

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Daniella Vilela Lima

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos isolados de solos de Cerrado e Mata Atlântica

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Goiânia  
2007

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Daniella Vilela Lima

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos isolados de solos de Cerrado e Mata Atlântica

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração Microbiologia

Goiânia  
2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(GPT/BC/UFG)

Lima, Daniella Vilela.  
L732a      Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos isolados de solos de Cerrado e Mata Atlântica / Daniella Vilela Lima. – Goiânia, 2007.  
              xiv,130f. : il. Qds., tabs., figs.

Orientador: José Daniel Gonçalves Vieira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007.

**Bibliografia : f.89-113.**  
Inclui lista de quadros, tabelas, figuras e de abreviaturas.  
Anexos.

**1. Actinomicetos – Solo – Cerrado - Avaliação  
2. Actinomicetos - Solo – Mata Atlântica - Avaliação.  
3. Biologia do solo 4. Antibióticos 5. Antitumorais I.  
Vieira, José Daniel Gonçalves. II. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública III. Título.**

**CDU : 579.87: 631.46**  
**(213.54)**

"O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande"

Louis Pasteur

Ao meu querido Halissom Clever Sanches, por estar presente desde o início desta caminhada, pelo incentivo, carinho, por encorajar-me e especialmente por tornar possível a realização deste mestrado.

## AGRADECIMENTOS

**"Eu acredito que existam seres humanos especiais, como anjos terrenos que nos cercam com luz, força e sabedoria..."**

Agradeço aqui aos meus anjos visíveis:

Minha mãe, Nilma Maria Lima Vilela, pelo exemplo de dedicação e por ter me concedido parte dos seus genes, me fazendo tão semelhante a ti. Minha sobrinha Lavínia Vilela Lima Ferreira, por ser tão pequena e ao mesmo tempo irradiar tamanha luz que ilumina todos a sua volta. Meus avós Irani Peres Vilela e Lindomar Vilela de Moraes, exemplos de força, coragem, dedicação e meus exemplos de vida.

Meu orientador Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira, por ter aceitado a missão de conduzir este trabalho, pelos ensinamentos, paciência e principalmente bom-humor em todos os momentos, tornando extremamente agradável a convivência no Laboratório de Microbiologia Ambiental.

A Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta pela valiosa colaboração nas correções, oportunidades de aprendizado e pelos vários "puxões-de-orelha", que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Cleomenes Reis pelo carinho, pela experiência de vida, por ser tão amigável e solícito sempre que precisei de seus ensinamentos e por alegrar todos os meus dias com uma piada nova, conquistando a minha admiração.

Ao Prof. Dr. André Kipnis pelos conhecimentos compartilhados, pela cooperação, desprendimento, paciência, pela concessão do pUC19, auxílio na realização das técnicas moleculares e por estar sempre disposto a ajudar, mesmo desenvolvendo tantas atividades.

Ao Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini amigo-pai que adotei desde que o conheci, pessoa por quem tenho imensa admiração, carinho e respeito, principalmente por ser possuidor de um coração tão imenso, por ter sido o ombro que me acolheu nos momentos mais difíceis, por estar presente sempre que precisei, ouvindo meus lamentos, minhas indignações, meus sonhos e principalmente por ter feito tanto por mim que não existem palavras para expressar a minha eterna gratidão.

Aos professores da especialização e do mestrado pelos ensinamentos, carinho e incentivo: Wília Marta Diederichsen de Brito, Maria do Rosário Rodrigues Silva, Evandro Leão Ribeiro, Orionalda de Fátima Lisboa, Divina das Dores de Paula Cardoso, Regina Maria

Bringel Martins e Maria Cláudia Dantas P. B. André, quem me repassou os primeiros conhecimentos da microbiologia na graduação, servindo como exemplo. Quero expressar a minha gratidão e respeito a todos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Médica: a quase-irmã Renata Silva Pereira (Renatex), Lara Stefânia N. O. Leão (Larinha asséptica), Alessandra Marques Cardoso (Lelê), Ana Claudia Camargo Campos (Ana Fields), Cristyane Gonçalves Benício (Cris), Juliana Lamaro Cardoso (Ju), Frederico Mendes Machado Neto (Fred), Mirian Rodrigues, Patrícia Staciariini Anders (Paty Maionese), Thaís Teixeira Fernandes (Ta), Ana Beatriz Mori (Bia), Silvana Santiago, Geraldo Sant'ana da Cunha Júnior, Ana Cláudia, Juliana Rosa, Laurine Lacerda, Denise Gonçalves de Oliveira, Marina Eidt e Josirene Moreira dos Santos pelos favores prestados e períodos de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental: Fernando de Souza Vaz (Nando), Renata Melo Peixoto, Natália Carvalhares (Nat), Thais Maitan Vieira, Mariana Lima, Aysha Jussara Ivonilde Carrim, agradeço especialmente pelos momentos agradáveis e pelo auxílio na realização do trabalho.

