

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Márcia Nieves Carneiro da Cunha

**Seleção de actinomicetos isolados de líquens da região Amazônica
produtores de inibidores de β -lactamases e sua atividade
antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina**

Recife, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Márcia Nieves Carneiro da Cunha

**Seleção de actinomicetos isolados de líquens da região Amazônica
produtores de inibidores de β -lactamases e sua atividade
antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiana Souza Porto

Recife, 2010

Ficha catalográfica

C972s Cunha, Márcia Nieves Carneiro da
Seleção de actinomicetos isolados de líquens da Região
Amazônica produtores de inibidores de β -lactamases e sua
atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina /
Márcia Nieves Carneiro da Cunha. – 2010.
79 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal), -
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2010.
Inclui referências e anexo.

1. Inibidor de β -lactamases, 2. Atividade antimicrobiana
3. Mastite bovina, 4. Actinomicetos, I. Porto, Ana Lúcia
Figueiredo, orientadora, II. Título

CDD 636.089601

MÁRCIA NIEVES CARNEIRO DA CUNHA

Seleção de actinomicetos isolados de líquens da região Amazônica produtores de inibidores de β -lactamases e sua atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM: 25 de fevereiro de 2010

PRESIDENTE: **Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto** - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

EXAMINADOR EXTERNO: **Prof. Dr. Attilio Converti** – Departamento de Engenharia Química da Universidade de Genova-Itália

EXAMINADOR EXTERNO: **Profa. Dra. Janete Magali de Araújo** – Departamento de Antibióticos -UFPE

EXAMINADOR EXTERNO: **Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares** - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

SUPLENTE: **Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara** - Departamento de Química - UFRPE

DEDICO

A minha mãe Maria das Neves, minha grande incentivadora, por todo amor e apoio a mim oferecidos nos bons e maus momentos da minha vida. Mainha eu te amo, obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que ilumina meus dias, por ter me dado força nos momentos de fraqueza, calma nos momentos de desespero, saúde, sabedoria e conforto para a execução deste trabalho.

Ao Painho e a Mainha pela paciência, atenção e amor dedicados a mim, sem os quais seria quase impossível chegar onde estou.

A minha família, por todo o apoio e confiança.

Ao meu tio Luiz Claudio e a minha tia Eliete, por toda ajuda oferecida

A minha querida avó Juracy e ao meu tio Roberto pelo auxílio oferecido nas primeiras etapas da minha caminhada até aqui.

Aos amigos, que se fizeram sempre presentes durante esta caminhada.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, por acreditar em meu potencial, pelo carinho, dedicação e incentivo fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A Profa. Dra. Tatiana Souza Porto, pela co-orientação, por seus valiosos ensinamentos, pela paciência, amizade e principalmente pela calma transmitida nos momentos de desespero, quando tudo parecia estar errado. Obrigada Tati!

As Profa. Dra. Janete Magali de Araújo, Maria Francisca Simas e ao Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota por cederem os microrganismos utilizados neste estudo.

Ao apoio financeiro do CNPQ, e as bolsas de estudo oferecidas pela CAPES e da FACEPE.

Ao Professor Jose Luiz de Lima Filho, diretor do LIKA, por ter permitido que fossem utilizadas as instalações e equipamentos possibilitando parte da execução deste projeto.

Aos amigos do grupo de pesquisa Ana Porto, por todas as experiências trocadas e pelo convívio alegre e descontraído, Valeu!!!

Aos funcionários do LIKA, que tanta ajuda prestaram ao longo da execução deste trabalho.

À Dra. Daniela de Araújo Marques e a Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira pelas sugestões oportunas que acrescentaram muito ao trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação pelos momentos de estudo e dedicação durante a obtenção dos créditos

Aos professores da Pós-Graduação, pela ajuda e conhecimentos repassados ao longo do curso de Mestrado em Biociência Animal.

A todas as pessoas aqui não mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho. Obrigada!!!

