

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS UTILIZANDO BOX-PCR E URP-PCR E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTO BIOATIVO PRODUZIDO POR UM ISOLADO DE *Streptomyces* sp.

MARCELA PROENÇA BORBA

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

Co-orientadora: Dr.^a. Ana Paula Folmer Correa

Porto Alegre

Março/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS
UTILIZANDO BOX-PCR E URP-PCR E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTO BIOATIVO
PRODUZIDO POR UM ISOLADO DE *Streptomyces* sp.**

Marcela Proença Borba

Bacharela em Ciências Biológicas - UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Correa

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Borba, Marcela Proença

Caracterização de isolados de actinobactérias utilizando BOX-PCR e URP-PCR e purificação de composto bioativo produzido por um isolado de *Streptomyces* sp. / Marcela Proença Borba. -- 2016. 69 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.
Coorientadora: Ana Paula Folmer Correa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Actinobacteria. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Antibiótico. 4. PCR fingerprinting. 5. Diversidade genética. I. Van Der Sand, Sueli Teresinha, orient. II. Correa, Ana Paula Folmer, coorient. III. Título.

“I don't love studying. I hate studying. I like learning. Learning is beautiful.”

Natalie Portman

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a Sueli Van Der Sand pela confiança, disponibilidade e motivação.

A minha co-orientadora Dr^a Ana Paula Folmer Correa pelas longas conversas durante as colunas e liofilizações.

A minha aluna de iniciação científica Ana Elisa Ballarini pela ajuda constante e indispensável. Ao aluno de iniciação científica João Paulo Witsuk Duarte pelas milhares ajudinhas, esgotamentos e autoclaves.

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli pelas dicas e planejamentos e a Prof^a Dr^a Marisa da Costa pela ajuda sempre gentil com o liofilizador.

A técnica de laboratório MsC Sayonara Peixoto Rosa pelo auxílio incansável no HPLC.

A minha colega de laboratório Themis Collares Antunes que me mostrou, lá em 2010, que eu podia fazer ciência. A minha colega de laboratório Daniele Vargas de Oliveira que me ensinou tudo que podia de biologia molecular. A minha colega de laboratório e de faculdade, Ana Carolina Medeiros Milanezi por tantos desabafos e reclamações. As minhas colegas Mariana Bahlis e Luciana Milagre pelas risadas e brownies.

A todos os colegas que passaram pelo laboratório 209/323 durante minha estadia por terem aguentado todos os meus bilhetes, organizações e pitis.

A minha mãe Maria de Fátima Paulo Proença que sempre possibilitou que meus estudos fossem minha prioridade.

Ao meu namorado Voltaire Dutra Paes Neto que sempre me manteve calma e confiante. Aos meus irmãos Leonardo da Rosa Borba e Pedro da Rosa Borba por só me mostrarem amor.

Ao Voltaire Dutra Paes Junior pelo notebook, mais de uma vez.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS UTILIZANDO BOX-PCR E URP-PCR E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR UM ISOLADO DE *Streptomyces* SP.

Borba, MP¹

Autora: Marcela Proença Borba

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

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Folmer Correa

RESUMO

O filo Actinobacteria é um importante grupo de bactérias Gram positivas amplamente distribuídas nos ambientes aquáticos e terrestres, são grandes produtores de compostos biologicamente ativos e, portanto, de grande interesse biotecnológico. O gênero *Streptomyces* destaca-se como maior produtor destes compostos, sendo responsável por cerca de 70% dos antibióticos que hoje utilizamos. A identificação dos organismos deste gênero ainda é um desafio. Durante muitos anos a identificação foi realizada somente com base em características morfológicas e fisiológicas. Atualmente, com o avanço das técnicas moleculares, há um grande número de espécies relatadas em bancos de dados genômicos. Este trabalho tem por objetivo identificar isolados de actinobactérias presentes no Laboratório de Microbiologia Ambiental ICBS/UFRGS com auxílio das técnicas de BOX-PCR, amplamente utilizado em estudos de diversidade dentro deste filo, e URP-PCR. E, além disso, realizar purificação parcial de um composto antimicrobiano efetivo contra bactérias produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S. Os *primers* URP e BOX1AR produziram distintos padrões de amplificação nos isolados estudados, porém não foi possível investigar as relações de similaridade entre eles. Ainda o sequenciamento da região 16S rDNA não foi eficiente para identificar as espécies. Para a purificação do composto antimicrobiano foi realizada extração líquido-líquido com o solvente acetato de etila, posteriormente cromatografia de gel-filtração (Sephadex G-75) e troca iônica (SP-Sepharose e DEAE-celulose). A atividade antimicrobiana do composto foi recuperada após cada etapa. O composto manteve-se ativo após os ensaios de estabilidade frente à adição de EDTA, enzimas proteolíticas e altas temperaturas. Isto sugere que o composto antimicrobiano não é de origem protéica. Este trabalho sugere novos estudos a partir dos resultados preliminares obtidos, como a amplificação de todo o fragmento 16S rDNA dos isolados de actinobactérias e a investigação do composto antimicrobiano através de cromatografias de alta resolução.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69 p.) Março, 2016.

CHARACTERIZATION OF ACTINOBACTERIAS ISOLATES USING BOX-PCR AND
URP-PCR AND PURIFICATION OF A BIOACTIVE COMPOUND PRODUCED BY
AN ISOLATE OF *Streptomyces* sp.

Borba, MP¹

Author: Marcela Proença Borba

Advisor: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand

Co-Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Folmer Correa

ABSTRACT

The Actinobacteria phylum is an important group of Gram positive bacteria widely distributed in terrestrial and aquatic environments. They are major producers of biologically active compounds and therefore of great biotechnological interest. The genus *Streptomyces* stands out as the largest producer of these compounds, accounting for about 70% of the antibiotics that we use today. The identification of these organisms is still a challenge. For many years the identification was carried out only based on morphological and physiology characteristics. Today, with the advance of molecular techniques, there are a large number of species reported in genomics database. This work aims to identify isolates of actinobacterias present in the Laboratório de Microbiologia Ambiental ICBS / UFRGS with the help of BOX-PCR techniques, widely used in diversity studies within this phylum, and URP-PCR. And besides that, performing partial purification of an antimicrobial compound effective against bacteria produced by *Streptomyces* 8S isolated. The URP and BOX1AR primers produced different amplification patterns in the isolates, but it was not possible to investigate the relationship of similarity between them. Also the sequencing of 16S rDNA was not efficient to identify the species. To purify the antimicrobial compound was carried out liquid-liquid extraction with the solvent ethyl acetate, subsequently chromatography: gel-filtration (Sephadex G-75) and ion exchange (SP-Sepharose and DEAE-cellulose). The antimicrobial in question did not adhere to the SP-Sepharose column, showing that it has negative charge. The antimicrobial activity of the compound was recovered after each step. The compound remained active after the stability tests like the addition of EDTA, proteolytic enzymes and high temperatures. This suggests that the antimicrobial compound is not a protein. This work suggests further studies based on the obtained preliminary results such as the amplification of the entire 16S rDNA of actinobacterias isolated fragment and the investigation of the antimicrobial compound using high resolution chromatography.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (69 p.) March, 2016.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Actinobacteria	4
3.1.1	<i>Streptomyces</i>	5
3.2	Caracterização do grupo.....	6
3.2.2.	PCR fingerprinting.....	6
3.2.2.1	BOX-PCR.....	7
3.2.2.2	URP-PCR.....	8
3.3	Produção de compostos bioativos	8
3.3.1	Purificação	10
3.3.2	Colunas cromatográficas	11
4.	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	Isolados de actinobactérias.....	13
4.1.1	Recuperação dos isolados de actinobactérias.....	13
4.1.2	Armazenamento dos isolados recuperados	13
4.2	BIOLOGIA MOLECULAR.....	14
4.2.1	Extração de DNA	15
4.2.2	Concentração de DNA	15
4.2.3	Amplificação do DNA utilizando URP-PCR.....	15
4.2.4	Amplificação do DNA utilizando BOX-PCR.....	16
4.2.5	Análise dos padrões de amplificação.....	17
4.2.6	Sequenciamento dos isolados	17
4.3	PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO	18
4.3.1	Produção do extrato bruto com atividade antimicrobiana	18
4.3.2	Avaliação de estabilidade frente à ação de EDTA	18
4.3.3	Avaliação de estabilidade frente a enzimas proteolíticas.....	18
4.3.4	Avaliação de estabilidade frente a diferentes temperaturas.....	19
4.3.5	Avaliação de estabilidade frente de diferentes tamanhos	19
4.3.6	Extração Líquido-líquido	20

4.3.7	Colunas cromatográficas	20
4.3.8	SDS-PAGE	20
4.3.9	<i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC)	20
4.3.10	Método de difusão em poço	21
5.	RESULTADOS	22
5.1	BIOLOGIA MOLECULAR	22
5.1.1	Amplificações utilizando BOX-PCR	22
5.1.2	Amplificações utilizando os <i>primers</i> URP-PCR	26
5.1.3	Sequenciamento.....	40
5.2	PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO	42
5.2.1	Extração líquido-líquido	42
5.2.2	Colunas cromatográficas	42
5.2.3	Avaliações de estabilidade	43
6.	DISCUSSÃO	46
7.	CONCLUSÃO	52
8.	REFERÊNCIAS	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	14
Tabela 2	16
Tabela 3	26
Tabela 4	29
Tabela 5	30
Tabela 6	30
Tabela 7	40
Tabela 8	42
Tabela 9	44
Tabela 10	44
Tabela 11	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.....	11
Figura 2	23
Figura 3.....	23
Figura 4.....	25
Figura 5.....	28
Figura 6.....	31
Figura 7.....	32
Figura 8.....	33
Figura 9.....	34
Figura 10.....	35
Figura 11.....	36
Figura 12.....	37
Figura 13.....	38
Figura 14.....	39
Figura 15.....	41

1. INTRODUÇÃO

O filo *Actinobacteria* é uma das maiores unidades taxonômicas dentro do domínio Bacteria. São bactérias Gram positivas amplamente distribuídas nos ecossistemas terrestres e aquáticos. São micro-organismos aeróbios, quimioautotróficos e mesófilos. Organismos deste filo representam uma grande proporção da biomassa microbiana nos solos. A ordem *Actinomycetales* possui importância na produção de compostos biologicamente ativos graças ao complexo metabolismo secundário apresentado por estas bactérias.

Dentro nesta ordem, encontramos o gênero *Streptomyces*, principal produtor de antibióticos e outras substâncias bioativas. Cerca de 7000 metabólitos já foram isolados deste gênero, pois em um único isolado podemos identificar mais de um composto e estes podem ter atividade biológica distinta. Vários antibióticos distintos, com diferença química, estrutural e sítio alvo foram isolados de espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces*, o que o torna responsável por aproximadamente 70% dos antibióticos hoje disponíveis. Apesar de não esclarecido, o benefício de se produzir um antibiótico no ambiente deve ser suficientemente grande, pois sua produção é bastante custosa, ocupando cerca de 4,5% do genoma de *S. coelicolor*, por exemplo.

A identificação de isolados do gênero *Streptomyces* durante muitos anos foi realizada somente com base na morfologia da colônia, das hifas e em ensaios bioquímicos. Atualmente, o sequenciamento da região 16S do rRNA é utilizado para a identificação do gênero. No entanto o uso destas sequências não discrimina muito bem espécies relacionadas.

Diferentes técnicas de *fingerprint* de DNA vem sendo utilizadas para identificação dos mais diversos organismos, graças aos padrões de amplificação gerados a partir do uso de *primers* que podem ser específicos de certas regiões ou de anelamento inespecífico. BOX-PCR visa à amplificação da região consenso de 154pb denominada BOX, descoberta no genoma de *Streptococcus pneumoniae*. Esta técnica apresenta boa reprodutibilidade para identificação de actinobactérias. URP-PCR utiliza *primers* oriundos do genoma do arroz a fim de amplificar regiões aleatórias do DNA e mostrou-se eficiente para uma grande diversidade de organismos.

Na busca pela caracterização e purificação das moléculas com atividade

antibiótica depara-se com uma grande dificuldade que é a padronização dos métodos de purificação. Os compostos oriundos de *Streptomyces* são bastante variados, tornando o processo de obtenção do composto com atividade antimicrobiana um desafio. A separação das moléculas com atividade biológica presente no extrato bruto pós-cultivo, geralmente se inicia pela extração com solventes orgânicos. Após, técnicas de cromatografia são utilizadas, baseadas em métodos de separação por características físico-químicas, como tamanho, carga elétrica e solubilidade.

Tendo em vista a dificuldade de identificação de isolados de estreptomicetos, este trabalho teve como objetivo a utilização das técnicas de BOX-PCR e URP-PCR visando à identificação de isolados deste grupo presentes na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental ICBS/UFRGS. Além disto, este trabalho buscou purificar e caracterizar parcialmente um composto com atividade antimicrobiana produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S, que já havia apresentado produção de atividade antimicrobiana em estudos anteriores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste projeto é avaliar a diversidade genética de isolados de actinobactérias pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICBS/UFRGS e a purificação parcial dos compostos com atividade antimicrobiana produzidos pelo isolado *Streptomyces* 8S.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Utilizar os *primers* de URP-PCR visando à caracterização dos isolados de actinobactérias;
- 2.2.2 Avaliar o perfil de amplificação dos isolados de actinobactérias após URP-PCR
- 2.2.3 Discriminar os isolados de actinobactérias com base no perfil de amplificação obtido na técnica URP-PCR;
- 2.2.4 Utilizar o *primer* BOX1AR na técnica de BOX-PCR visando à caracterização dos isolados de actinobactérias;
- 2.2.5 Avaliar o perfil de amplificação dos isolados de actinobactérias após BOX-PCR
- 2.2.6 Discriminar os isolados de actinobactérias com base no perfil de amplificação obtido na técnica BOX-PCR;
- 2.2.7 Realizar o sequenciamento do DNA ribossomal 16S dos isolados com diferente perfil de amplificação nas metodologias usando BOX e URP, para identificação das espécies;
- 2.2.8 Avaliar a ação de diferentes solventes orgânicos para extração dos compostos com atividade antimicrobiana a partir do extrato bruto produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S;
- 2.2.9 Purificar e caracterizar parcialmente o composto antimicrobiano através de colunas cromatográficas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O Filo Actinobacteria

Este filo é uma das maiores unidades taxonômicas dentro do domínio Bacteria. Compreende cinco classes: Nitriliruptoria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Thermoleophilia, Rubrobacteria; seis ordens: Rubrobacterales, Acidimicrobiales, Solirubrobacterales, Coriobacterales, Bifidobacterales e Actinomycetales; 14 subordens com 39 famílias e 130 gêneros (Embley & Stackebrandt, 1994; Ludwig *et al.*, 2012). A maioria dos organismos que compreendem o filo são de vida livre e estão amplamente distribuídos nos ecossistemas terrestres e aquáticos (Goodfellow & Williams, 1983). São bactérias Gram positivas e seus genomas possuem um alto conteúdo de guanina e citosina. Apresentam morfologias variadas, de cocos e cocobacilos a hifas. As espécies filamentosas crescem por extensão de uma extremidade da célula, dando origem a uma corrente de células que forma a hifa. Posteriormente ocorre a ramificação das hifas, originando o micélio. As bactérias filamentosas podem se reproduzir por esporulação. As actinobactérias foram por muito tempo consideradas uma forma intermediária entre fungos e bactérias, porém estas bactérias possuem um cromossomo disperso no citoplasma, uma parede celular de peptidoglicano, além de serem suscetíveis a agentes antibacterianos (Barka *et al.*, 2016). São micro-organismos aeróbios e quimioautotróficos capazes de utilizar uma grande variedade de fontes nutricionais, inclusive polissacarídeos complexos (Goodfellow & Williams, 1983, Barka *et al.*, 2016). Como outras bactérias do solo, actinobactérias são mesófilas em sua maioria, podendo existir algumas linhagens termofílicas (Goodfellow & Williams, 1983; Edwards, 1993).

Organismos deste filo desempenham um importante papel na decomposição de material orgânico e por tanto, no ciclo do carbono. No solo, representam uma grande proporção da biomassa microbiana (Goodfellow & Williams, 1983). São minoritariamente causadores de graves infecções em humanos e animais (McNeil & Brown, 1994) e alguns são fitopatógenos (Kaup *et al.*, 2005). A ordem Actinomycetales (Buchanan, 1917) possui cerca de 80 gêneros, bastante importantes na produção de compostos biologicamente ativos, tornando a pesquisa por novos produtos naturais altamente promissora neste grupo, visto que somente 1% dos organismos presentes no solo são conhecidos e cultiváveis (Bérday, 2012).

3.1.1 *Streptomyces*

Streptomyces (Waskman & Henrici, 1943) é o principal gênero produtor de compostos biologicamente ativos e representa 95% dos organismos isolados do solo pertencentes à classe Actinomycetales (Barka *et al.*, 2016). Estreptomicetos tem sido a maior fonte de produtos naturais desde a descoberta da actinomicina, estreptomicina e estreptotricina, em 1940 por Waskman e colaboradores (Ventura *et al.*, 2007). Graças ao seu complexo metabolismo secundário, estas bactérias são capazes de produzir numerosas moléculas que são ativas fora da célula produtora e inibem processos celulares nos micro-organismos vizinhos (Chater *et al.*, 2010).

Estreptomicetos sintetizam um grande número de compostos químicos diferentes, podendo um único isolado apresentar mais de um composto com atividade biológica distinta. Pelo menos 7.000 metabólitos diferentes foram descobertos em isolados de *Streptomyces* (Bérdy, 2005). Seus metabólitos secundários podem exibir propriedades antitumorais, moduladores de resposta imune, fatores de crescimento, antivirais, anti-helmínticas, antifúngicas, larvicidas e antibióticas (Sanglier *et al.*, 1993; Thakur *et al.*, 2007; Procópio *et al.*, 2012; Dochhil *et al.*, 2013; Tanvir *et al.*, 2014; Golinska *et al.*, 2015).

Como nos outros representantes do filo, o conteúdo G+C do gênero encontra-se entre 66-78%. Apresentam um grande cromossomo linear com 8 a 10 Mb. Há presença de plasmídeos lineares e circulares (Ventura *et al.*, 2007).

Estreptomicetos possuem um micélio multicelular. Isto se dá através da germinação do esporo em hifa vegetativa que cresce até se tornar um micélio ramificado (Chater *et al.*, 2010). O crescimento da hifa consiste em uma combinação entre extensão da célula e ramificação da hifa, sem fissão celular, levando a uma hifa compartimentalizada (Claessen *et al.*, 2014). Sob situação adversa, o micélio vegetativo se diferencia em hifa aérea, sendo este o momento em que a maioria dos antibióticos são produzidos (Chater *et al.*, 2010). O micélio vegetativo e o aéreo podem ser pigmentados (Kämpfer, 2010) e podem apresentar produção de pigmento extracelular e difusível no meio.

Estas bactérias possuem uma alta capacidade de degradação de substratos poliméricos, tais como caseína, gelatina e amido. Conseguem utilizar uma grande gama de componentes orgânicos como fonte de carbono. As temperaturas ótimas de crescimento para a maioria das espécies do gênero é de 25°C – 35°C, e o pH ótimo situa-se entre 6,5 – 8,0. Não possuem ácidos micólicos

de parede, comuns a outros gêneros pertencentes ao filo Actinobacteria (Brennan, 2003). Mas por sua vez, possuem um complexo padrão de lipídios polares na parede celular, que podem ser usados como diagnóstico para identificação (Kämpfer, 2010).

