixas de texto” do Microsoft® Word.**

Recomenda-se a criação de uma única estampa, contendo várias figuras reunidas, numa largura máxima de 170 milímetros (duas colunas) e altura máxima de 257

mm (página inteira). **A letra indicadora de cada figura deve estar posicionada no canto inferior direito.** Inclua “A” e “B” (sempre em maiúsculas, não “a”, “b”) para distingui-las colocando, na legenda, Fig. 1A, Fig. 1B, e assim por diante.

Não envie figuras com legendas inseridas na base das mesmas. **As legendas das figuras deverão ser enviadas no final do documento principal**, imediatamente após as Referências.

Não use bordas de qualquer tipo ao redor das figuras. Se houver composição de figuras (Figs 1A, 1B, etc.), use cerca de 1 mm (12 pixels para uma figura com largura de 2000 pixels) de espaço em branco entre cada figura. É responsabilidade dos autores obter a permissão para reproduzir figuras ou tabelas que tenham sido previamente publicadas.

Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações: número da figura (em ordem numérica, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie) e a legenda detalhada, com até 300 caracteres (incluindo espaços).

Cada tabela deverá ser numerada sequencialmente, com números arábicos (Tabela 1, 2, 3, etc.; não abrevie). O título das tabelas deverá estar acimadas mesmas. **Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas (“Tabela”) do Microsoft® Word.** Colunas e linhas da tabela devem ser visíveis, optando-se por usar linhas pretas que serão removidas no processo de edição final. Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas.

Dados mais extensos podem ser enviados como arquivos suplementares, mas que não estarão disponíveis no próprio artigo, mas como links para consulta pelo público.

NORMAS GERAIS

Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em itálico. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Escrever os números até dez por extenso, a menos que sejam seguidos de unidade de medida, ou indiquem numeração de figuras e tabelas. **Utilize um espaço para separar as unidades de medidas dos valores (10 m, por exemplo).** A unidade de temperatura em graus Celsius deve ser escrito com um espaçamento entre o valor numérico (23 °C, por exemplo).

A posição preferencial de cada figura ou tabela **não deverá** ser indicada no texto. Isso ficará a critério do editor, durante a editoração. **Sempre verifique que as figuras e tabelas estejam citadas no texto.** No texto, use abreviaturas (Fig. 1 e Tab. 1, por exemplo). Evite notas de rodapé. Se necessárias, utilizar numeração arábica em sequência.

As citações de autores no texto deverá seguir os seguintes exemplos: Baptista (1977), Souza & Barcelos (1990), Porto *et al.* (1979) e (Smith 1990, Santos *et al.*

1995). Citar o(s) autor(es) das espécies só a primeira vez em que as mesmas forem referidas no texto. Citações de resumos de simpósios, encontros ou congressos deverão ser evitadas. Use-as somente se for absolutamente necessário. Comunicações pessoais não deverão ser incluídas na lista de Referências, mas poderão ser citadas no texto. A obtenção da permissão para citar comunicações pessoais e dados não publicados é de exclusiva responsabilidade dos autores. Abreviatura de periódicos científicos deverá seguir o Index Medicus/MEDLINE. Citações, nas Referências, deverão conter todos os nomes dos autores (não use *et al.*)

As referências deverão seguir **rigorosamente** os seguintes exemplos:

Artigos publicados em periódicos:

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74:55-80.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHI-WAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Bol. Inst. Biocienc.* 51:1-174. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 22).

Livros publicados por editoras:

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. *Bio-ecology: an introduction*. 2nd ed. New York: J. Wiley. 425 p.

LOWE-MCCONNELL, R. H. 1987. *Ecological studies in tropical forest communities*. Cambridge: Cambridge University Press. 382p.

Capítulos de livro:

CEULEMANS, R. & SAUGIER, B. 1993. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.). *Physiology of Trees*. New York: John Wiley & Sons. p. 21-50.

NAKATANI, K., BAUMGARTNER, G. & CAVICCHIOLI, M. 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M., AGOSTINHO, A. A. & HAHN, N. S. (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM. p. 281-306.

Anais de encontros, congressos, etc.:

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esfero-cristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.). CONGRESSOS SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS. REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142.