As amigas de mestrado: Liana Jayme Borges, Luciana S. C. de Oliveira, Camila F. Alvarenga, pelos momentos de descontração e de desabafo que compartilhamos.

Aos amigos do IPTSP: Carla Atávila, Rodrigo Alessandro Tôgo e Marcos Gontijo da Silva por serem sempre tão gentis e solidários.

Aos funcionários e colaboradores do IPTSP: Leda Maria de A. Valadão, Vera Lúcia Penha, Aristides José Barbosa, Maria do Socorro da Silva (Socorrinho), José Clementino O. Neto (Zezinho), Kariny Vieira Soares, Fernando Koslowski, Maria Aparecida Leite Alves pelo profissionalismo, competência e acessibilidade.

A Keili Maria Souza pela disponibilidade, valiosa colaboração na parte molecular e pelo empréstimo da máquina fotográfica, a Prof. Dra. Ana Lúcia S. S. de Andrade pela concessão dos MRSA de origem comunitária, a Lindon Jonhnsom de Abreu Batista, pela prestatividade e pela triagem dos MRSA de origem hospitalar e ao Prof. Dr. José Realino de Paula pela colaboração e ajuda na produção dos extratos.

Ao PPGMT pela oportunidade e CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta dissertação fica aqui o meu muito obrigada...

## Sumário

Lista de quadros e tabelas.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstact.....	xv
 <b>1. Introdução.....</b>	 <b>01</b>
<b>2. Revisão de literatura.....</b>	<b>05</b>
2.1. Actinomicetos.....	06
2.1.1. Taxonomia.....	10
2.1.2. Actinomicetos no solo.....	12
2.1.2.1. Cerrado.....	15
2.1.2.2. Floresta Atlântica.....	17
2.1.3. Isolamento de actinomicetos.....	19
2.1.4. Síntese de metabólitos secundários.....	21
2.1.4.1 Antitumorais.....	25
2.1.4.2. Antibióticos.....	28
2.2. Estafilococos.....	32
2.2.1. Resistência aos antimicrobianos.....	34
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> metilino-resistentes (MRSA).....	37
2.3. Seleção de novas drogas.....	41
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>46</b>
<b>4. Material e métodos.....</b>	<b>48</b>
4.1. Isolamento dos actinomicetos.....	49
4.2. Identificação e susceptibilidade dos MRSA.....	51
4.2.1. População pediátrica.....	51
4.2.2. População hospitalar.....	52
4.2.3. Procedimentos manuais de identificação e teste de difusão de disco.....	52
4.2.4. Extração do DNA e detecção dos genes <i>mecA</i> e <i>femB</i> por PCR.....	53
4.3. Atividade antimicrobiana dos actinomicetos – Técnica dos <i>Plugs</i> .....	54
4.4. Produção da substância antibiótica e extração da substância bioativa.....	55
4.4.1. Extrato a partir do crescimento em meio sólido – ECS.....	55
4.4.2. Extrato a partir do crescimento em meio líquido – ECL.....	56



4.5. Atividade antimicrobiana dos extratos crus - Técnica de difusão em poço.....	57
4.6. Atividade citotóxica dos extratos crus.....	58
4.7. Efeito dos extratos na mobilidade do DNA em gel submetido à eletroforese....	60
4.7.1. Preparação do plasmídeo pUC19.....	60
4.7.2. Capacidade de intercalação dos extratos na molécula de DNA.....	61
<b>5. Resultados.....</b>	<b>62</b>
5.1. Isolamento dos actinomicetos.....	63
5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> metilino-resistentes .....	64
5.3. Atividade antimicrobiana dos actinomicetos.....	67
5.4. Atividade antimicrobiana dos extratos crus.....	70
5.5. Atividade citotóxica dos extratos crus.....	73
5.6. Intercalação dos extratos antibiótico na molécula de DNA.....	74
<b>6. Discussão.....</b>	<b>75</b>
6.1. Isolamento dos actinomicetos.....	76
6.2. <i>Staphylococcus aureus</i> metilino-resistentes (MRSA).....	78
6.3. Atividade antimicrobiana dos actinomicetos.....	79
6.4. Atividade antimicrobiana dos extratos crus.....	82
6.5. Atividade citotóxica dos extratos crus.....	83
6.6. Intercalação dos extratos na molécula de DNA.....	84
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>87</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>89</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>114</b>
I – Figuras referentes às metodologias.....	116
II - Composição química dos meios de cultura e reagentes.....	123
III - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	125
IV - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	127

## Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1	Números conhecidos e estimados de vírus, bactérias e fungos.....	21
Quadro 2	Antibióticos produzidos por actinomicetos.....	30
Quadro 3	Alvos dos antibióticos na célula bacteriana.....	32
Quadro 4	Data de aprovação de agentes antimicrobianos, detecção de resistência microbiana e mecanismos envolvidos.....	36
Quadro 5	Diluição inicial dos extratos crus e suas respectivas concentrações em porcentagem.....	58
Tabela 1	Total de morfoespécies de actinomicetos isolados por amostra de solo e afinidade química dos isolados.....	63
Tabela 2	Perfil de suscetibilidade dos isolados MRSA pelo método automatizado (MicroScan®).....	66
Tabela 3	Características macroscópicas do cultivo dos actinomicetos que inibiram <i>in vitro</i> o crescimento dos MRSA indicadores.....	67
Tabela 4	Comparação do diâmetro dos halos de inibição do crescimento dos MRSA gerados pelos actinomicetos em ágar AC e ISP-2. Técnica dos <i>Plugs</i> .....	69
Tabela 5	Comparação do diâmetro dos halos de inibição do crescimento dos MRSA gerados pelos extratos crus obtidos a partir do crescimento dos actinomicetos em meio sólido (ECS) e líquido (ECL). Técnica de Difusão em Poço.....	72
Tabela 6	Valores de Dosagem Letal Média (DL <sub>50</sub> ) para os extratos crus avaliados.....	73

## Lista de Figuras

Figura 1	Ciclo de vida dos membros do gênero <i>Streptomyces</i> .....	08
Figura 2	Regiões que constituem o Bioma Cerrado.....	16
Figura 3	Floresta Atlântica – área original e área atual.....	18
Figura 4	Relação entre precursores do metabolismo primário e produção de antibióticos.....	24
Figura 5	Processo de descoberta e produção de antibióticos a partir de produtos naturais microbianos.....	43
Figura 6	Padrão de resistência do isolado CA-MRSA3 pelo método de difusão de disco.....	64
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação dos genes <i>femB</i> e <i>mecA</i> pela técnica de PCR para os isolados MRSA.....	65
Figura 8	Características macroscópicas do cultivo de alguns actinomicetos isolados.....	68
Figura 9	Halos de inibição do crescimento do CA-MRSA5 produzido por cada actinomiceto avaliado pela técnica dos <i>plugs</i> .....	70
Figura 10	Halos de inibição do crescimento do HA-MRSA2 produzidos pelos extratos crus (ECL) dos actinomicetos avaliados pela técnica de difusão em poço.....	71
Figura 11	Perfil de migração do DNA em gel de agarose 0,7% submetido à eletroforese utilizando amostras de extratos crus (ECL) obtidos dos actinomicetos que apresentaram atividade antimicrobiana frente aos MRSA indicadores.....	74

**Lista de Abreviaturas**

AC	Ágar Amido Caseína
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA-MRSA	<i>Community-acquired MRSA</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COMPAV	Companhia Municipal de Pavimentação de Goiânia
CTAB	<i>Cetyltrimethyl Ammonium Bromide</i>
DAP	Ácido Diaminopimélico
DAUFPE	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
DERMU	Departamento Estradas e Rodagem do Município de Goiânia
DL <sub>50</sub>	Dosagem Letal Média
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo Trifosfato
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
ESBL	<i>Extended-spectrum</i> Beta Lactamase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Aceleração da Gravidade
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de Hidrogênio
HA-MRSA	<i>Hospital-acquired MRSA</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
ISP-2	Ágar <i>International Streptomyces Project</i>
Kb	Quilobase (10 <sup>3</sup> bases)

KCl	Cloreto de Potássio
LB	<i>Luria Broth</i>
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
pb	Pares de Bases
PBP	<i>Penicillins Binding Protein</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PIB	Produto Interno Bruto
rDNA	DNA ribossomal
rpm	Rotações por Minuto
SCC <sub>mec</sub>	<i>Staphylococcal Chromosome Cassete mec</i>
SDS	Sulfato Duodecil de Sódio
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
TSST	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin</i>
UC	Unidade de Conservação
ufc	Unidades Formadoras de Colônias
UNESCO	<i>United Nations Educational Scientific and Cultural Organization</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VISA	<i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>