3.2 Caracterização do grupo

O filo Actinobacteria é delineado com base nas sequências 16S rRNA (Embley & Stackebrandt, 1994, Gao & Gupta, 2012). A identificação de isolados do gênero *Streptomyces*, durante muitos anos, foi realizada somente com base na morfologia da colônia, das hifas e de ensaios fisiológicos (Goodfellow *et al.*, 1992). Com o avanço das técnicas moleculares, procurou-se estabelecer a classificação do gênero com padrões genéticos. O sequenciamento da região 16S do rDNA é utilizado para a identificação do gênero *Streptomyces* sem maiores problemas (Ueda *et al.*, 1999), porém o uso destas sequências não discrimina muito bem as espécies relacionadas deste gênero (Barka *et al.*, 2016). Gao & Gupta (2012), listaram 3 CSI (*conserved signature signals*) e 19 CSP (*conserved signature proteins*) que servem como marcadores moleculares para a família *Streptomycetaceae* e para o gênero *Streptomyces*.

Quanto à morfologia, as actinobactérias são separadas de acordo com a presença ou ausência de substrato micelial e micélio aéreo, cor do micélio, produção de pigmentos melanóides e a estrutura e aparência dos esporos. Aminoácidos de parede, lipídios, proteínas, tipos de ácido murâmico e açúcares são as bases da identificação quimiotaxonômica (Chater *et al.*, 2010; Barka *et al.*, 2016).

A estrutura das cadeias de esporos é de extrema importância para a identificação dos micro-organismos do filo. Ainda hoje é uma categoria taxonômica utilizada na caracterização de um isolado e segundo o *International Streptomyces Project* (ISP, Shirling & Gottlieb, 1966) devem ser observados se as cadeias são retas ou torcidas; se há ganchos, laços ou espirais, ambos com uma ou duas voltas. A estrutura da superfície do esporo também é categorizada como suave, felpudo, espinhoso, verrugoso ou rugoso (Kämpfer, 2010).

3.2.2 PCR *fingerprinting*

Cada indivíduo possui uma sequência única de DNA que o caracteriza. A utilização desta informação deu origem a técnica de *fingerprinting* de DNA, onde

analisa-se os padrões presentes no genoma de cada indivíduo. O *fingerprinting* de DNA é significativamente facilitado quando o organismo em questão possui sequências repetitivas de DNA. O uso de *fingerprinting* de DNA é comum em genomas eucarióticos e geralmente inclui enzimas de restrição que flanqueiam as VNTR (*variable number tandem repeats*) e possibilitam a identificação do fragmento. Em procariotos, essas mesmas sequências VNTR já foram estudadas em *Bacillus anthracis* (Madigan *et al.*, 2010). Sequências repetidas dentro do genoma são chamadas de marcadores moleculares e técnicas que utilizam essas sequências são ferramentas promissoras para analisar relações genéticas. As técnicas mais comuns que utilizam sequências repetidas de DNA são RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (Martinville *et al.*, 1982) e RAPD (*random amplified polymorphism*) (Williams *et al.*, 1990); ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) (Hulton *et al.*, 1991); REP (*repetitive extragenic palindromic sequence*) (Stern *et al.*, 1984) e BOX (sequência repetitiva presente em *Streptococcus*) (Martin *et al.*, 1992) são técnicas de PCR *fingerprint* desenvolvidas para o *fingerprinting* de DNA procariótico e podem ser ambas denominadas de Rep-PCR (Michelim *et al.*, 2008).

3.2.2.1 BOX-PCR

Martin *et al.* (1992) relataram a existência de sequências de DNA altamente conservadas e que se repetiam ao longo do genoma de *Streptococcus pneumoniae*. Estas sequências, chamadas de elemento BOX, diferem daqueles elementos repetitivos já descritos, como o ERIC (Hulton *et al.*, 1991) e o REP (Stern *et al.*, 1984). O elemento BOX é composto por três subunidades, sendo elas: boxA, boxB e boxC, com 59, 45 e 50 nucleotídeos, respectivamente. A subunidade boxB é o elemento básico de onde a estrutura do BOX é organizada, podendo aparecer em *tandem*. O elemento BOX consenso é formado somente por uma unidade de cada uma das subunidades e forma uma sequência de 154 pb. A função do elemento BOX pode estar relacionada com a regulação da transcrição de genes que são coordenadamente controlados por um único promotor e ainda, alguns elementos BOX foram encontrados perto de genes de virulência. Isto se deve ao fato de que sequências repetidas dentro do elemento podem gerar um grampo no DNA ou uma alça no RNA transcrito, causando a modulação da transcrição naquela região do DNA.

Visando a identificação de isolados de actinobactérias, várias destas

técnicas de PCR *fingerprinting* são utilizadas. Lanoot *et al.* (2003), utilizaram a técnica de BOX-PCR para estudar a complexa nomenclatura dentro do gênero *Streptomyces*, onde há muitas sinonímias. Os padrões de amplificação obtidos geraram *fingerprints* de alta resolução que foram suficientes para identificação dos isolados a que eles se dispunham. BOX-PCR foi utilizado também por Passari *et al.* (2015), para identificar isolados de actinobactérias potencialmente endofíticos obtidos de tecidos de plantas.

3.2.2.2 URP-PCR

Segundo Kang *et al.* (2002), técnicas de PCR que utilizam *primers* arbitrários possuem baixa reprodutibilidade causando divergências nos padrões de amplificação utilizados para identificar os organismos. Por este motivo, estes autores desenvolveram doze *primers* a partir de uma sequência repetida denominada pKRD que faz parte do genoma do arroz. Os autores testaram a capacidade de amplificação destes *primers* em uma grande variedade de organismos, desde animais, plantas, fungos até bactérias, obtendo padrões distintos para cada espécie estudada. Atualmente, esta técnica é bastante utilizada para estudos de variabilidade genética em fungos. Mann *et al.* (2014) estudaram a diversidade de 60 isolados monospóricos de *Bipolaris sorokiniana*. Dubey *et al.* (2012) utilizaram estes *primers* na caracterização do fungo *Rhizoctonia solani*. Até o momento, nenhum estudo foi publicado utilizando os *primers* URP em isolados de actinobactérias.

3.3 Produção de compostos bioativos

Produtos naturais microbianos (NPs – *natural products*) são compostos produzidos por micro-organismos que desempenham um importante papel biológico e ainda hoje são uma das mais importantes fontes de diversidade química no que diz respeito a estruturas bioativas (Genilloud, 2014). Um dos NPs mais importante atualmente é aquele com atividade antimicrobiana, pois o uso de todas as classes de antibióticos e novos candidatos clínicos, análogos de antigas moléculas, é comprometido pela crescente resistência apresentada pelas bactérias (Kirst, 2013; Marinelli & Genilloud, 2013). A Organização Mundial da Saúde, em 2014, liberou um relatório onde diz que estamos atualmente na Era Pós-Antibiótica, onde alguns micro-organismos não possuem drogas capazes de controlá-los.

Produtos naturais podem ser derivados do metabolismo primário,

comuns a todos os sistemas biológicos, ou do metabolismo secundário, composto por moléculas de baixo peso molecular, química e taxonomicamente diversas e com função desconhecida (Bérdy, 2005). Actinobactérias filamentosas são produtoras de cerca de 39% dos metabólitos microbianos e o gênero *Streptomyces* produz aproximadamente 80% de todos os metabólitos. O peso molecular dos metabólitos microbianos varia entre 70Da do antifúngico acrilamidina, composto produzido por um isolado de *Streptomyces* (Yagishita *et al.*, 1968) e 12.524Da da proteína anti-HIV *actinohivin*, isolada de uma actinobactéria denominada *Longispora albida* (Chiba *et al.*, 2001). Actinobactérias geralmente possuem metabólitos com estruturas mais complexas que os compostos fúngicos, devido a diferenças na maquinaria de biossíntese desses dois organismos (Bérdy, 2012).

Vários antibióticos distintos, de diferença química, estrutural e sítio de alvo foram isolados de espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A natureza dessas substâncias depende da linhagem e do modo de cultivo do micro-organismo (Waskman *et al.*, 2010). Em cerca de sessenta anos (1940 a 2000), trinta e quatro antibióticos foram descobertos e utilizados na clínica médica. Destes, dezenove são oriundos de espécies do gênero *Streptomyces* (Procópio *et al.*, 2012)(Figura 1). Este gênero é responsável pela produção de cerca de 70% dos antibióticos hoje utilizados (Bérdy, 2005).

A produção de antibióticos inegavelmente gera um ganho na competição com outros micro-organismos em um ambiente natural, porém, como a produção acontece depois do crescimento, o antibiótico pode servir como proteção para a biomassa da colônia até o completo desenvolvimento do micélio aéreo. Há ainda a produção de antibióticos em alguns *Streptomyces* simbiotes de insetos e plantas, conferindo a estes, proteção a infecções. Também é sugerido que esses compostos com ação antibiótica possam agir como moléculas de sinalização, visto que modulam genes que não tem relação com a resposta ao estresse do ambiente (Chater *et al.*, 2010).

Apesar de não esclarecido, o benefício de se produzir um antibiótico no ambiente deve ser suficientemente grande, pois sua produção é bastante custosa, ocupando cerca de 4,5% do genoma de *S. coelicolor*, por exemplo (Kumbhar & Watve, 2013), O genoma de *S. coelicolor* possui 7825 genes e cerca de 20 agrupamentos gênicos correspondem a regiões codificadores de metabólitos

secundários (Bentley *et al.*, 2002).

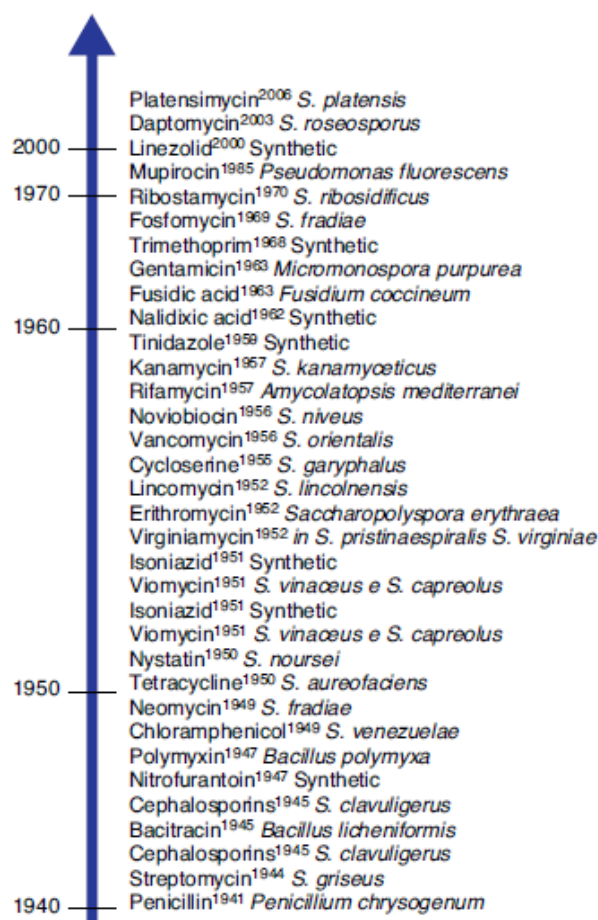


Figura 1: Figura retirada de Procópio *et al.* (2012) mostrando os antibióticos oriundos de estreptomicetos desde a Era dos Antibióticos.

3.3.1 Purificação

Desde o início da busca por moléculas com atividade antibiótica (Carter *et al.*, 1945) percebe-se uma dificuldade em padronizar métodos de purificação para este fim. Os compostos oriundos de *Streptomyces* são bastante variados, tornando o processo de obtenção do composto com atividade antimicrobiana é um grande desafio. A abordagem tradicional envolve o cultivo do micro-organismo produtor da substância de interesse em diferentes condições de crescimento, a extração dos metabólitos e a análise do extrato obtido a fim de se verificar a atividade biológica. Quando o extrato bioativo é identificado, análises mais detalhadas são realizadas e envolvem a separação dos constituintes do composto (Weber *et al.*, 2014).

A separação das moléculas biologicamente ativas geralmente se inicia pela extração com solventes orgânicos. A extração se baseia na diferença de

solubilidade para selecionar as moléculas presentes na solução. Usando o solvente adequado, a molécula em questão pode ser selecionada especificamente e extraída do extrato bruto bacteriano, pois os materiais inorgânicos, moléculas de baixo peso molecular ficarão na fase aquosa e moléculas orgânicas insolúveis em água tendem a permanecer na fase orgânica. (CHEM, 2013).

Com a amostra parcialmente purificada pelo solvente orgânico, as técnicas de cromatografia mais utilizadas são as baseadas em métodos de separação por características físico-químicas, como tamanho (gel filtração), carga elétrica (troca iônica) e solubilidade (camada delgada). A cromatografia pode ser realizada montando-se uma coluna cromatográfica, essa coluna é preenchida pela resina escolhida, que entrará em contato com a molécula que se quer purificar. Com o auxílio de um tampão eluente, os compostos presentes no extrato inicial vão sendo separados de acordo com as características da resina (Scott, 2003).

3.3.2 Colunas cromatográficas

O método mais utilizado para se obter o peso molecular de uma molécula é a cromatografia por exclusão de tamanho. Quando se busca obter um composto biológico em uma fase móvel aquosa pode-se chamar de cromatografia de gel filtração. Este tipo de cromatografia separa as moléculas constituintes do composto de interesse pelo tamanho que elas apresentam. A resina nesta cromatografia é formada por um gel de dextrano, responsável pela formação dos poros que irão separar as moléculas. O nome comercial deste gel de dextrano que é a base da resina é Sephadex. A fase móvel, necessária para eluir essas moléculas da resina, geralmente é a mesma utilizada para dissolver a resina. Nesta coluna, as moléculas maiores do composto de interesse não conseguem passar pelos poros existentes na resina e acabam sendo eluídas assim que o eluente é adicionado na coluna. As moléculas menores, capazes de penetrar e interagir com os poros, são eluídas em um maior tempo, pois necessitam percorrer o caminho entre os poros (Mori & Barth, 1999). Atualmente existem disponíveis no mercado seis tipos de Sephadex com tamanhos de poros diferentes: G-10 (separação de moléculas com peso molecular menor do que 700 Da, menor limite de exclusão), G-15, G-25, G-50, G-75, G-100 e G-200 (separação de grandes biomoléculas) (NCHU, 2014). A etapa de gel filtração geralmente é a primeira a ser realizada, pois além do tamanho, remove a grande parte dos produtos não desejáveis (Scott, 2003).

A cromatografia de troca iônica consiste em uma resina carregada positiva ou negativamente onde a molécula de interesse ficará aderida graças aos sítios eletricamente carregados presentes na superfície das moléculas. Normalmente, tampões de sais simples são suficientes para desestabilizar as ligações eletrostáticas e eluir as moléculas conforme sua aderência. São utilizadas diferentes concentrações de sal em um gradiente crescente. Moléculas fracamente aderidas são eluídas no início da aplicação da solução de sal e moléculas fortemente aderidas necessitam de concentrações mais altas. A matriz estacionária (resina) pode ser um polissacarídeo como celulose, dextrano ou agarose ou polímeros orgânicos sintéticos como poliacrilamida, polimetilmetacrilato e poliestireno e materiais inorgânicos como a sílica e hidroxiapatita. No mercado há diversas marcas e tipos de resinas de troca iônica, sendo as mais comumente utilizadas SP Sepharose (GE Healthcare), que é uma resina de agarose e a Toyopearl (Tosoh Bioscience), de polimetilmetacrilato. Ambas as resinas são utilizadas em protocolos de purificação de proteínas (Jungbauer & Hahn, 2009).

A cromatografia de camada delgada consiste em uma fase estacionária que não se apresenta em forma de resina e sim em uma fina camada, como uma folha. A separação das moléculas presentes na amostra acontece de acordo com a solubilidade na fase estacionária ou na fase móvel. O método é bastante utilizado para a análise visual das amostras. A vantagem desta técnica é a separação de várias amostras simultaneamente, visto que se pode aplicar vários compostos separadamente em uma única folha de cromatografia. A combinação mais comum de fase estacionária e móvel é a utilização de sílica gel e clorofórmio-metanol (Sherma, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta etapa do presente trabalho visa analisar geneticamente, através de técnicas moleculares, os isolados de actinobactérias presentes na bacterioteca do Laboratório Microbiologia Ambiental.

4.1 ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS

4.1.1 Recuperação dos isolados de actinobactérias

Os 88 isolados de actinobactérias pertencentes à bacterioteca do laboratório de Microbiologia Ambiental foram isolados de amostras oriundas de diferentes ambientes, em trabalhos prévios em nosso laboratório (Oliveira, 2003; Rodrigues, 2006; Oliveira, 2009; Duarte, 2012). Os isolados encontravam-se armazenados em glicerol 20% a -20°C . Para a recuperação destes retirou-se uma alíquota de $100\mu\text{L}$ de cada amostra e estas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5mL de caldo Amido Caseína (AC - amido 10,0g; caseína 0,3g; NaCl 2,0g; KNO_3 2,0g; K_2HPO_4 2,0g; MgSO_4 0,05g; FeSO_4 0,01g, CaCO_3 0,02g), permanecendo sob agitação de 100rpm a 28°C até se obter crescimento bacteriano. Após o crescimento em caldo, os isolados foram semeados, pela técnica de esgotamento, em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Amido Caseína-ACA (AC mais 15g ágar). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ até observação de crescimento. A fim de visualizar a pureza e a morfologia do isolado foi realizada a técnica de coloração de Gram. Os isolados devidamente recuperados (Tabela 1) foram armazenados em tubos de ensaio contendo ACA inclinado para utilização nos ensaios posteriores.

4.1.2 Armazenamento dos isolados recuperados

As bactérias recuperadas foram semeadas pelo método de espalhamento em superfície em placa de Petri contendo meio ACA, e incubadas em estufa bacteriológica a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após crescimento visível foram recortados cilindros de 7mm de diâmetro de meio de cultura com o crescimento microbiano e acondicionados em microtubos de 2mL contendo glicerol 20%.

Tabela 1: Relação dos isolados de actinobactérias recuperados para uso neste trabalho.