Dissertações de mestrado, doutorado.

DILLENBURG, L. R. 1986. *Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS*. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

Links de páginas disponíveis na Internet:

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em: <<http://www.priberam.pt/Dicionarios/dlp.htm>>. Acesso em: 8 mar. 1999.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. 2012. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 26 ago. 2012.

Para documentos com DOI® (Digital Object Identifier) conhecido, seguir o exemplo abaixo (não usar “Disponível em: <...> Acesso em:”):

SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 237: 185-198. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0257-2>>

Em trabalhos de taxonomia vegetal e florística, as seguintes normas específicas deverão ser observadas:

1. *Chaves de identificação*: dicotômicas, indentadas, utilizando alternativas 1-1'. Os táxons devem ser numerados em ordem alfabética, dentro de sua categoria taxonômica e na ordem em que aparecerão no texto.
2. As *descrições* devem ser sucintas e uniformes.
3. *Autores de nomes científicos* devem ser citados de forma abreviada, de acordo com Brummit & Powell (1992).
4. *Citações e abreviaturas* das Opus Princeps devem seguir Stalé *et al.* (1976-1988). No caso de periódicos, seguir Bridson & Smith (1991). Como alternativa, seguir o *International Plant Names Index* (IPNI - <http://www.ipni.org/index.html>), onde as citações seguem as obras mencionadas acima.
5. *Índice de nomes científicos citados no manuscrito*: no caso de monografias, o índice deve relacionar, em ordem alfabética, os táxons abaixo do nível de gênero, sem os autores, colocando em **negrito** a página onde inicia a descrição do táxon. Os nomes válidos devem ser citados em letra normal e os sinônimos em itálico.
6. Incluir lista de exsiccatas apresentadas no manuscrito: *Schultz, A. : 12* (2.8-ICN), *25* (2.9-BLA, ICN) 12 e 25 = números do coletor. 2.8 = 2 número do gênero e 8 número da espécie, no trabalho.

ICN = sigla do herbário onde está depositado o espécime citado.

Caso o trabalho trate apenas de um gênero:

Schultz, A. : 110 (3-ICN)

3 = número da espécie.

No caso de dois ou mais coletores, citar apenas o primeiro.

Se o coletor não tiver número de coleta:

Barreto, I. L. : BLA 1325 (número do gênero e espécie, ou só o número da espécie).

7. *Material examinado*: deverá ser citado apenas material selecionado, um exemplar por município. Se a relação de material selecionado for muito extensa (ou se o autor não julgar necessário), citar todos os municípios. De modo a demonstrar a distribuição geográfica do táxon e não ultrapassar o número de páginas previstas, deverão ser citados apenas um ou poucos exemplares por região isogeográfica (Fortes 1959).

Quando forem dois coletores usar o &. Mais de dois coletores, citar o primeiro e usar *et al.* Países, estados, municípios e localidades devem ser citados em ordem alfabética.

Exemplos:

BRASIL. RIO GRANDE DO SUL: **Torres**, 23 maio 1975, *L.R. Dillenburg 17* (ICN);

Tupanciretã, 8 jul. 1977, *L.R.M. Baptista et al. 911* (ICN); **Uruguaiana**, 25 mar. 1978;

M.L. Porto s.n. (ICN 2530); **Vacaria**, 1 abr. 1975, *B. Irgang & P. Oliveira 45* (BLA, ICN).

Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul:

1. *Lupinus albescens* Hook. & Arn., *Bot. Misc.* 3 : 201. 1833 (Fig. 1).

Sinonímia (citar o basônimo, quando for o caso). Citar o trossinônimo somente quando for estritamente necessário para o conhecimento do táxon na área estudada.

Descrição: baseada em material do Rio Grande do Sul, em dois parágrafos, vegetativo e reprodutivo.

Distribuição geográfica: geral no Rio Grande do Sul, esta última utilizando as regiões isogeográficas de Fortes (1959). Não devem ser utilizados mapas com pontos de coleta no Rio Grande do Sul.

Habitat:

Observações:

Material selecionado: citar somente material do Rio Grande do Sul. Se necessário, por desconhecimento deste material, citar “material adicional examinado” de outras regiões.