## Resumo

**Introdução:** os actinomicetos compreendem um extenso e diverso grupo de bactérias filamentosas, gram-positivas, aeróbias e que apresentam um importante papel ecológico nos ciclos biogeoquímicos dos solos. Estes microrganismos são reconhecidos pela sua importância econômica como produtores de substâncias biologicamente ativas. A emergência de microrganismos como *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA) cada vez mais resistentes aos antimicrobianos atualmente em uso, bem como a detecção de resistência cruzada apresentada por linhagens celulares às drogas utilizadas na quimioterapia para o câncer, têm despertado um maior interesse pela busca de novas moléculas e atraído a atenção para os actinomicetos, devido ao seu potencial para produção de agentes antibióticos e antitumorais com importante aplicação na área médica. **Objetivos:** este trabalho analisou amostras de solo coletadas de regiões de Cerrado e Mata Atlântica com o objetivo de selecionar actinomicetos com habilidade para produzir substâncias que inibam o crescimento de MRSA, apresentem baixa citotoxicidade e com possibilidade de aplicação como antitumoral. **Metodologia:** os actinomicetos foram isolados pelo método quimiotático por afinidade pela xilose ou KCl, cultivados em ágar e caldo amido-caseína e ISP-2, a partir dos quais foram obtidos os extratos crus. Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as metodologias de *Plugs* e Difusão em Poço. A atividade citotóxica frente a *Artemia salina* foi determinada para os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana e avaliou-se também a capacidade dos extratos em intercalar na molécula de DNA. **Resultados:** um total de 50 isolados foram obtidos das amostras de solo processadas e 7 (14,0%) apresentaram atividade antimicrobiana frente aos MRSA indicadores, sendo 6 (12,0%) obtidos de solos de Cerrado. Observou-se que os actinomicetos demonstraram maior afinidade química pela xilose e melhores resultados de produção micelial e atividade antimicrobiana em meio amido-caseína. Somente o extrato cru obtido do isolado PEG3 apresentou-se citotóxico em baixa concentração e os extratos obtidos dos isolados RKX3, RKX13 e RKF8 mostraram grande poder de intercalação na molécula de DNA. **Conclusões:** os resultados indicam um grande potencial dos actinomicetos isolados de solos de Cerrado como produtores de moléculas bioativas, que apresentaram baixa toxicidade, com capacidade para inibir o crescimento de MRSA e possível atuação antitumoral.

## Abstract

**Introduction:** actinomicetes comprise an extensive and diverse group of gram-positive, aerobic, filamentous bacteria that play an important ecological role in soil cycles. Many are well known for their economic importance as producers of biologically active substances. The emergency of microorganisms such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) increasingly more resistant to the antimicrobial nowadays in use, as well as the cross-resistance detection presented for cellular lineages to the drugs used in cancer's chemotherapy, have been awaking a larger interest by the new molecules search and attracted the attention for actinomicetes, due its potential for antibiotic and antitumor production with important applications in the medical area. **Objective:** this work analyzed soil samples collected from Cerrado and Atlantic Forest locations with the purpose of screening actinomicetes with: ability to produce substances that inhibit MRSA's growth, low citotoxicity, and application as antitumor substance. **Methods:** actinomicetes were isolated by the quimiotatic method for affinity to xilose or KCl, cultivated in agar and broth starch-casein and ISP-2, from which the crude extracts were obtained. For evaluation of antimicrobial activity plugs and well diffusion techniques were used. The citotoxic activity on *Artemia salina* was determined for the isolates that presented antimicrobial activity as well as their capacity to insert in DNA molecule. **Results:** a total of 50 isolates were obtained from the analyzed soil samples and seven (14,0%), of wich six (12,0%) were obtained from Cerrado soils, presented antimicrobial activity against MRSA indicators. These isolates demonstrated larger chemical affinity to xilose and micelial production as well antimicrobial activity showed best results in starch-casein medium. Only the crude extract of PEG3 had citotoxicity in low concentration and the extracts obtained from the isolates RKX3, RKX13 and RKF8 presented capacity to insert in the DNA molecule. **Conclusion:** the results show a great potential of actinomicetes isolated from Cerrado soils as antibiotic producers, with low toxicity, and capacity to inhibit MRSA's growth and with possible antitumor performance.