Referência	Origem	Isolados			
Oliveira, 2003	composteira	28	34	50	103
		107	8S	AP	
Rodrigues, 2006	composteira	1M5	4M2	8M2	10M2
		11M3	12M3	14M10	17M1
		18M9	19M1	21M5	29M10
		3D3	4D10	7D9	7D10
		9D2	14D8	20D10	20D7
		20D8	22D7	25D7	26D8
		30D10	30D7	32D6	35D6
		36D10	37D7		
Oliveira, 2009	tomateiro	R12(6)	R18(6)	R19(6)	R2(1)
		R21(1)	R24(6)	R27(6)	R28(6)
		R3(4)a	R3(4)c	2(1)	2(2)
		4(1)	4(4)	5(2)	5(3)
		6(2)	6(4)	8(4)	15(3)
		24(3)	27(3)	53(1)	55(1)
		1505(5)	BIO2	BIO3	R21(6)
Duarte, 2012	landfarming	1.10	1.13	1.14	1.18
		1.19	1.22	2.1	2.10
		2.13	2.4	2.5	2.8
		3.2	3.4	A31	A32
		A36	A310	A313	A319
		A320	A331	M54	

4.2 ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Todos os experimentos que seguem foram realizados utilizando-se como controle duas cepas de referência: *Streptomyces rimosus* 3082/CIFER-1836 e *Streptomyces rochei* ATCC 10739, oriundas da Coleção de Micro-organismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

4.2.1 Extração de DNA

Os isolados bacterianos foram inoculados em 25mL de caldo AC em frascos de Erlenmeyer de 125mL e incubados sob agitação de 100rpm a 28°C durante 48h. Para a obtenção das células a cultura foi centrifugada a 10.000rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 700µL de tampão SET (75mM NaCl, 25mM EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético pH8,0, 20mM Tris-HCL pH 7,5) onde foi adicionado 35µL de lisozima (20mg/mL). Após incubação em banho de água a 37°C por 1h foi adicionado SDS (*sodium dodecil sulfate*) 1% e 20µL de proteinase K (20mg/mL). A mistura foi incubada em banho de água a 55°C por 2h. Após este período, 1,25 M de NaCl foi adicionado e a amostra homogeneizada por inversão. As etapas de limpeza do DNA se seguiram com: uma lavagem com clorofórmio; uma com fenol; uma com fenol e clorofórmio (1:1 volume) e uma última de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 volume). Após, ao sobrenadante foi adicionado 600µL de álcool isopropílico, para a precipitação do DNA e a amostra incubada a -20°C por 18h. Posteriormente, a amostra foi centrifugada durante 5 min a 13.000rpm, o sobrenadante foi desprezado e ao DNA precipitado foi adicionado 500µL álcool etílico 70% gelado. Uma nova centrifugação a 13.000rpm por 10 minutos foi realizada e o álcool foi desprezado. Após totalmente seco, o DNA foi ressuspensado em 200µL de TE (5mM Tris, 0,5mM EDTA).

4.2.2 Concentração de DNA

A fim de se averiguar a concentração e a qualidade de DNA após o processo de extração, realizou-se a leitura no sistema NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para a leitura no espectrofotômetro foram utilizados 2µL da amostra que foram pipetados no equipamento que faz a leitura da concentração de DNA através do comprimento de onda de 260nm e avalia a qualidade da amostra no intervalo de comprimento de onda de 260/280nm, onde a leitura da amostra deve estar no intervalo entre 1,8 e 2,0 para ser considerada de ótima qualidade e altamente purificada.

4.2.3 Amplificação do DNA utilizando URP-PCR

A fim de se caracterizar os isolados de actinobactérias recuperados foi aplicada a técnica de URP-PCR para a qual foram utilizados os 12 *primers* descritos por Kang e colaboradores (2002) (Tabela 2). Para um volume final de 25µL de

reação foi adicionado 3,5mM de MgCl₂, 1U de Taq Polimerase, 2,0mM de cada dNTP, 10pmol de *primer*, 150ng de BSA (*bovine serum albumine*) e 50ng de DNA. As condições de amplificação utilizadas foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos seguida de 38 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 2 minutos (extensão), e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos resultantes das reações de PCR resultantes foram analisados em géis de agarose a 1,5% e fotografados no sistema de fotodocumentação L-PixTouch (Loccus Biotecnologia). Os fragmentos gerados foram organizados de tal forma que valores de peso molecular que diferiram entre si 30pb foram considerados iguais e valores maiores que 1499 pb foram ignorados.

Tabela 2: Relação dos *primers* URP utilizados.

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')
URP 1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC
URP 2F	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG
URP 2R	CCCAGCAACTGATCGCACAC
URP 4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC
URP 6R	GCAAGCTGGTGGGAGGTAC
URP 9F	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG
URP 13R	TACATCGCAAGTGACACAGG
URP 17R	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT
URP 25F	GATGTGTTCTTGGAGCCTGT
URP 30F	GGACAAGAAGAGGATGTGGA
URP 32F	TACACGTCTCGATCTACAGG
URP 38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC

4.2.4 Amplificação do DNA utilizando BOX-PCR

O *primer* BOX também foi utilizado buscando a caracterização dos isolados de actinobactérias. Para um volume final de 20µL por reação, foi adicionado 3,5mM de MgCl₂, 2,5U de Taq polimerase, 2,5mM de cada dNTP, 20pmol do *primer* BOX 1AR (5' - CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G - 3'), 150ng de BSA e 50ng de DNA. As condições de amplificação abrangeram: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C (desnaturação) por 30 segundos, 53°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 8 minutos (extensão), e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR resultantes foram

analisados em géis de agarose a 2,0% e fotografados no sistema de fotodocumentação L-PixTouch (Loccus Biotecnologia). Os fragmentos gerados foram organizados de tal forma que valores de peso molecular que diferiram entre si 30pb foram considerados iguais.

4.2.5 Análise dos padrões de amplificação

Para obter o agrupamento das amostras com base no padrão de fragmentos gerados em ambas as técnicas de PCR realizadas foi utilizado o programa CLIQS 1D Pro (TotalLab), onde se escolheu o Coeficiente de Correlação de Pearson como medida de similaridade e a matriz de dados foi gerada por análise *simple matching*.

4.2.6 Sequenciamento dos isolados

Para o sequenciamento foi realizada a amplificação do DNA utilizando-se os *primers*: pA (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') (Edwards *et al.*, 1989) e pF (5' – ACG AGC TGA CGA CAG CCA TG – 3') (desenhado pelo nosso grupo). Para um volume final de reação de 25µL foram adicionados 1,5mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerase (Platinum[®] Taq DNA Polymerase), 0,3mM de cada dNTP, 0,2µM de cada *primer* e 50 ng de DNA. As condições de amplificação utilizadas foram uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de 94°C (desnaturação) por 1 minuto, 59°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 2 minutos (extensão), e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o PureLink[®] Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). O seqüenciamento foi realizado na Empresa Ludwig Biotec. As sequências foram analisadas no programa Chromas (Technelysium) a fim de se verificar a qualidade do seqüenciamento. As sequências geradas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank* (NCBI, *National Library of Medicine*) utilizando o BLAST[®] (*Basic Local Alignment Search Tool*).

4.3 PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO

A etapa descrita a seguir no presente trabalho visa purificar um composto bioativo produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S.

4.3.1 Produção do extrato bruto com atividade antimicrobiana

O isolado *Streptomyces* 8S previamente estudado em nosso laboratório é conhecido por apresentar atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos, leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas (Salamoni *et al.*, 2010; Borba, 2013; Antunes *et al.*, 2014). Borba (2013) em seu estudo estabeleceu as melhores condições de cultivo deste isolado com o objetivo de otimizar a produção do(s) composto(s) bioativo(s). O isolado *Streptomyces* 8S foi inoculado no meio de cultura sacarose caseína (sacarose 10,0g; caseína 0,3g; NaCl 2,0g; KNO₃ 2,0g; K₂HPO₄ 2,0g; MgSO₄ 0,05g; FeSO₄ 0,01g, CaCO₃ 0,02g) tamponado em pH 8,0 com Solução Tampão de McIlvaine (0,2 M/mL Na₂HPO₄ e 0,1 M/mL C₆H₈O₇) e incubado sob agitação de 100 rpm a 28°C durante 72h. O cultivo de células foi centrifugado a 6000 rpm por 20 min para obtenção do extrato bruto livre de células.

4.3.2 Avaliação de estabilidade do composto frente à ação de EDTA

O ensaio foi realizado utilizando 1mL do extrato bruto (4.3.1) acrescido da concentração escolhida de EDTA. As concentrações utilizadas foram de 100mM, 1mM, 500µM e 100µM. Os tubos com o extrato bruto e o EDTA foram incubados em temperatura ambiente durante 1h e após este período o composto foi testado (4.3.10).

4.3.3 Avaliação de estabilidade do composto frente a enzimas proteolíticas

A avaliação da estabilidade do composto antimicrobiano perante diferentes enzimas proteolíticas foi realizada utilizando 1mL do extrato bruto (4.3.1) acrescido da enzima proteolítica. As enzimas utilizadas foram a papaína, pepsina, tripsina, proteinase K e lisozima, todas na concentração final de 2 mg/mL. Os tubos com o extrato bruto e as enzimas foram incubados em banho de água a 37°C durante 1h e após o composto foi testado (4.3.10).

4.3.4 Avaliação de estabilidade do composto frente a diferentes temperaturas de incubação

A avaliação da estabilidade do composto antimicrobiano perante diferentes temperaturas foi realizada utilizando o extrato bruto livre de células (4.3.1). Um mL deste extrato foi incubado em banho de água em diferentes temperaturas e tempos. As temperaturas testadas foram 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C. Todos os ensaios tiveram tempos de incubação de 15 e 30 minutos em banho de água. Após o tratamento, o extrato bruto foi testado quanto a sua atividade antimicrobiana (4.3.10).

4.3.5 Avaliação de estabilidade frente o cultivo em frascos de diferentes tamanhos

A avaliação da estabilidade do composto antimicrobiano perante frascos de diferentes tamanhos foi realizada utilizando meio de cultura SC em diferentes frascos Erlenmeyer. Foram testados frascos de 1000 mL, 500 mL e 250 mL, respeitando sempre a proporção de 20% de meio de cultura no volume total do frasco. Após o inóculo do *Streptomyces* 8S, o cultivo foi de 72h e a temperatura de incubação de 28°C. Após, foi obtido o extrato bruto livre de células (4.2.1) e o composto presente testado (4.3.10).

4.3.6 Extração líquido-líquido

Para obtenção do extrato bruto com o composto bioativo de interesse foi realizada uma etapa de extração do composto com atividade biológica utilizando-se solventes orgânicos. Os solventes orgânicos testados foram: ácido acético, butanol, hexano, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio. Realizou-se três lavagens em funil de decantação com o solvente orgânico escolhido 1:1 extrato bruto, dando origem às frações aquosa (FA) e orgânica (FO). A FO foi concentrada em um evaporador rotativo com velocidade de 100 m/s a 40°C, até a FO atingir a consistência de pó, e posteriormente foi ressuspensa com água destilada esterilizada. A FA foi concentrada pelo processo de liofilização até atingir metade do volume inicial. Ambas as fases foram armazenadas a -20°C para uso posterior.

4.3.7 Colunas cromatográficas

Buscando-se a obtenção do composto bioativo oriundo da fase aquosa descrita acima, foram preparadas três colunas cromatográficas com diferentes resinas a fim de se isolar o composto com atividade antimicrobiana. Foram utilizadas as resinas Sephadex G-75 (gel-filtração), SP-Sepharose (catiônica) e DEAE-celulose (aniônica). Uma fração de 2mL da FA foi pipetada na coluna com Sephadex G-75, o tampão de eluição escolhido para esta etapa foi o tampão fosfato salino (PBS – *phosphate buffered saline*). Quinze frações de 1mL foram eluídas nesta coluna. Estas frações foram liofilizadas e ressuspendidas em 200µL de água destilada estéril. Destas frações era realizado um pool com aquelas que continham atividade antimicrobiana (4.3.10). Este pool, totalizando 2,5 mL, era colocado em uma coluna de SP-Sepharose, onde 50 frações eram coletadas com um gradiente de NaCl, sendo as 10 primeiras eluídas com PBS, 10 seguintes com 0,2M NaCl e assim por diante com 0,4M NaCl, 0,6M NaCl e 0,8M NaCl. Estas 50 frações foram novamente liofilizadas e a fração com atividade antimicrobiana eluída em uma coluna de DEAE-Celulose, novamente com um gradiente de NaCl que variou de 0 a 1M (0 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1M), 0 a 1,5M (0 – 0,5 – 0,75 – 1 – 1,5M) e 0 a 2,5M (0 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5M).

4.3.8 SDS-PAGE

A fração 5 eluída da SP-Sepharose foi analisada em um gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE-SDS). A fração foi suspensa em tampão SDS Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% e bromofenol azul 0,05%) e fervida por 5 minutos. A análise foi realizada em um gel com 12% de acrilamida e com tampão Tris-HCl 375 mM pH 8,9. As condições da corrida foram de 150V por 90 minutos. A coloração foi realizada com Coomassie Brilliant Blue R-25D e descorado com uma solução de 10% ácido acético, 15% metanol e 10% glicerol por 24h.

4.3.9 *High performance liquid chromatography* (HPLC)

A fim de verificar o composto presente na FO, foi utilizado o equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu LC-20A. A coluna cromatográfica utilizada foi a C18, o volume de injeção escolhido foi de 20µL da FO com fluxo de 0,6 mL/min. A corrida teve 30 minutos de duração e adicionou-se um

gradiente contínuo de 40% de acetonitrila para mudança de polaridade e liberação dos compostos presentes na FO. A observação dos picos se deu em 230 nm.

4.3.10 Método de difusão em poço

Para este ensaio foram selecionadas bactérias Gram-positivas dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* multirresistentes a uma série de antibióticos (Antunes *et al.*, 2014). As amostras foram cedidas pelo Professor Dr. Pedro d'Azevedo da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e pela Dr. Ana Lucia Antunes da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os micro-organismos são oriundos de amostras clínicas, sendo um *S. aureus*, dois *S. epidermidis*, dois *E. faecalis* e dois *E. faecium*.

O ensaio de difusão em poço consistiu na semeadura de uma cultura de bactéria-teste na concentração de 10^8 células/mL (0,5 da escala McFarland) utilizando um suabe impregnado sobre uma placa contendo 20 mL de Agar Triptona de Soja (TSA – *tryptone soy agar*). Após a semeadura, foram realizados poços de aproximadamente 7 mm de diâmetro distribuídos equidistantes na placa. Em cada poço foram aplicados 100 μ L da amostra de interesse. A placa permaneceu por até 24h a 4°C para a difusão do extrato bruto no meio de cultivo e posteriormente foi incubado a 37°C por 24h. A atividade quantitativa do composto antimicrobiano foi determinada através da medição dos halos de inibição. A atividade residual (A.R.) do composto bioativo foi calculada com a equação $A.R.(%) = (Hr - 8 / Hc - 8) \times 100$, sendo Hr o diâmetro do halo do extrato bruto após o tratamento e Hc o diâmetro do halo do extrato bruto antes do tratamento (controle positivo).

5. RESULTADOS

5.1 ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Dos 473 isolados obtidos nos estudos anteriores, foi possível a recuperação de 88 amostras de actinobactérias. Dois isolados (A32 e A320) não cresceram mais após alguns repiques e foram excluídos somente das amplificações do BOX-PCR.

O protocolo de extração permitiu obter uma alta concentração de DNA de boa qualidade. Assim foi possível realizar todos os ensaios com o DNA obtido a partir de uma única extração.

5.1.1 Amplificações utilizando BOX-PCR

A partir da utilização da técnica de BOX-PCR observou-se que 85 isolados recuperados apresentaram algum padrão de amplificação frente ao *primer* testado. A amostra 3.4 (Tabela 1), oriunda de um processo de landfarming, foi a única que não amplificou com o uso deste *primer*. As amplificações geraram 974 fragmentos com pesos moleculares entre 2898pb e 91pb. O gel de agarose utilizado para visualização destas amplificações não permite distinguir fragmentos com baixa diferença de peso molecular, por este motivo optou-se por agrupar aqueles fragmentos que diferiam entre si em 30pb, o que possibilitou uma melhor visualização dos padrões obtidos. Desta forma, foram obtidos 73 fragmentos distintos, sendo que 23% encontram-se acima de 2000pb, 39% entre 2000pb e 1000pb, 21% entre 999pb e 500pb e 18% abaixo de 500pb. Um fragmento de 210pb repetiu-se em 45% dos isolados. Os fragmentos seguintes são únicos dos respectivos isolados: 2898pb, 2743pb, 1938pb para os isolados 1.14, 2(1) e 22D7 respectivamente. Os fragmentos 2718pb e 2524pb são únicos do isolado 2.13. Alguns dos padrões de amplificação gerados podem ser observados nas Figuras 2 e 3.

A partir dos padrões de amplificação obtidos foi gerado um dendrograma no qual 12 agrupamentos distintos foram formados (Figura 4) com o algoritmo UPGMA e coeficiente de distância de 40%.

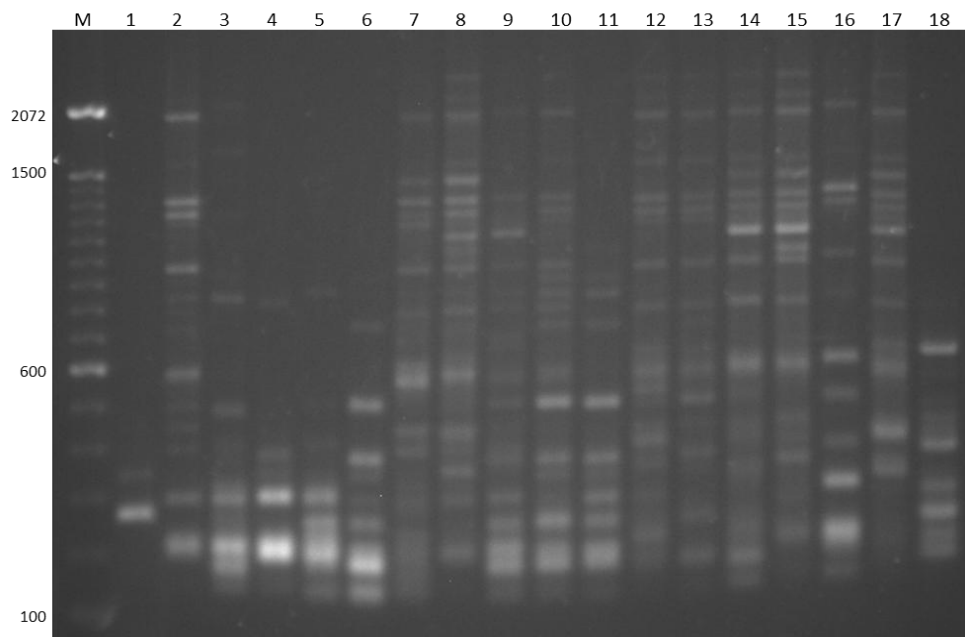


Figura 2: Gel de agarose 2%, corado com GelRed, apresentando os padrões de amplificação de alguns isolados de actinobactérias gerados com a técnica de BOX-PCR. M: Marcador 100pb, 1 - controle negativo, 2 - 25D7, 3 - 32D6, 4 - 8S, 5 - 50, 6 - A313, 7 - 26D8, 8 - A310, 9 - 20D7, 10 - 1.10, 11 - 1.13, 12 - 1.22, 13 - 2.1, 14 - R18(6), 15 - R21(1), 16 - 29M10, 17 - 53(1), 18 - *S. rochei* ATCC 10739.

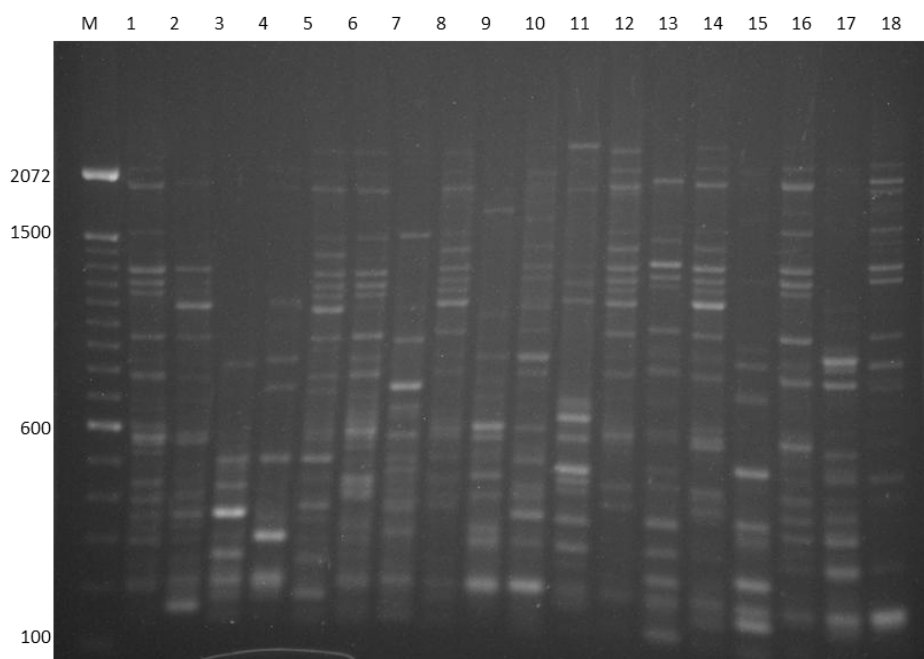


Figura 3: Gel de agarose 2%, corado com GelRed, apresentando os padrões de amplificação de alguns isolados de actinobactérias gerados com a técnica de BOX-PCR. M: Marcador 100pb, 1 - A319, 2 - 107, 3 - 4M2, 4 - 20D10, 5 - R3(4)a, 6 - 2(2), 7 - 15(3), 8 - 24(3), 9 - 1505(5) 10 - A31, 11 - 28, 12 - 34, 13 - 10M2, 14 - 21M5, 15 - 1.18, 16 - 1.19, 17 - 2.8, 18 - R12(6).

Comparando estes grupos observamos que o agrupamento nove foi o maior deles, composto por 13 isolados.

Estes 13 isolados estão agrupados em cinco subgrupos com diferentes índices de similaridade. Dentro destes subgrupos é importante destacar que os isolados 50 e 32D6 apresentaram um índice de similaridade de 96%. O agrupamento dois compreende 10 isolados que formam dois subgrupos e no primeiro subgrupo destaca-se o alto índice de similaridade dos isolados 2.4 e 2.13 (97%) e dos isolados R3(4)c e R2(1) (98%). O agrupamento 10 apresentou 9 isolados subdivididos em três grupos menores e os agrupamentos três e um, oito isolados cada. O agrupamento seis possui sete isolados em dois subgrupos, sendo que os isolados 34 e 24(3) presentes no agrupamento apresentaram 97% de similaridade. O agrupamento cinco possui seis isolados e dentro deste agrupamento o isolado A31 ficou separado dos demais. O agrupamento oito contém quatro isolados e os agrupamentos 12, 11, 7 e 4 possuem somente dois isolados cada. Há 13 isolados que não se agruparam com nenhum outro isolado no coeficiente de similaridade (60%) determinado.

Dentro desses agrupamentos foram escolhidos, de forma aleatória, porém buscando pelo menos um isolado por agrupamento, isolados para sequenciamento do 16S rDNA.

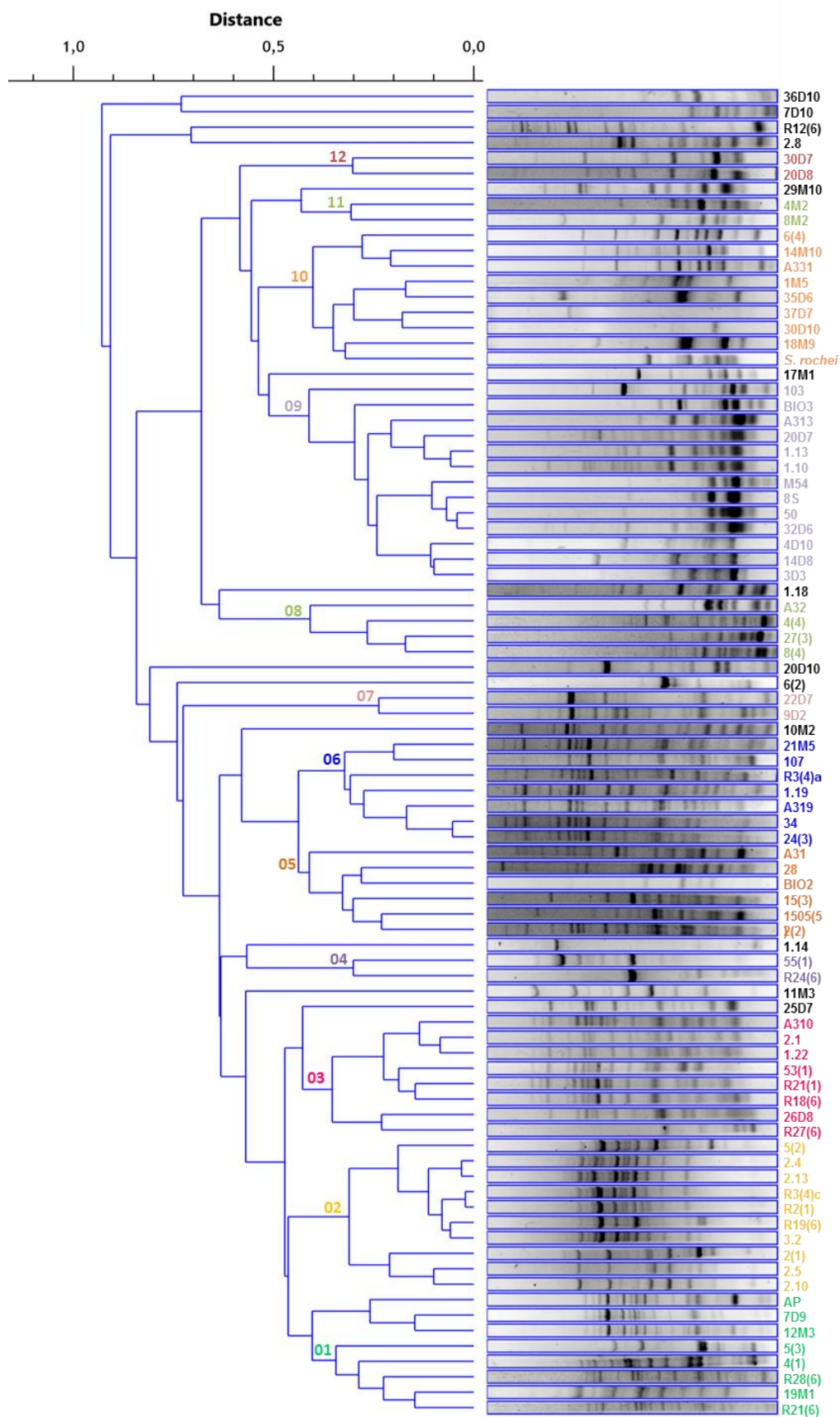


Figura 4: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no BOX-PCR (UPGMA – Correlação de Pearson)

5.1.2 Amplificações utilizando os *primers* URP-PCR

Dos doze *primers* para URP-PCR (Tabela 2), nove foram utilizados para amplificação do DNA dos isolados de actinobactérias. A escolha destes nove *primers* (1F, 2F, 2R, 9F, 13R, 17R, 25F, 32F, 38F) foi baseada em um ensaio preliminar que se realizou com 6 isolados: 21M5, 17M9, 10M2, 30D7, 37D7 e 6(4). Os *primers* 4R, 6R e 30F não amplificaram nenhum dos isolados acima descritos e assim foram excluídos dos ensaios posteriores. Os *primers* 17R e 9F apresentaram a maior abrangência de amplificação, pois amplificaram 98,9% das amostras. Os *primers* 17R e 9F não amplificaram os isolados R19(6) e 30D10, respectivamente. Os *primers* 25F e 38F amplificaram 95,5% dos isolados. O *primer* 2F foi capaz de amplificar 90% dos isolados e o *primer* 2R, 93,2%. Os *primers* 1F, 32F e 13R se mostraram pouco eficientes, amplificando, respectivamente, 67,8%, 73% e 80,9% dos isolados.

O *primer* 38F gerou o maior número de fragmentos, um total de 399, seguido do 25F com 352 fragmentos. Os *primers* 17R, 13R, 2R, 2F, 9F e 1F apresentaram, respectivamente, 296, 292, 283, 232, 224 e 218 fragmentos. Já o *primer* 32F gerou 179 fragmentos. Maiores detalhes dos fragmentos obtidos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Análise geral dos fragmentos gerados das amplificações com a técnica URP-PCR.

<i>Primer</i>	Número de agrupamentos	Número total	Maior (pb)	Menor (pb)	1500pb a 1000pb (%)	999pb a 500pb (%)	Abaixo de 499pb (%)
1F	12	32	1487	100	21	44	35
2F	10	25	1161	113	8	44	48
2R	16	30	1253	73	14	43	43
9F	12	28	1400	108	14	43	43
13R	9	30	1475	72	27	33	40
17R	9	31	1480	77	19	39	42
25F	11	37	1459	106	32	41	27
32F	5	28	1469	238	25	46	29
38F	13	39	1482	103	33	36	31

O fragmento de 310pb aparece em 7,80% dos isolados quando utilizado o *primer* 1F, sendo este o fragmento prevalente. Os fragmentos de 100pb, 1487pb, 1449pb, 1354pb e 1248pb aparecem em somente um isolado cada, sendo eles,

respectivamente: R28(6), 37D7, 34, 8M2 e 9D2. Nos fragmentos gerados pelo *primer* 2F pode-se observar que os fragmentos de 348pb, 183pb e 146pb possuem prevalência de 21,84% entre os isolados. Com o uso do *primer* 2R, um fragmento de 323pb aparece em 30,37% dos isolados. O *primer* 9F gerou um fragmento de 226pb em 28,40% dos isolados. Somente com o *primer* 9F nenhum fragmento com peso molecular acima de 1499pb foi gerado. O fragmento de 206pb aparece em 30,5% dos isolados amplificados com o *primer* 13R. O único fragmento que não se repete entre os isolados é o de 1176pb no isolado AP. Com o *primer* 17R observou-se a prevalência do fragmento de 271pb em 27,27% dos isolados. O maior fragmento amplificado foi o de 1480pb, único do isolado 24(3). Os fragmentos de 1019pb e 976pb são únicos dos isolados 28 e 10M2, respectivamente. O fragmento de 408pb é prevalente em 27,90% dos isolados amplificados com o *primer* 25F e os fragmentos de 1459pb e 1232pb são exclusivos dos isolados A310 e 11M3. Com as ampliações realizadas com o *primer* 32F foi possível observar que o fragmento 314pb aparece em 26,23% dos isolados e há 4 fragmentos que só apareceram uma vez: 1362pb, 1282pb, 1134pb e 955pb são encontrados nos isolados 2.4, 30D10, 15(3), 1505(5), respectivamente. Com o *primer* 38F foram obtidos dois fragmentos, um de 159pb e outro de 103pb que são únicos dos isolados 35D6 e R27(6), respectivamente. Estes fragmentos foram os menores fragmentos observados na amplificação com este *primer*. A diversidade dos fragmentos encontrados pode ser visualizada na figura 5.

Os agrupamentos obtidos a partir de cada dendrograma podem ser visualizados nas figuras 6 a 14. Neste trabalho levaram-se em consideração os agrupamentos que possuem até 60% de similaridade. O dendrograma gerado com o *primer* 2R (Figura 8) apresentou o maior número de agrupamentos, totalizando 16 grupos. O grupo 13 contém 10 isolados, sendo este o mais numeroso. O grupo 12 possui um subgrupo com os isolados R21(1) e 2.1 apresentando 99% de similaridade. Um alto índice de similaridade também foi observado no grupo 8, onde os isolados 36D10 e 17M1 possuem 97% de similaridade.

O *primer* 38F (Figura 14) apresentou 13 agrupamentos, com o grupo 1 formando por 24 isolados. Este grupo possui três subgrupos menores e dentro destes os isolados 107 e 28 apresentam 97% de similaridade entre si.

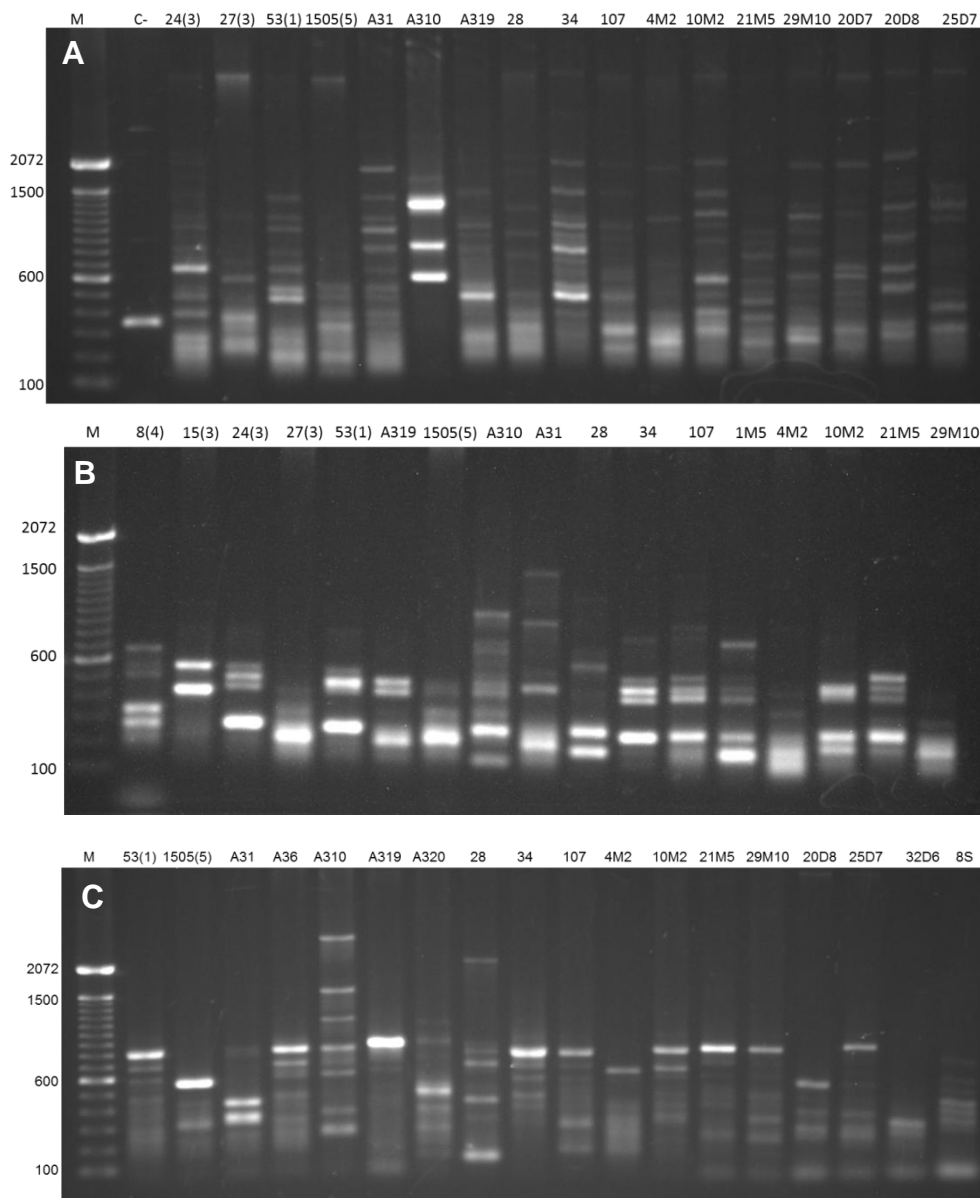


Figura 5: Padrões de amplificação obtidos na técnica de URP-PCR, gel de agarose 1,5% corado com GelRed. A: *primer* 38F. B: *primer* 9F. C: *primer* 2R.

Os *primers* 1F e 9F (Figuras 6 e 9, respectivamente) apresentaram 12 agrupamentos. O dendrograma realizado com o perfil de amplificação formado pelo *primer* 1F mostra o grupo 1 com 8 isolados sendo o maior agrupamento. No entanto, dentre os 12 agrupamentos existentes no dendrograma (*primer* 1F), destacam-se 4 isolados com alto índice de similaridade presentes no grupo 2: *S. rochei* ATCC 10739 e A313 com 97% de similaridade, da mesma forma que os isolados 30D10 e 14D8. Com o *primer* 9F obteve-se os maiores índices de similaridade para o maior número de isolados (Tabela 4).

Tabela 4: Agrupamentos e isolados que apresentaram altos índices de similaridade quando amplificados com o *primer* 9F.

Grupo	Isolados	I.S. (%)
3	A331 e A320	98
	5(2) e 53(1)	98
	2(2) e R21(6)	96
4	27(3) e 1505(5)	99
	5(3) e A31	96
	A31 e 2.8	96
5	M54 e 6(4)	98
6	2.5 e 2.10	96
8	1.13 e 1.18	99
	1.18 e 1.10	98
	<i>S. rochei</i> e A313	98
12	R27(6) e 3.4	97

I.S.= índice de similaridade.

O *primer* 25F apresentou 11 agrupamentos e o número 6 contém 27 isolados, presente neste grupo os isolados 36D10 e 8(4); 22D7 e 4(4) apresentam 96% de similaridade. No grupo 9, os isolados 17M1 e 14M10 também possuem 96% de similaridade.

O dendrograma do *primer* 2F apresenta 10 agrupamentos e o grupo 8 possui 27 isolados. Dentro deste agrupamento há três duplas de isolados com 98% de similaridade entre eles (3.2 e 3.4, A331 e 6(4), 12M3 e 103) e duas duplas com 96% de similaridade (R27(6) e R2(1), 5(2) e A32).

Os *primers* 13R e 17R (Figuras 10 e 11, respectivamente) apresentaram 9 agrupamentos, sendo o grupo 5 e o grupo 7 respectivamente os mais numerosos com 28 isolados. No dendrograma construído a partir do 13R os isolados A331 e A320, 6(4) e BIO3 apresentaram 98%. Nos agrupamentos com o *primer* 17R pode-se observar alto índice de similaridade entre vários isolados: no agrupamento 9, os isolados 7D10 e 14M10 possuem 98%, da mesma forma que os isolados 17M1 e BIO3, bem como A320 e A331. No grupo 7 os isolados 14D8 e 30D10 possuem 97% de similaridade e os isolados 1.10 e 1.18, 96%, como os isolados 1.19 e R21(6), 29M10 e 3D3 (grupo 5) estão com 96% de similaridade.

O *primer* 32F, por fim, apresentou apenas 5 agrupamentos e muitos isolados ficaram mais distantes uns dos outros do que o valor estipulado de 40% deixando 16 amostras sem correspondência. Os isolados que apresentaram altos índices de similaridade com este *primer* podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5: Agrupamentos e isolados que apresentaram altos índices de similaridade quando amplificados com o *primer* 32F.

Grupo	Isolados	I.S. (%)
3	A31 e 27(3)	99
	8(4) e 4(4)	99
	8(4) e R3(4)a	99
	32D6 e 20D7	98
	37D7 e 107	97
	18M9 e 1.18	97
5	A331 e A320	96

Os isolados foram escolhidos para o sequenciamento com base nos agrupamentos formados pelo *primer* BOX1AR. Porém, os agrupamentos gerados no URP-PCR foram comparados com os agrupamentos do BOX-PCR e isolados foram adicionados para sequenciamento, de maneira que todos os agrupamentos formados das análises moleculares tivessem pelo menos um isolado sequenciado (Tabela 6).

Tabela 6: Isolados escolhidos para sequenciamento do 16S rDNA.

Isolados					
34	11M3	26D8	R2(1)	55(1)	2.5
50	14M10	30D10	R27(6)	1505(5)	2.8
103	7D9	30D7	2(1)	R21(6)	3.2
107	7D10	32D6	5(3)	1.10	A31
8S	9D2	37D7	6(2)	1.14	A310
1M5	14D8	R12(6)	6(4)	1.19	A313
4M2	20D8	R18(6)	27(3)	2.13	A331

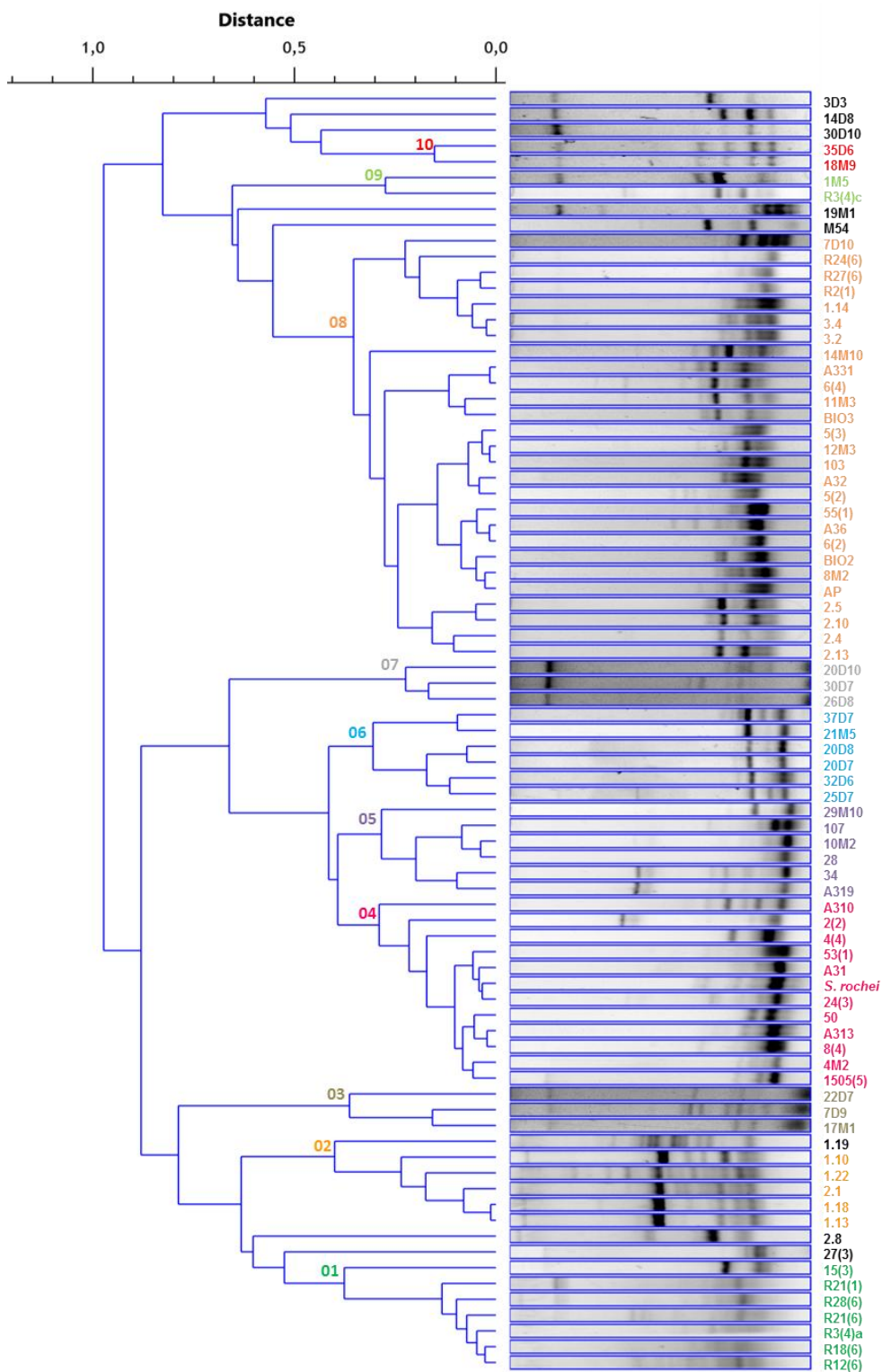


Figura 6: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 1F (UPGMA – Correlação de Pearson).

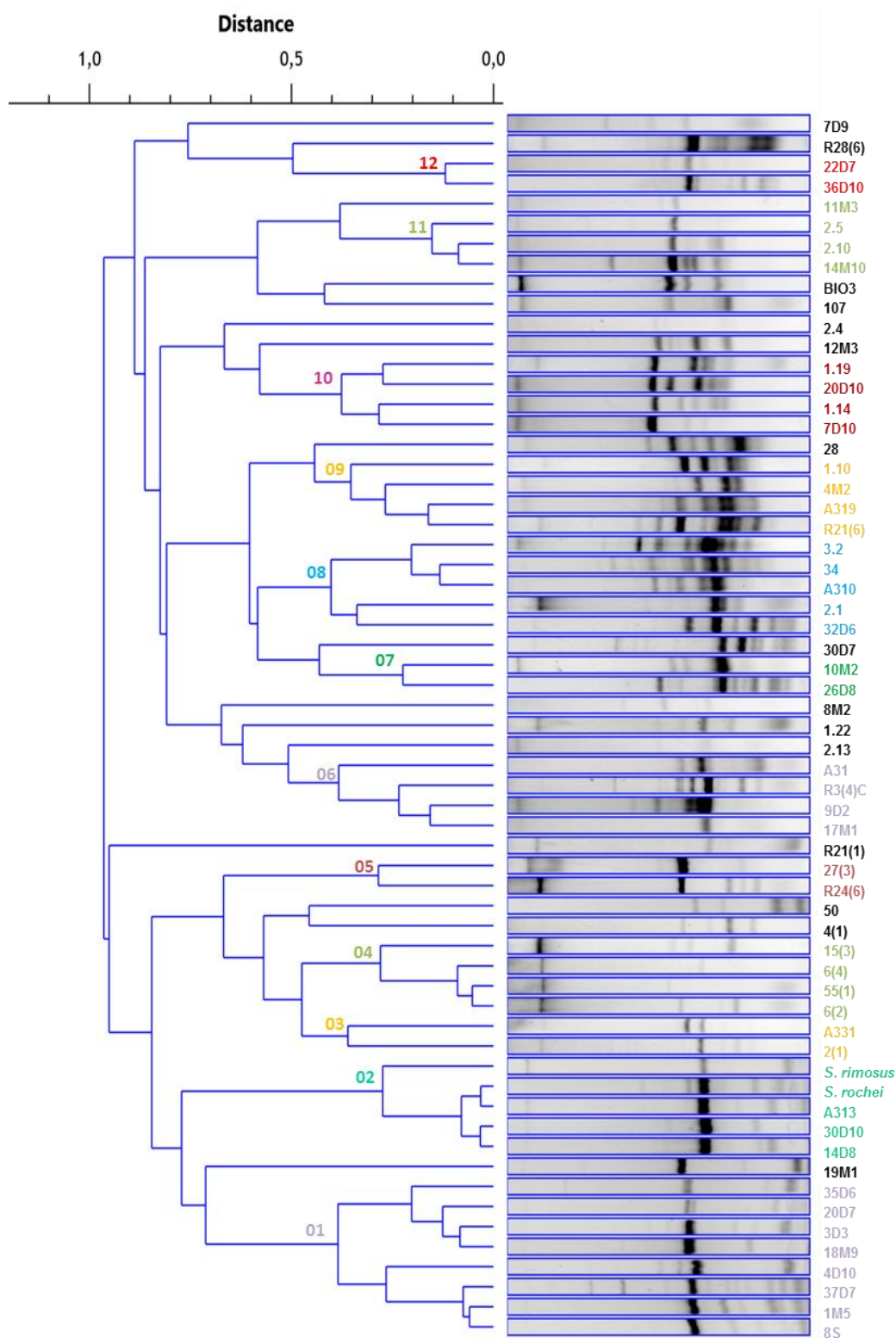


Figura 7: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 2F (UPGMA – Correlação de Pearson).

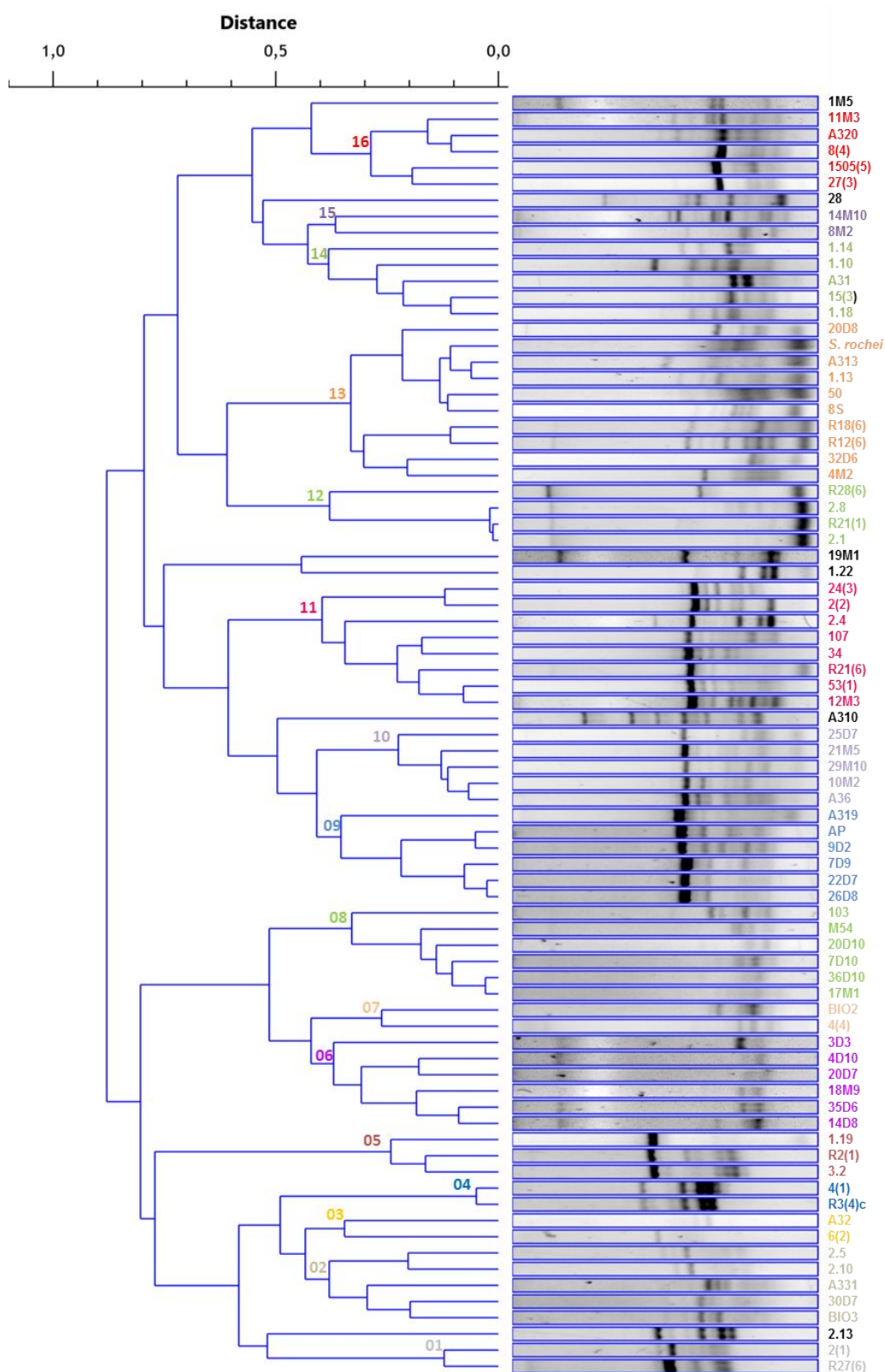


Figura 8: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 2R (UPGMA – Correlação de Pearson).

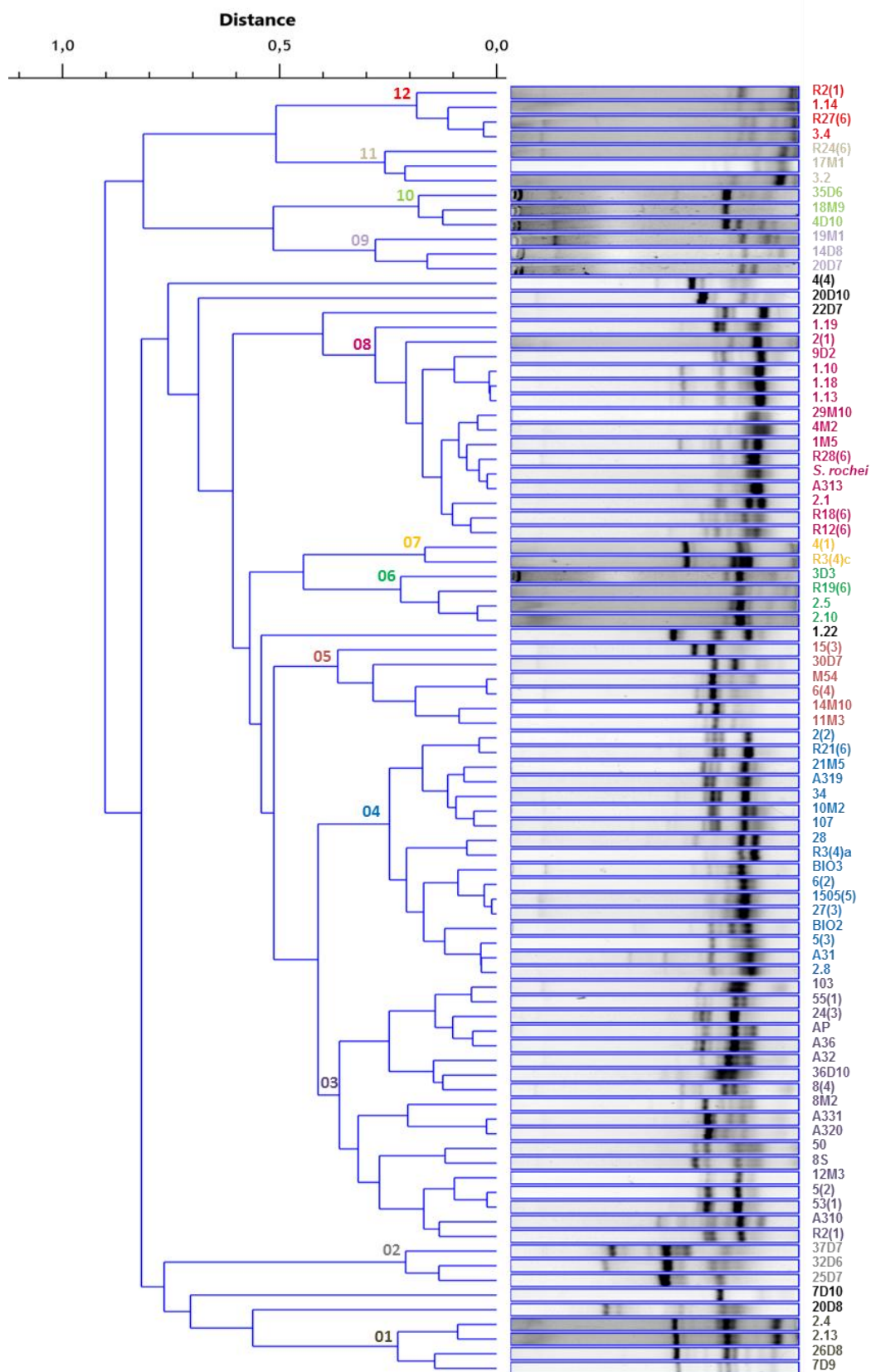


Figura 9: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 9F (UPGMA – Correlação de Pearson).

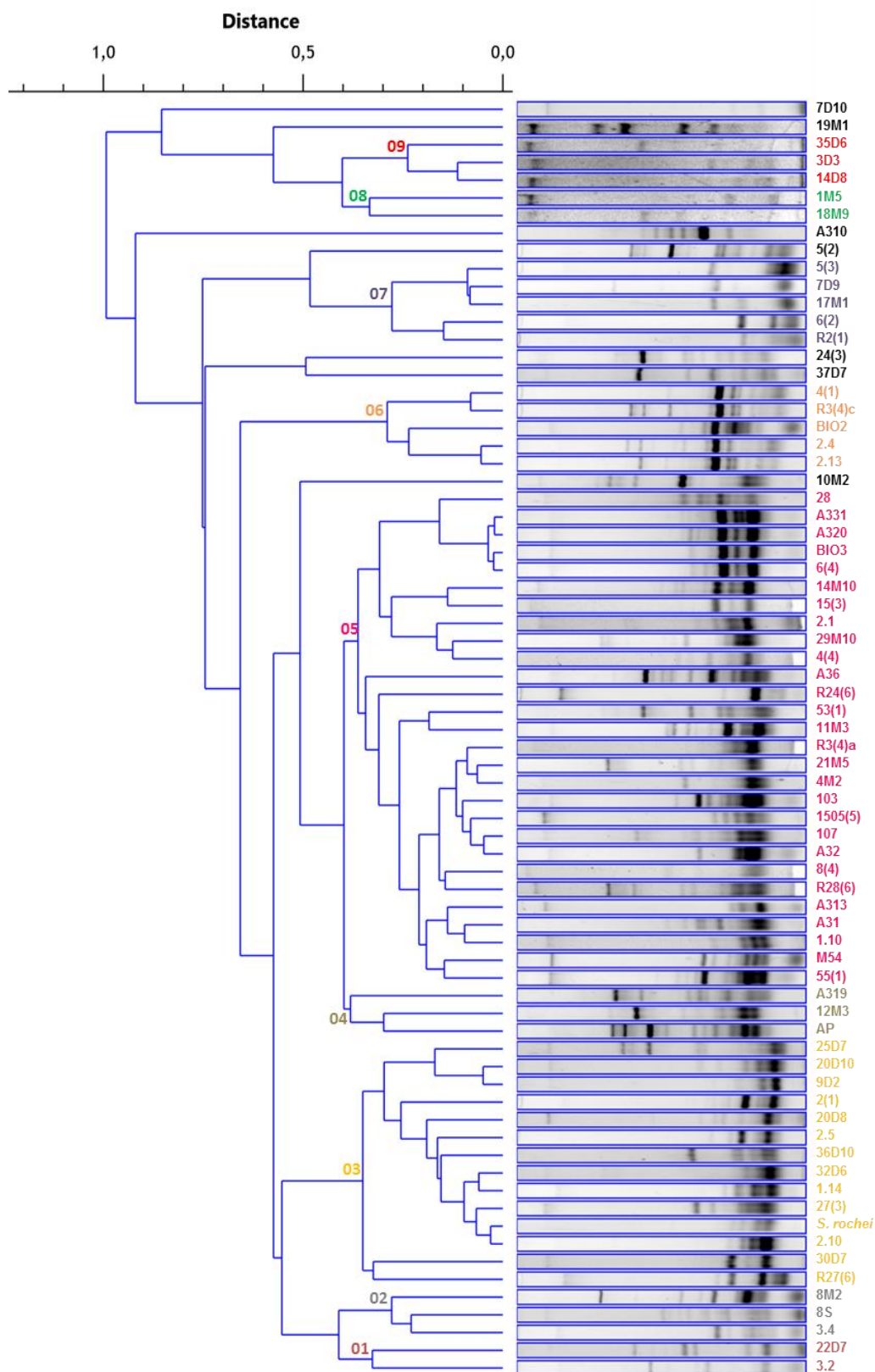


Figura 10: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 13R (UPGMA – Correlação de Pearson).

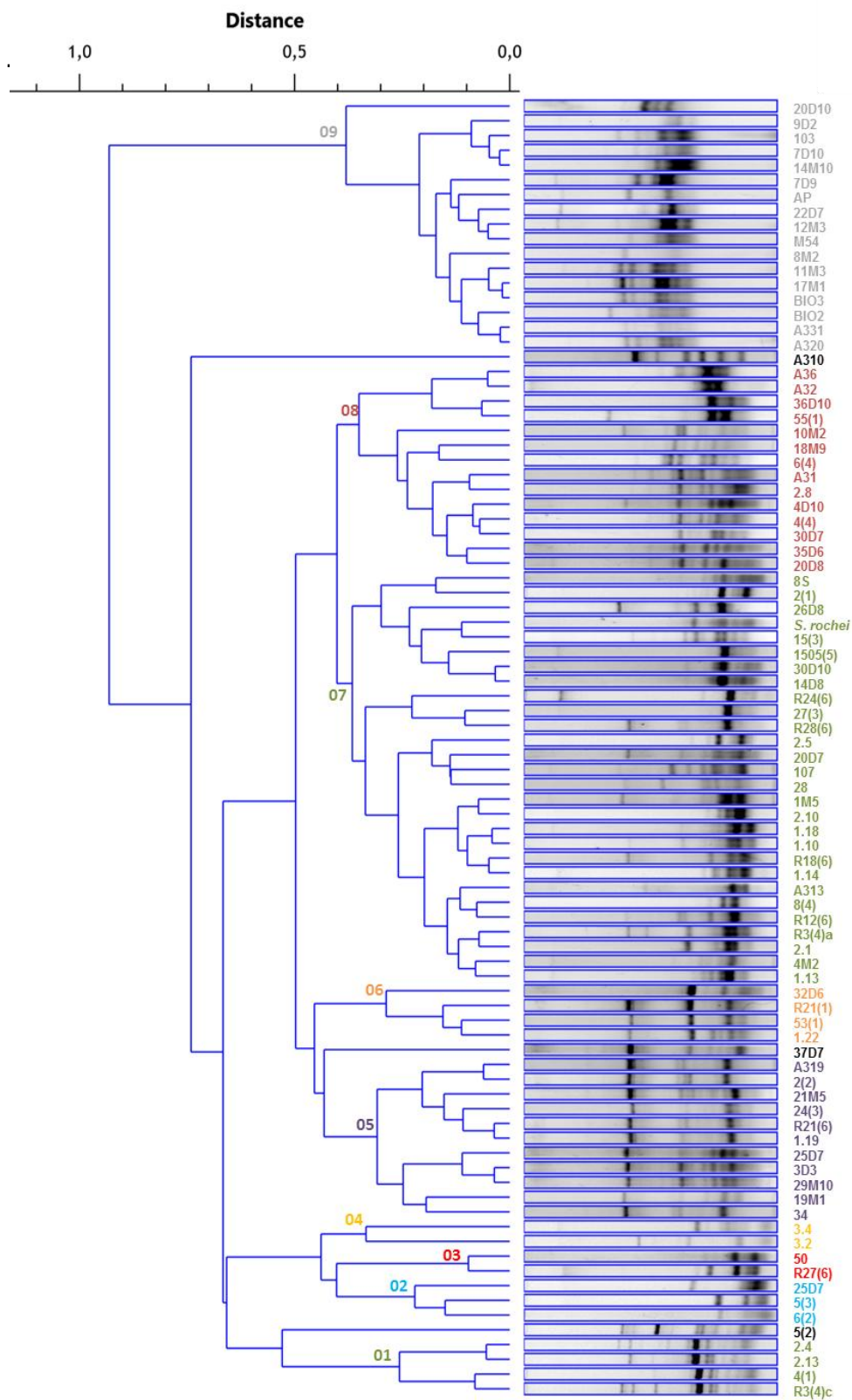


Figura 11: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 17R (UPGMA – Correlação de Pearson).

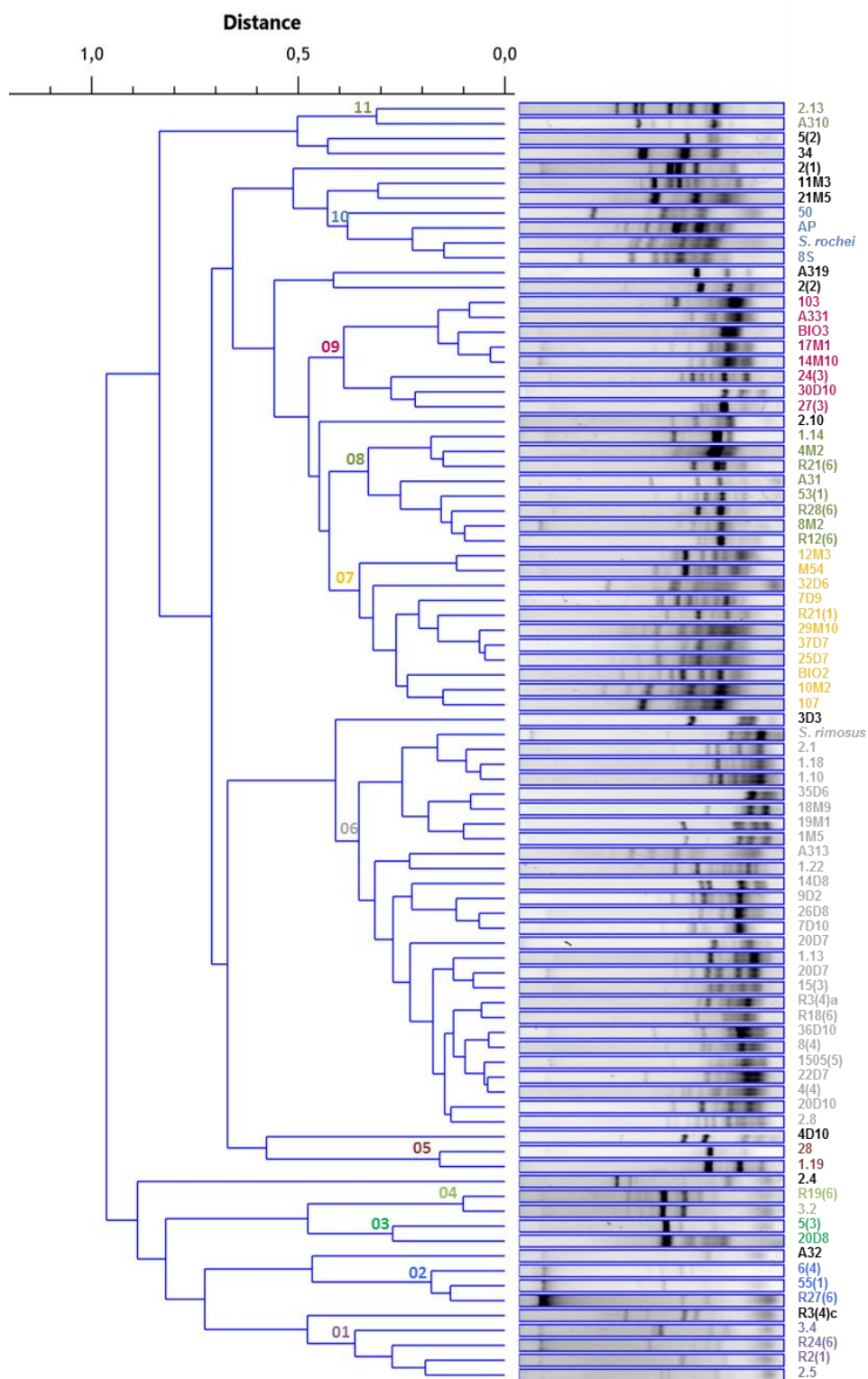


Figura 12: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 25F (UPGMA – Correlação de Pearson).

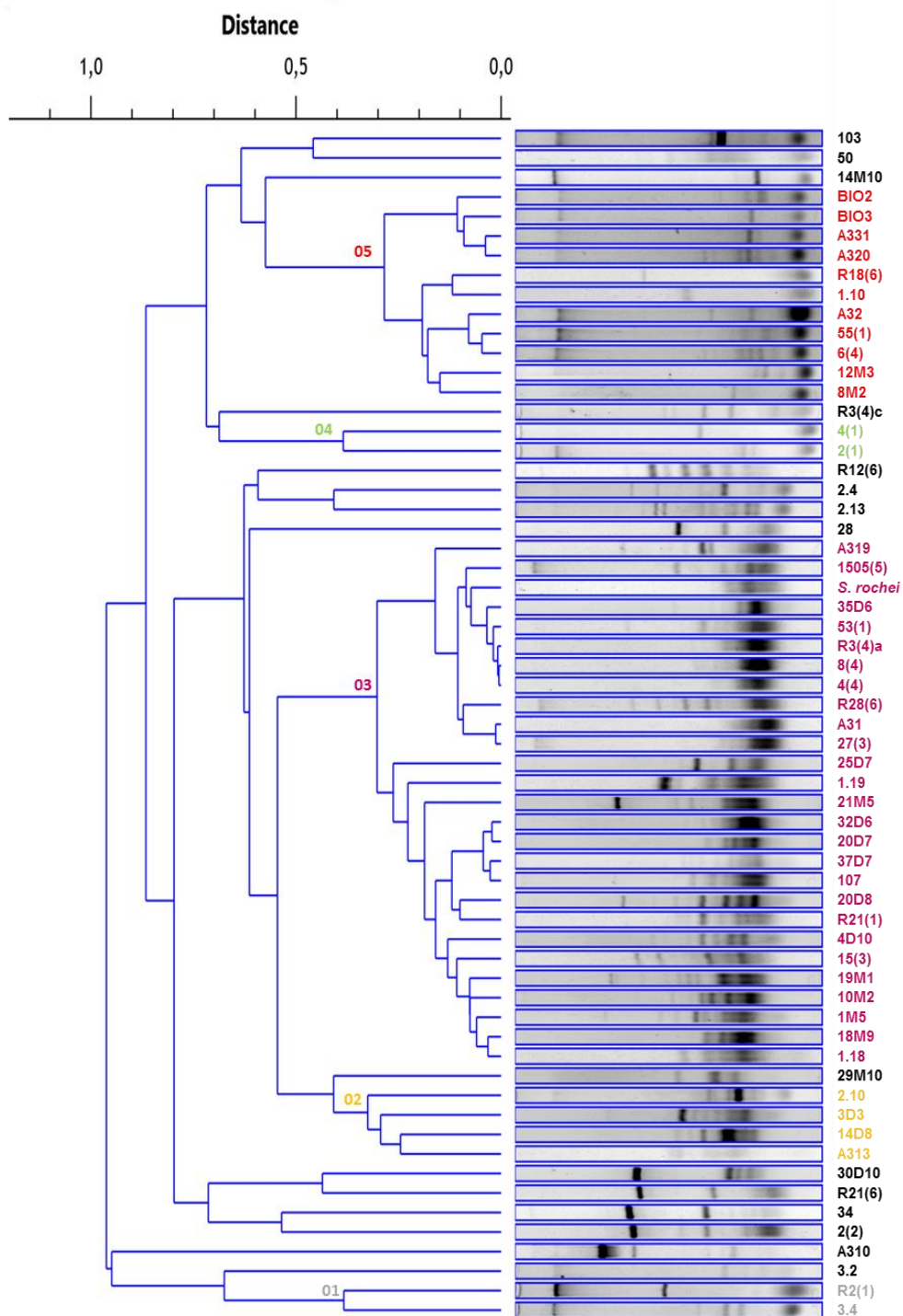


Figura 13: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 32F (UPGMA – Correlação de Pearson).

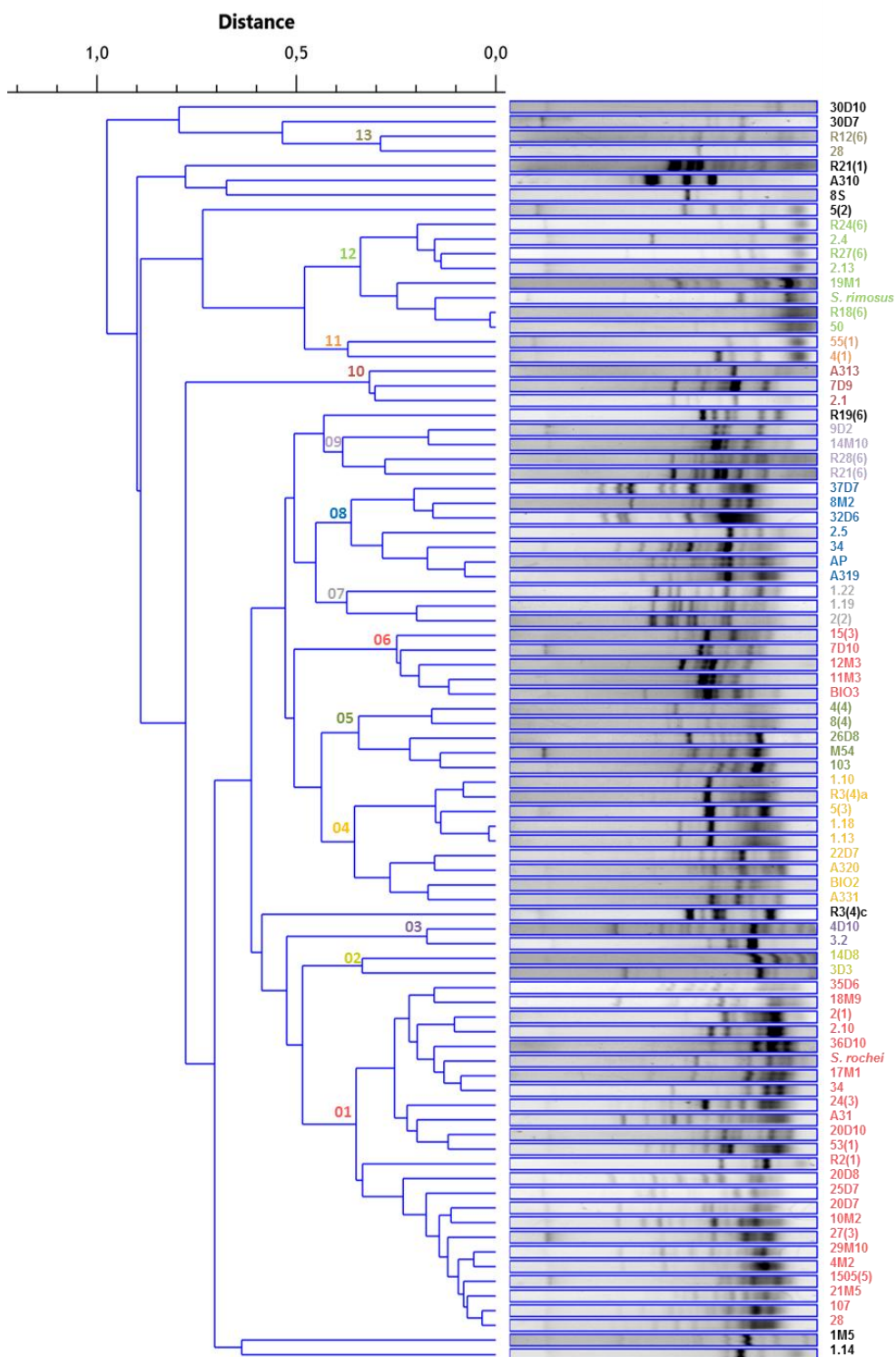


Figura 14: Dendrograma mostrando os agrupamentos gerados a partir dos distintos padrões de amplificação dos isolados de actinobactérias obtidos no *primer* 38F (UPGMA – Correlação de Pearson).

5.1.3 Sequenciamento 16S rDNA

Quarenta e três isolados, dos 86 recuperados foram amplificados com os *primers* pA e pF (Figura 15), o que corresponde a um fragmento de 1043 bases da sequência do rDNA. O *primers* utilizado no sequenciamento foi o pA, que permitiu a amplificação de fragmentos de aproximadamente 700 bases. O isolado 37D7 apresentou uma sequência de 146 bases, o que foi desconsiderado.

Somente o isolado 6(2) apresentou similaridade de 98% com sequências de cinco espécies diferentes depositadas no *Genbank*: *S. exfoliatus* ([KT758353.1](#)), *S. somaliensis* ([KT758393.1](#)), *S. violascens* ([KT758350.1](#)), *S. albidoflavus* ([KT200482.1](#)) e *S. daghestanicus* ([KT200479.1](#)). 49% dos isolados apresentaram similaridade com o gênero *Streptomyces*, porém os índices de identidade não foram suficientes para identificar a espécie (Tabela 7). Três isolados - 9D2, 103, 107, - apresentaram similaridade com *Nocardioopsis* sp. e os isolados 7D9, 37D7, 2(1), R21(6) e 3.2 apresentaram um baixo índice de similaridade com os dados presentes no banco de dados. Dez isolados apresentaram similaridade com sequências de bactérias não-cultiváveis – 34, 2.5, 6(4), R2(1), A331, 11M3, 14M10, 20D8, 26D8 e 30D7. Dois isolados, 2.13 e 1.19 deram similaridade com *Bacillus* sp. e um isolado, A310 apresentou similaridade com *Acinetobacter* sp.

Tabela 7: Relação dos isolados identificados como estreptomicetos no sequenciamento do 16S rDNA.

Isolado	Gênero	Id (%)	Isolado	Gênero	Id (%)
50	<i>Streptomyces</i>	88	R27(6)	<i>Streptomyces</i>	92
8S	<i>Streptomyces</i>	89	5(3)	<i>Streptomyces</i>	94
1M5	<i>Streptomyces</i>	94	27(3)	<i>Streptomyces</i>	93
4M2	<i>Streptomyces</i>	84	55(1)	<i>Streptomyces</i>	86
14D8	<i>Streptomyces</i>	94	1505(5)	<i>Streptomyces</i>	89
30D10	<i>Streptomyces</i>	87	1.10	<i>Streptomyces</i>	94
32D6	<i>Streptomyces</i>	96	2.8	<i>Streptomyces</i>	84
R12(6)	<i>Streptomyces</i>	92	A31	<i>Streptomyces</i>	85
R18(6)	<i>Streptomyces</i>	90	A313	<i>Streptomyces</i>	86
1.14	<i>Streptomyces</i>	89	7D10	<i>Streptomyces</i>	87

1 TAGAGTTTGA TCCTGGCTCA G GACGAACGC TGGCGGCGTG CTTAACACAT GCAAGTCGAA
 61 CGATGAAGCC GCTTCGGTGG TGGATTAGTG GCGAACGGGT GAGTAACACG TGGGCAATCT
 121 GCCCTGCACT CTGGGACAAG CCCTGGAAC GGGGTCTAAT ACCGGATATG ACACGGGATC
 181 GCATGGTCTC CGTGTGAAA GCTCCGGCGG TGCAGGATGA GCCCGCGGCC TATCAGCTTG
 241 TTGGTGGGGT GATGGCCTAC CAAGGCGACG ACGGGTAGCC GGCCTGAGAG GGCGACCGGC
 301 CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA
 361 CAATGGGCGC AAGCCTGATG CAGCGACGCC GCGTGAGGGA TGACGGCCTT CGGGTTGTAA
 421 ACCTCTTTCA GCAGGGAAGA AGCGCGAGTG ACGGTACCTG CAGAAGAAGC ACCGGCTAAC
 481 TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG GTGCGAGCGT TGTCCGGAAT TATTGGGCGT
 541 AAAGAGCTCG TAGGCGGCTT GTCGCGTCGG ATGTGAAAGC CCGGGGCTTA ACCCCGGGTC
 601 TGCATTGAT ACGGGCAGGC TAGAGTTCGG CAGGGGAGAT TGGAAATTC TGGTGTAGCG
 661 GTGAAATGCG CAGATATCAG GAGGAACACC GGTGGCGAAG GCGGATCTCT GGGCCGATAC
 721 TGACGCTGAG GAGCGAAAGC GTGGGGAGCG AACAGGATTA GATACCCTGG TAGTCCACGC
 781 CGTAAACGTT GGGCACTAGG TGTGGGCGGC ATCCCCGTC GTCCGTGCCG CAGCTAACGC
 841 ATTAAGTGCC CCGCCTGGGG AGTACGGCCG CAAGGCTAAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG
 901 GCCCGCACAA GCGGCGGAGC ATGTGGCTTA ATTCGACGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAAG
 961 GCTTGACATA CACCGGAAAG CCGTAGAGAT ACGGCCCCCTT TGTGGTTCGG TGTACAGGTG
 1021 GTGCATGGCT GTCGTCAGCT CGT GTCGTGA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA
 1081 ACCCTTGTCC TGTGTTGCCA GCAACTCCTT TCGGGGAGGT TGGGACTCA CGGGAGACTG
 1141 CCGGGGTCAA CTCGGAGGAA GGTGGGGACG ACGTCAAGTC ATCATGCCCC TTATGTCTTG
 1201 GGCTGCACAC GTGCTACAAT GGCCGGTACA ATGAGCTGCG ATGCCGTGAG GTGGAGCGAA
 1261 TCTCAAAAAG CCGGTCTCAG TTCGGATTGG GGTCTGCAAC TCGACCCCAT GAAGTCGGAG
 1321 TCGCTAGTAA TCGCAGATCA GCATTGCTGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC
 1381 CGCCGTAC GTCACGAAAG TCGGTAACAC CCGAAGCCGG TGGCCCAACC CCTTGTGGGA
 1441 GGGAGTCGTC GAAGGTGGGA CTGGCGATTG GGACGAAGTC GTAACAAGGT AGCCGTACCG
 1501 GAAGGTGCGG CTGGATCACC TCCTAA

Figura 15: *Streptomyces* sp. MTCC 8377 16S rRNA. Em azul está destacado o *primer A* e em amarelo o *primer F*.

5.2 PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO ATIVO

5.2.1 Extração líquido-líquido

O extrato bruto produzido pelo isolado de actinobactéria *Streptomyces* 8S, após o cultivo em meio de cultura SC passou por diferentes etapas para obtenção de um produto final purificado com atividade antimicrobiana. Na extração líquido-líquido utilizando-se ácido acético observou-se que o extrato bruto proveniente do *Streptomyces* 8S era solúvel no solvente, impedindo a separação das fases. O butanol não se mostrou um solvente eficiente pois não era evaporado no rotavapor. O clorofórmio gerou três fases distintas, sendo que a fase intermediária apresentou uma consistência gomosa que dificultou a separação da FO e FA. Desta forma, estes solventes foram descartados. Os solventes orgânicos que foram capazes de separar o extrato bruto em duas fases bem distintas (FO e FA) foram o acetato de etila, diclorometano e hexano. Com o uso do hexano, somente foi possível observar atividade antimicrobiana na FA. Já com o uso do diclorometano e o acetato de etila, ambas as fases apresentaram atividade antimicrobiana semelhante. Os halos de inibição observados nos ensaios de atividade antimicrobiana encontram-se na Tabela 8. A partir da FA obtida da extração utilizando acetato de etila, que se mostrou mais eficiente no processo de evaporação, foram utilizados para separação nas colunas cromatográficas.

Tabela 8: Atividade residual (%) do composto bioativo presente no extrato bruto do isolado *Streptomyces* 8S contra amostra clínicas *S. aureus* 21 frente a extração líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos.

	<i>S. aureus</i> 21	
	FO	FA
Acetato de etila	77	82
Diclorometano	85	100
Hexano	x	40

X: sem halo de inibição

5.2.2 Colunas cromatográficas

A coluna de Sephadex G-75 foi utilizada para separar por tamanho as moléculas do composto antimicrobiano presente no extrato bruto do *Streptomyces* 8S. Na coluna foram adicionados 2µL da FA e foram obtidas cinco frações de 1mL

cada com atividade antimicrobiana a partir das eluições da coluna. Estas frações, na maioria das vezes, correspondiam aos tubos 6, 7, 8, 9, 10 e 11, variando de acordo com a altura da resina dentro da coluna. Foram realizadas cinco corridas na coluna Sephadex G-75 a fim de se obter o volume necessário para uma corrida na SP-Sepharose.

A coluna SP-Sepharose é utilizada para separação de moléculas a partir da interação eletrostática destas com a resina. Nesta coluna foi adicionado 2,5mL do *pool* das frações com atividade resultantes da coluna de Sephadex G-75. Uma única fração com atividade antimicrobiana foi detectada, no tubo de número 5, eluído somente com PBS sem adição de NaCl. Visto que o composto bioativo foi eluído no chamado volume morto, pode-se dizer que a molécula responsável pela atividade antimicrobiana possui carga negativa, pois não foi aderida pelos ânions presentes na resina. Dez corridas foram realizadas na SP-Sepharose a fim de se obter 1mL para ser utilizadas na próxima coluna de cromatografia.

A coluna com DEAE-celulose é utilizada para separação das moléculas também por interação eletrostática, porém esta resina possui carga positiva, diferindo da resina SP-Sepharose. Com o primeiro gradiente utilizado na DEAE-celulose, de 0 a 1M NaCl, não foi observado atividade antimicrobiana em nenhuma das frações eluídas. O gradiente salino foi aumentado visando assim obter maior força na interação com as moléculas fortemente aderidas à resina. Porém, o gradiente de 0 a 1,5M NaCl também não se mostrou eficiente. Um terceiro gradiente foi testado, de 0 a 2,5M, onde observou-se atividade antimicrobiana quando utilizado 2M de NaCl para eluição da coluna. As frações com atividade antimicrobiana foram a 32, 33 e 34.

A fração 5 da SP-Sepharose foi então analisada em gel de poliacrilamida, com o objetivo de avaliar se a mesma era protéica ou não. Nenhuma banda relativa a proteínas foi identificada. Como essa fração possui atividade antimicrobiana, pode-se sugerir que o composto bioativo presente no extrato bruto do *Streptomyces* 8S não é de origem protéica e possui carga altamente negativa.

5.2.3 Avaliações de estabilidade da atividade antimicrobiana

As diferentes concentrações de EDTA adicionadas ao extrato bruto modificaram muito pouco a atividade antimicrobiana. A atividade residual se manteve em cerca de 90% nas três menores concentrações (100 μ M, 500 μ M e

1mM). Quando 100 mM de EDTA foi adicionado observou-se uma diminuição da atividade de cerca de 15% na maioria das bactérias-teste, a atividade só se manteve a mesma na linhagem *S. epidermidis* 221 e observou-se uma diminuição de 32% na linhagem *E. faecalis* 2389 (Tabela 9).

Tabela 9: Atividade residual (%) do composto bioativo presente no extrato bruto do isolado *Streptomyces* 8S contra amostras clínicas frente a adição de EDTA.

EDTA	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>	
	21	221	229	1300	488	2389	2688	
100 µM	95	96	90	100	89	97	100	
500 µM	93	100	97	100	89	100	100	
1 mM	88	100	97	97	89	94	100	
100 mM	84	100	85	85	87	68	91	

Quando enzimas proteolíticas foram adicionadas ao extrato bruto, observou-se uma diminuição da atividade residual do composto bioativo. Na bactéria *E. faecium* 1300 foi possível observar a maior diminuição de atividade antimicrobiana perante todas as enzimas. A enzima tripsina foi a que mais diminuiu a atividade antimicrobiana do composto, observando-se uma diminuição maior que 22% em todas as amostras clínicas (Tabela 10).

Tabela 10: Atividade residual (%) do composto bioativo presente no extrato bruto do isolado *Streptomyces* 8S contra amostras clínicas frente a adição de proteases.

Enzimas proteolíticas	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>	
	21	221	229	1300	488	2389	2688	
Papaína	96	94	84	78	90	100	100	
Pepsina	100	78	96	84	96	100	93	
Tripsina	78	47	56	65	73	60	75	
Proteinase K	100	73	96	62	93	100	84	
Lisozima	93	100	100	65	83	96	72	

O composto bioativo apresenta estabilidade em altas temperaturas, visto que foi necessária uma temperatura de 90°C para inibir totalmente a atividade do composto. As cepas de *Enterococcus* mostraram-se mais sensíveis ao composto antimicrobiano mesmo quando este foi incubado em altas temperaturas (Tabela 11).

Tabela 11: Atividade residual (%) do composto bioativo presente no extrato bruto do isolado *Streptomyces* 8S contra amostras clínicas em diferentes temperaturas e tempos de incubação.

Temp	Tempo	<i>S. epidermidis</i>		<i>E. faecium</i>		<i>E. faecalis</i>	
		221	229	1300	488	2389	2688
30 °C	15 min	76	96	96	85	88	85
	30 min	85	100	96	92	92	89
40 °C	15 min	95	100	92	92	92	96
	30 min	95	100	100	96	100	100
50 °C	15 min	95	96	100	88	100	100
	30 min	100	96	100	92	100	96
60 °C	15 min	95	96	96	100	88	89
	30 min	90	84	92	100	92	100
70 °C	15 min	100	100	100	100	100	100
	30 min	78	80	77	100	93	100
80 °C	15 min	71	77	88	100	90	95
	30 min	X	X	47	75	48	56
90 °C	15 min	X	X	47	55	64	52
	30 min	X	X	X	X	X	X

X: sem atividade

Nos ensaios de cultivo em frascos com diferentes volumes não foi observada nenhuma diminuição na atividade antimicrobiana presente no extrato bruto quando o *Streptomyces* 8S foi crescido em frascos de 250mL, 500mL e 1000mL.

Quando a FO foi analisada no HPLC não foi possível recuperar a atividade antimicrobiana a partir do pico resultante no cromatograma.

6. DISCUSSÃO

Inicialmente, foram inoculados 473 actinobactérias, isoladas em trabalhos anteriores (Oliveira, 2003; Rodrigues, 2006; Oliveira, 2009; Duarte, 2012). Destes, 88 foram recuperados em meio ACA sob agitação a 28°C. Houve uma grande perda de isolados no momento da recuperação e os fatores que levaram a inviabilidade da maior parte das actinobactérias podem estar relacionados com o método utilizado para conservação das amostras. Rodrigues *et al.* (1992) testaram a eficiência da preservação de amostras de fungos e actinobactérias em água destilada, método que se mostrou eficaz para a maior parte dos fungos. No entanto, o método não se mostrou eficaz para as actinobactérias, pois as mesmas perdiam a viabilidade após 18 meses de conservação. Ulanova & Goo (2015) relatam a importância da temperatura de armazenamento destas amostras, que segundo os autores deve ser a menor possível (-80°C), principalmente para manutenção de DNA e enzimas importantes em estudos de atividade biológica. Com o método de recuperação utilizado neste trabalho, obteve-se uma maior recuperação de isolados relativos ao gênero *Streptomyces*, em detrimento dos outros gêneros isolados pelos autores anteriores. Shepherd *et al.* (2010) descreveram os métodos que devem ser utilizados para crescimento e manutenção de cepas de *Streptomyces*. Os autores recomendam o armazenamento em glicerol 25% a partir de esporos, por serem mais estáveis que o micélio. Os autores preconizam realizar-se uma semeadura de superfície do estreptomiceto e, após o crescimento e esporulação, a remoção de um quarto deste crescimento, o qual é depositado em um tubo com água destilada que após é preenchido com glicerol. Com este método, os isolados mostraram-se viáveis durante muitos anos, mesmo após várias utilizações, onde o tubo é descongelado e congelado. A maneira como foram armazenados as actinobactérias no presente trabalho só difere do estudo de Shepherd *et al.* (2010) no momento de retirada do crescimento bacteriano, que foi realizado cortando-se uma porção do meio de cultura e transferido este para um tubo com glicerol e água. Com isto espera-se que os isolados estudados mantenham-se viáveis por mais tempo. Outro fator importante a se destacar é o método utilizado para recuperação destes isolados, para tanto foi utilizado somente um meio de cultura, que corresponde ao escolhido pelo nosso grupo de pesquisa, e uma única temperatura de crescimento. Como estes isolados são oriundos de várias fontes distintas, o ideal seria a utilização de outros meios de

cultura e outras temperaturas de incubação, visando à recuperação total das amostras isoladas.

Os resultados obtidos com *primer* BOX1A mostraram distintos padrões de amplificação em 85 dos 86 isolados de actinobactérias utilizados no trabalho. Palaniyandi *et al.* (2012) utilizou BOX-PCR para acessar a diversidade de 29 isolados de actinobactérias e obteve diversos fragmentos de amplificação. Observe-se nos dendrogramas construídos com os resultados das amplificações neste trabalho que o *primer* BOX gerou um grande número de fragmentos, como já era esperado. Lanoot *et al.* (2003) utilizou BOX-PCR com o objetivo de resolver as sinonímias presentes no gênero *Streptomyces* e observou que das 473 cepas testadas, 350 mostraram um padrão único de fragmentos, confirmando tanto a capacidade de discriminação existente no *primer* BOX1AR quanto a alta diversidade existente dentro do gênero. Além da amplificação com BOX-PCR, Lanoot *et al.* (2003) realizaram estudos de hibridização de DNA em isolados que apresentaram padrões de amplificação muito semelhantes, encontrando homologias de até 100% entre duas espécies distintas (*S. diastallicus* e *S. colombiensis*; *S. rosendiastaticus* e *S. tricolor*; *S. roseoflavus* e *S. cinereorectus*). Isto demonstra uma alta correlação entre os padrões de fragmentos obtidos com o uso do BOX-PCR e a homologia da sequência de DNA nos isolados. Segundo Lanoot *et al.* (2003), o *fingerprinting* genômico de DNA baseado no BOX-PCR é uma ferramenta válida na detecção de genomas altamente relacionados, e aliada a um extenso banco de dados pode ser a chave para a identificação de espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Com o uso do BOX-PCR foi possível observar que o isolado 50 e o 32D6 apresentaram 96% de similaridade nos padrões de fragmentos. No sequenciamento destes isolados, ambos foram similares a mais de uma espécie pertencente ao gênero *Streptomyces*, porém a única espécie que foi coincidente em ambos os isolados foi *S. thermocarboxydus*, sugerindo então a identificação destes, apesar da identidade destes isolados com as sequências do banco de dados ser menor que 97%.

Já na técnica de URP-PCR somente os *primers* 17R e 9F amplificaram 99% dos isolados (17R não amplificou R19(6) e o 9F, 30D10). É importante ressaltar que os outros *primers* amplificaram a grande maioria das amostras, apenas o *primer* 1F não foi muito eficiente, pois amplificou 61 isolados. O número de fragmentos gerados nesta técnica é inferior ao BOX-PCR, como podemos observar nos respectivos dendrogramas. No trabalho de Kang *et al.* (2002) é possível observar

que quando o *primer* URP 2R foi utilizado na amplificação de *Salmonella paratyphi*, *S. typhimurium* e *S. thompson* houve amplificação de uma número menor de fragmentos do que os visualizados nos outros organismos testados. É importante ressaltar que no trabalho de Kang *et al.* (2002) não foi utilizada nenhuma bactéria Gram-positiva.

Um alto índice de similaridade com a *S. rochei* ATCC 10739 e o isolado A313 foi observado quando amplificados com os *primers* 9F e 1F. Isto pode ser um indicativo da espécie a qual pertence o isolado A313. Os isolados A331 e A320 apresentaram 98% de similaridade quando amplificados com os *primers* 9F, 13R e 17R e 96% de similaridade com o *primer* 32F. Porém, destes isolados o único sequenciado foi o A331, que apresentou identidade com outro gênero bacteriano no banco de dados. É possível verificar altos índices de similaridade entre outros isolados de actinobactérias, porém a falta de identificação das espécies a quais esses isolados pertencem dificulta a análise dessas relações. Para resolver estas questões propõe-se a amplificação de todo o fragmento 16S rDNA destes isolados, visto que no estudo de Lanoot *et al.* (2003) foi verificado que estas espécies acima descritas tiveram fragmentos únicos no BOX-PCR e não possuíam sinonímias em estudos com hibridização de DNA. A identificação das espécies de *Streptomyces* é bastante difícil, pois há um alto número de espécies com nomes publicados, baseados em somente uma única amostra e em uma única técnica (Kämpfer, 2010).

Kang *et al.* (2003) utilizou um *primer* derivado de análises anteriores (Kang *et al.*, 1998) com os *primers* URP para diagnosticar *Pectobacterium carotovorum* spp. *carotovorum*. Kang *et al.* (1998) obtiveram, através de amplificações com os *primers* URP, um fragmento único à *P. carotovorum*. Este fragmento serviu como marcador genético para o estudo de 2003. Outro estudo com marcadores genéticos a partir de fragmentos do URP-PCR foi realizado por Lim *et al.* (2009) com cepas de *Agrobacterium vitis*, onde o fragmento de 0,7kb foi visualizado em oito cepas de *A. vitis* quando utilizado o *primer* 2R. Dos nove *primers* URP utilizados neste trabalho, dois amplificaram fragmentos com prevalência de 30% entre os isolados, sendo eles respectivamente: 2R e 13R; 323pb e 206pb. Pode-se sugerir o uso destes fragmentos como *primers* para um estudo com cepas padrões de estreptomicetos a fim de verificar se estes fragmentos podem servir como marcadores genéticos. Neste trabalho não foi possível identificar estes fragmentos como possíveis marcadores genéticos, pois não há certeza quanto a

identificação dos isolados de actinobactérias utilizados. No entanto, os fragmentos de 323pb e de 206pb foram amplificados na amostra *S. rochei* ATCC 10739 e o *primer* 2R mostrou-se eficiente em amplificar genomas bacterianos nos trabalhos citados anteriormente. Além disso, o dendrograma do *primer* 2R apresentou mais agrupamentos que os demais, demonstrando maior clareza nas relações entre os isolados estudados.

Estudos de estabilidade do composto antimicrobiano produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S foram realizados antes da purificação deste, ou seja, no extrato bruto gerado do cultivo do estreptomiceto. Estes estudos são necessários para o planejamento dos processos de purificação, pois dão sugestões do comportamento do composto de interesse. Testes com adição de EDTA são realizados para caracterizar enzimas através de seus cofatores metálicos (Wang & Benkovic, 1998). Quando EDTA foi adicionado ao extrato bruto não foi observada uma grande diminuição da atividade antimicrobiana, esta se manteve superior a 80% na grande maioria dos testes realizados. Este resultado sugere a necessidade algum metal para atividade da molécula antimicrobiana que pode ter formado um composto com o EDTA adicionado. Minotto (2014) também relatou perda de atividade antimicrobiana em três isolados de *Streptomyces* quando em presença de EDTA e sugeriu a presença de íons metálicos no extrato bruto centrifugado que são necessários para a atividade. Estes íons possuem cargas que podem interferir nos processos de purificação. No que diz respeito às enzimas proteolíticas, observou-se uma diminuição mais significativa da atividade antimicrobiana quando o extrato bruto foi tratado com tripsina. Como a atividade não foi completamente inibida, Minotto (2014) descreveu este resultado como demonstrativo da presença de várias moléculas com atividade antimicrobiana, sendo que aparentemente alguma delas é sensível à ação das proteases. Pode-se ainda sugerir a presença de peptídeos bioativos no extrato bruto que não foram em sua totalidade clivados e inibidos.

Nas diferentes temperaturas de incubação do composto bioativo foi possível observar certa resistência a altas temperaturas, assim como em He *et al.* (2010), onde os autores relataram a presença de um polissacarídeo com atividade antimicrobiana que se mostrou resistente a altas temperaturas. Neste caso, o resultado é um bom indicativo do possível uso deste polissacarídeo em alimentos para evitar a infecção com bactérias patógenas, visto o objetivo do estudo em questão. Neste trabalho, saber que o composto bioativo não é muito atingido pelo

aumento da temperatura possibilita realizar os processos de purificação em uma temperatura ambiente não controlada, sem a necessidade de câmaras refrigeradas.

O teste de cultivo em frascos Erlenmeyer de diferentes tamanhos foi realizado a fim de otimizar a produção do composto bioativo, pois a possibilidade de cultivar o *Streptomyces* 8S em frascos de 1L seria um ganho de tempo ao obtermos um maior volume de extrato bruto ao final do crescimento. Estudos anteriores do nosso grupo utilizavam frascos de 250mL (Spadari, 2013). Todos estes resultados de inibição parcial da atividade antimicrobiana podem ser derivado ao fato dos testes terem sido realizados no extrato bruto e não no composto purificado, pois pode haver a presença de moléculas protetoras do composto no extrato bruto. Estes testes devem ser realizados após a purificação do composto para confirmação do comportamento.

O acetato de etila foi escolhido como o solvente orgânico mais apropriado para dar início ao processo de purificação do composto bioativo produzido por *Streptomyces* 8S, visto que foi eficiente em separar duas fases distintas. Este solvente é o mais comumente utilizado, como em Torres-Beltrán *et al.* (2012) e Atta & Yassen (2015), onde o composto antimicrobiano de interesse foi estudado a partir da fase orgânica e não há relato de atividade antimicrobiana na fase aquosa. No presente trabalho foi detectada a atividade antimicrobiana em ambas as fases resultantes da extração líquido-líquido. Isto pode ter acontecido devido a uma má separação dos constituintes do composto com este solvente orgânico, que acabou por não separar todas as moléculas em uma única fase. Com a utilização do hexano não foi observada atividade antimicrobiana na fase orgânica, o mesmo foi observado por Minotto (2014). Porém, em Torres-Beltrán *et al.* (2012) e Atta & Yassen (2015) não há indicação de terem sido realizados testes com a fase aquosa, a fim de verificar a atividade antimicrobiana. Não é incomum mais de um composto biologicamente ativo em um único isolado de *Streptomyces* (Bérdy, 2005). Por isso e por não haver distinção dos relatos de atividade antimicrobiana na fase aquosa, acreditamos que estamos trabalhando com dois compostos distintos, visto que mesmo após a extração líquido-líquido não houve diminuição da atividade antimicrobiana analisada através da difusão em poço.

Como obtivemos duas frações com atividade antimicrobiana decidimos por duas rotas distintas a fim de purificar o composto. Como a fração orgânica possui um volume muito menor optou-se por seguir no HPLC. Já a fração aquosa foi

concentrada por liofilização, mas ainda assim tínhamos um volume suficiente para trabalhar nas colunas cromatográficas. A utilização das colunas cromatográficas foi realizada com base em trabalhos de purificação de proteínas, que possuem protocolos estabelecidos.

Optou-se pelo uso da resina Sephadex G-75 ao invés da sílica, comum em outros processos de purificação (Thirumurugan & Vijayakumar, 2015), pois esta resina é a mais indicada para purificar biomoléculas (NCHU, 2014). O composto antimicrobiano presente na fase aquosa obtida a partir do extrato bruto do *Streptomyces* 8S possui um peso molecular que varia entre 3.000 e 70.000 Da, pois estes valores são os limites de exclusão da Sephadex-G75.

As resinas de troca iônica são ótimos indicadores de carga molecular da molécula antimicrobiana e são mais sensíveis aos compostos, realizando uma purificação mais refinada do que a cromatografia por exclusão de tamanho (NCHU, 2014). Geralmente inicia-se o processo de purificação utilizando a resina de troca aniônica, porém neste trabalho utilizamos a troca catiônica primeiramente por uma questão de disponibilidade da resina. Apesar disso, mesmo que o composto não tenha aderido à resina SP-Sepharose, a purificação foi realizada, pois contaminações presentes na fase aquosa que não foram eliminadas na Sephadex podem ter sido aderidas à SP-Sepharose e separadas do composto antimicrobiano de interesse. Foram necessárias três tentativas com concentrações cada vez mais altas de NaCl e o composto foi eluído com 2M de NaCl. Com isto, pode-se afirmar que o composto possui carga altamente negativa e que está puro, pois esta concentração de NaCl é utilizada em protocolos para limpeza da resina, após as análises.

As técnicas de cromatografia de alta resolução são bastante utilizadas para purificar e caracterizar compostos antimicrobianos (Moon *et al.*, 2014; Yekkour *et al.*, 2015), devido a rapidez e reprodutibilidade. As perspectivas deste trabalho incluem a análise dos compostos recuperados de ambas as fases em HPLC (*high performance liquid chromatography*) e RMN (ressonância magnética nuclear).

7. CONCLUSÃO

1. Oitenta e oito isolados de actinobactérias foram recuperados e utilizados no desenvolvimento deste trabalho.
2. Com isto, foi possível padronizar um protocolo de URP-PCR que resultou em uma grande diversidade de fragmentos dentre os isolados.
3. Nove dos 12 *primers* foram capazes de amplificar estas actinobactérias.
4. Com estes isolados também foi possível padronizar um protocolo para uso do *primer* BOX1AR na técnica de BOX-PCR.
5. Esta técnica gerou um maior número de fragmentos do que o URP-PCR.
6. O sequenciamento do 16S rDNA com os *primers* pA e pF não foi satisfatória, visto que somente um isolado – 6(2) – apresentou identidade superior a 97% com sequências presentes no banco de dados do NCBI.
7. Não foi possível afirmar a identificação das espécies, somente sugerir relações de parentesco com base nos dendrogramas gerados.
8. O solvente orgânico mais adequado para a separação do composto antimicrobiano produzido pelo isolado *Streptomyces* 8S foi o acetato de etila.
9. Foi detectada atividade antimicrobiana em ambas as fases, aquosa e orgânica. A fase aquosa foi purificada através do uso de colunas de cromatografia.
10. Os resultados obtidos na SP-Sepharose e na DEAE-celulose revelam que o composto antimicrobiano tem carga altamente negativa e parece estar puro, devido a alta concentração de NaCl necessária para sua eluição.
11. O composto presente na fase orgânica será investigado posteriormente por HPLC, devido ao pequeno volume obtido.

8. REFERÊNCIAS

- Atta HM, Yassen AM. 2015. Antimicrobial activities of a *Streptomyces microflavus* isolated from KSA: taxonomy, fermentation, extraction and biological activities. *Int J Life Sc.* 4(4): 206-69.
- Antunes TC, Borba MP, Spadari CC, Antunes AL, Frazzon APG, Germani JC, Van Der Sand S. 2014. Screening of actinomycetes with activity against clinical isolates of Gram positive cocci with multiresistant profile. *J Adv Sci Res.* 5(1):13-17.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2016. Taxonomy, Physiology and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Bio Rev.* 80:1-43.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang C-H, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream M-A, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek J, Barrel BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nat.* 417:141-147.
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. A personal review. *J Antibiot.* 58(1):1-26.
- Bérdy J. 2012 Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot.* 65:385-95.
- Borba MP. 2013. Avaliação das condições ideais de crescimento para *Streptomyces* sp. – visando o potencial antimicrobiano. Trabalho de Conclusão (Bacharelado em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Brennan PJ. 2003. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 83:91-97.
- Buchanan RE. 1917. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. II. The primary subdivisions of the *Schizomycetes*. *J Bacteriol.* 2:155-64.
- Carter H, Clark R, Dickman S, Loo Y, Skell P, Strong W. 1945. Isolation and purification of streptomycin. *J Bio Chem.* 160: 337-342.
- Claessen D, Rozen DE, Kuipers OP, Sogaard-Andersen L, van Wezel GP. 2014. Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filament sand fruiting bodies. *Nat Rev Microbiol* 12:115-124.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev.* 34:171-198.
- CHEM - Penn State Department of Chemistry. **Liquid/Liquid Extraction.** 2013. Pennsylvania. EUA 2013. Disponível em: http://courses.chem.psu.edu/chem36/Experiments/PDF's_for_techniques/Liquid_Liquid.pdf. Acesso em: 02 mar. 2016.
- Chiba H, Inokoshi J, Okamoto M, Asanuma S, Matsuzaki Ki, Iwama M, Mizumoto K, Tanaka H, Oheda M, Fujita K, Nakashima H, Shinose M, Takahashi Y, Omura S. 2001. Actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete that inhibits syncytium formation: isolation, characterization and biological activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 282(2):595-601.
- Dochhil H, Dkhar MS, Barman D. 2013. Seed germination enhancing activity of endophytic *Streptomyces* isolated from indigenous ethno-medicinal plant

- Centella asiatica*. Int J Pharm Bio Sci. 4(1):256-262.
- Duarte MW. 2012. **Identificação de actinomicetos isolados de solo impactado com resíduos petroquímicos e seleção de potenciais degradadores de misturas de diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Dubey SC, Tripathi A, Upadhyay BK. 2012. Molecular diversity analysis of *Rhizoctonia solani* isolates infecting various pulse crops in different agro-ecological regions of India. Folia Microbiol. 57:513-524.
- Edwards U, Rogall T, Blöker H, Emde M, Böttger EC. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. NucAc Res. 17(19):7843-53.
- Edwards C. 1993. Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes. Appl Biochem Biotech. 42:161-80.
- Embley TM, Stackebrandt E. 1994. The molecular phylogeny and systematic of the actinomycetes. Annu Rev Microbiol. 48:257–89.
- Gao B, Gupta RS. 2012. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. Microbiol Mol Bio Rev. 76:66-112.
- Genilloud O. 2014. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. Antonie van Leeuwenhoek. 106:173-188.
- Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M. 2015. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. Antonie van Leeuwenhoek. 108:267-289.
- Goodfellow M, Fergusson EV, Sanglier J-J. 1992. Numerical classification and identification of *Streptomyces* species – a review. Gene. 115:225-233.
- Goodfellow M, Williams, ST. 1983. Ecology of Actinomycetes. Ann Rev Microbiol. 37:189-216.
- He F, Yang Y, Yang G, Yu L. 2010. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces Virginia* H03. Food Control. 21:1257-1262.
- Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol Microbiol. 5(4):825-834.
- Jungbauer A, Hahn R. 2009. Ion-exchange chromatography, p 349-371 In Burgess RR, Deutscher MP (ed), Methods in Enzymology. Elsevier.
- Kämpfer, P. 2010. Genus I: *Streptomyces*, p 1455-1767. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB (ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol 5. Springer-Verlag. 2083 p.
- Kang HW, Go SJ, Kwon SW. 1998. Specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by DNA probe selected from PCR polymorphic bands. Korean Journal of Plant Pathology. 14:161–70.
- Kang H-W, Park D-S, Go S-J, Eun M-Y. 2002. Fingerprinting of Diverse Genomes Using PCR with Universal Rice Primers Generated from Repetitive Sequence of Korean Weedy Rice. Mol Cells. 13(2):281-287.
- Kaup O, Gräfen I, Zellermann E-M, Eichenlaub R, Gartemann K-H. 2005. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Mol Plant-Microbe Interact. 18:1090–1098.
- Kirst HA. 2013. Developing new antibacterials through natural product research. Expert Opin Drug Discov. 8:479-493.

- Kumbhar C, Watve M. 2013. Why antibiotics: A comparative evaluation of different hypotheses for the natural role of antibiotics and an evolutionary synthesis. *Nat Sci.* 5(4):26-40.
- Kang HW, Kwon SW, Go SJ. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathol.* 52:127-133.
- Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P, Cnockaert M, Zhang J, Huang Y, Liu Z, Swings J. 2003. BOX-PCR Fingerprinting as a Powerful Tool to Reveal Synonymous Names in the Genus *Streptomyces*. Emended Descriptions are Proposed for the Species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microbiol.* 27:84-92.
- Lim SH, Kim JG, Kang HW. 2009. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains. *Microbiol Res.* 164:451-60.
- Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Buss HJ, Trujillo ME, Kämpfer P, Whiteman WB. 2012. Road map of the phylum Actinobacteria, p 1–28. *In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whiteman WB (ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol 5.* Springer-Verlag.
- Madigan TM, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2010. Engenharia Genética. *In: **Microbiologia de Brock**, vol 12.* Artmed.
- Mann MB, Spadari CC, Feltrin T, Frazzon APG, Germani JC, Van der Sand ST. 2014. Genetic variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates using URP-PCR. 39(2):163-67.
- Marinelli F, Genilloud O. 2013. Antimicrobials, New and Old Molecules in the Fight Against Multi-resistant Bacteria, Springer, Heilderberg.
- Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R, Morrison DA, Boulnois GJ, Claverys J-P. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl Ac Res.* 20(13):3479-3843.
- Martinville B, Wyman AR, White R, France U. 1982. Assignment of the First Random Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Locus (D14SI) to a Region of Human Chromosome 14. *Am J Hum Genet.* 34:216-26.
- McNeil MM, Brown, JM. 1994 The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 7(3):357-417.
- Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare APL, da Costa SOP, Echeverrigaray S. 2008. Comparison of PCR-Based Molecular Markers for the Characterization of *Proteus mirabilis* Clinical Isolates. *Braz J Inf Dis.* 12(5):423-29.
- Minotto E. 2014. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*". Tese (Doutorado em Microbiologia Clínica e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Moon K, Chung B, Shin Y, Rheingold AL, Moore CE, Park SJ, Park S, Lee SK, Oh K, Shin J, Oh D. 2014. Pentacyclic Antibiotics from a Tidal Mud Flat-Derived Actinomycete. *J Nat Prod.* 78: 524-29.
- Mori S, Barth HG. 1999. Brief Description of Size Exclusion Chromatography. *In: Mori S, Barth HG (eds) **Size exclusion chromatography**.* Springer. Nova Iorque.
- NCHU. 2014. Other Separation Techniques. National Chung Hsing University. Disponível em: http://www.nchu.edu.tw/~giab/Chinese/uploads/2/7/6/0/27609305/chapter_5.pdf
. Acesso em: 05 de mar. 2016.

- Oliveira MF. 2003. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Oliveira MF. 2009. **Prospecção de actinomicetos endofítios de tomateiro com produção de metabólitos bioativos e sua otimização.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Palaniyandi SA, Yang SH, Damodharan K, Suh J-W. 2012. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial Actinobacteria associated with yam rhizosphere. *J Basic Microbiol.* 53:985-995.
- Passari AK, Mishra VK, Gupta VK, Yadav MK, Saikia R, Singh BP. 2015. *In Vitro* and *In Vivo* Plant Growth Promoting Activities and DNA Fingerprinting of Antagonistic Endophytic Actinomycetes Associates with Medicinal Plants. *PLoS ONE.* 10(9):1-18.
- Procópio REL, Silva, IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo, JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 16(5):466-71.
- Rodrigues EG, Lírio VS, Lacaz CS. 1992. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse medico em água destilada. *Rev Inst Med Trop. São Paulo.* 34(2): 159-65.
- Rodrigues K. 2006. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Salamoni SP, Mann MB, Campos FS, Franco AC, Germani JC, Van Der Sand S. 2010. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World J Microbiol Biotechnol.* 26:1847-56.
- Sanglier J, Haag H, HuckTA, Fehr, T. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Res Microbiol,* 144: 633-42.
- Scott, RPW. 2003. Principles and Practice of Chromatography. Library for science, LLC. 106 p.
- Sherma J. 2006. Thin-Layer Chromatography. *In:* Meyers RA. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wileyand Sons.
- Shepherd MD, Kharel MK, Bosserman MA, Rohr J. 2010. Laboratory Maintenance of *Streptomyces* species. *Curr Protoc Microbiol.* 10E.1:1-10.
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 16(3):313-40.
- Spadari, CC. 2013. **Bioprospecção de uma substância antifúngica potencialmente nova produzida por actinomicetos isolados no RS.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Stern MJ, Ames GF-L, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. 1984. Repetitive Extragenic Palindromic Sequences: A Major Component of the Bacterial Genome. *Cell.* 34:1015-26.
- Thirumurugan D, Vijayakumar R. 2015. Characterization and structure elucidation of antibacterial compound of *Streptomyces* sp. ECR77 isolated from East Coast of India. *Curr Microbiol.* 70:745-55.
- Torres-Beltrán M, Cardoso-Martínez F, Aguiñaga-Millán N, Espinosa-Becerril A.

2012. Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas. *Cien Mar.* 38(4):609-24.
- Tanvir R, Sajid I, Hasnain S. 2014. Larvicidal potential of *Asteraceae* family endophytic actinomycetes against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Nat Prod Res.* 28(22):2048–52.
- Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, Bora TC. 2007. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J Mycol Med.* 17:242-249.
- Ulanova D, Goo K-S. 2015. Diversity of actinomycetes isolated from subseafloor sediments after prolonged low-temperature storage. *Folia Microbiol.* 60:211-16.
- Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T, Kataoka M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol.* 181(1):78-82.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Bio Ver.* 71(3):495-48.
- Wang Z, Benkovic SJ. 1998. Purification, Characterization, and Kinetic Studies of a Soluble *Bacteroides fragilis* Metallo- β -lactamase That Provides Multiple Antibiotic Resistance. *J Bio Chem.* 273(35):22402-22408.
- Waskman SA, Schatz A, Reynolds DM. 2010. Production of antibiotic substances by Actinomycetes. *Ann NY Acad Sci.* 1213:112-24.
- Waksman SA, Henrici AT. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol* 46:337-341.
- Weber T, Charusanti P, Musiol-Kroll EM, Jiang X, Tong Y, Kim HU, Lee SY. 2014. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol.* 33(1):15-26.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *NuclAc Res.* 18(22):6531-35.
- World Health Organization. Antimicrobial Resistance – Global Report on Surveillance. 2014. Genebra, Suíça. Disponível em <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> Acesso em 04 mar 2016.
- Yagishita K, Utahara R, Maeda K, Hamada M, Umezawa H. 1968. Acrylamidine, an anti-fungal substance produced by a *Streptomyces*. *J Ant.* 21(7): 444-50.
- Yekkour A, Meklat A, Bijani C, Toumatia O, Errakhi R, Lebrihi A, Mathieu F, Zitouni A, Sabaou N. 2015. *Lett Appl Microbiol.* 60:589-96.