RESUMO

A mastite bovina é uma das principais enfermidades que acometem os rebanhos leiteiros no mundo, sendo considerada um obstáculo à sua exploração lucrativa. As maiores perdas causadas pela mastite são devidas à diminuição na produção de leite, depreciação na qualidade nutritiva, custo de tratamento, custo de atendimento veterinário e laboratorial e perdas no potencial genético. Vários microorganismos são citados como agentes etiológicos da mastite bovina sendo que as espécies mais frequentemente isoladas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Os antibióticos β -lactâmicos são importantes agentes antibacterianos, porém sensíveis às enzimas β -lactamases, capazes de clivar o anel β -lactâmico, tornando-os inativos. Os inibidores de β -lactamases são uma alternativa para o tratamento de doenças causadas por bactérias resistentes à penicilina. Neste estudo foi avaliada a capacidade de produzir inibidores de β -lactamases por 71 actinomicetos isolados de líquens da Região Amazônica e sua atividade antimicrobiana utilizando *Staphylococcus aureus*, resistentes à penicilina, isolados de mastite bovina. A seleção dos actinomicetos que produziram inibidores de β -lactamases foi realizada através da técnica de bloco de gelose contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 e os actinomicetos selecionados foram testados contra *Staphylococcus aureus* resistentes. Os melhores produtores de inibidores de β -lactamases foram *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e *Nocardia* sp DPUA 1571, os quais foram submetidos a cultivo submerso para o estudo da curva de crescimento, pH e atividade antimicrobiana. Os maiores halos de inibição, utilizando *S. aureus*, foram obtidos após 96 horas de cultivo tanto para *Nocardia* sp (13,5 e 12,0 mm) como para *Streptomyces* sp. (8,0 e 14,0 mm) com os testes-difusão nos discos e poços, respectivamente. *Nocardia* sp DPUA 1571 foi utilizado na produção de inibidores de β -lactamases por planejamento fatorial onde a influencia de três variáveis foi avaliada: concentrações da fonte de carbono (0,5, 1,0 e 1,0%), concentrações de fonte de nitrogênio (1,0, 2,5 e 4,0%) e pH (6,0, 6,5 e 7,0). A produção ocorreu em Erlenmeyers de 250mL contendo 100mL do meio de cultivo MS-2 modificado de acordo o modelo experimental, os frascos foram incubados em agitador orbital (200 rpm) a 28°C por um período de 120 horas e a cada 24 horas, alíquotas de 5mL foram retiradas e centrifugadas a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C, para a

determinação da atividade biológica e peso seco. A atividade biológica do líquido metabólico foi realizada através da técnica de difusão em disco e poço, nas melhores condições de cultivo (ensaio 3) com concentração da fonte de carbono de 1,0%, concentração do filtrado de soja de 1% e o pH 6,0, foram obtidos halos de inibição de até 22mm de diâmetro frente aos microrganismos teste utilizados. Os resultados permitiram concluir, que os actinomicetos isolados de líquens da Região Amazônica são uma fonte promissora de inibidores de β -lactamases, com potencial para aplicação futura na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Inibidores de β -lactamases, Mastite, Actinomicetos, *Staphylococcus aureus*, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Bovine Mastitis is one of the main diseases that affect the dairy herds in the world and is considered one of the greatest obstacles to their operation profitable. The greatest losses from mastitis are due to the decrease in milk production, depreciation in nutritional quality, treatment cost, cost of veterinary care and laboratory losses in genetic potential. Several microorganisms are cited as agents of bovine mastitis and the species most frequently isolated are *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*. The β -lactam antibiotics are important antibacterial agents, but sensitive to β -lactamase enzymes capable of cleaving the β -lactam ring, rendering them inactive. Inhibitors of β -lactamases are an alternative for diseases treatment caused by resistant-penicillin bacteria. This study evaluated the ability to produce β -lactamase inhibitors by 71 actinomycetes isolated from lichens of the Amazonian and its antimicrobial activity using *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant isolates of bovine mastitis. The selection of actinomycetes that produced β -lactamases inhibitors was performed using the agar block technique against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 and selected actinomycetes were tested against *Staphylococcus aureus* penicillin resistant. The best producers of β -lactamase inhibitors were *Streptomyces* sp. DPUA 1542 and *Nocardia* sp DPUA 1571, which were subjected to submerged cultivation in the study of the growth curve, pH and antimicrobial activity. The largest inhibition zones using *S. aureus*, were obtained after 96 hours of culture for both *Nocardia* sp (13.5 and 12.0 mm) and for *Streptomyces* sp. (8.0 and 14.0 mm) with diffusion-tests on the discs and wells, respectively. *Nocardia* sp DPUA 1571 was used in the production of inhibitors of β -lactamases by factorial design where the influence of three variables: concentrations of carbon source (0.5, 1.0 and 1.0%), concentrations of nitrogen source (1.0, 2.5 and 4.0%) and pH (6.0, 6.5 and 7.0) were evaluated. The production carried out in 250mL flasks containing 100mL of culture medium MS-2 modified according to the experimental design, the flasks were incubated in an orbital shaker (200 rpm) at 28 ° C for 120 hours and each 24 hours, aliquots of 5 mL were withdrawn and centrifuged at 5000 rpm for 20 minutes at 4 ° C for the study of biological activity and dry weight. The biological activity of the liquid assay was performed using the diffusion-tests on the discs and wells, the best cultivate conditions (test 3) with concentration of carbon

source of 1.0% concentration of the soy bean flour 1% and pH 6,0, were obtained from the inhibition of up to 22mm diameter test against microorganisms used. The results showed that the actinomycetes are a promising source of β -lactamase inhibitors, demonstrated the potential application to pharmaceutical industry.

Key Words: β -lactamase inhibitors, Actinomycetes, antimicrobial activit
Staphylococcus aureus, bovine mastitis

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XV
1.0 INTRODUÇÃO	15
1. INTRODUÇÃO	16
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Mastite Bovina</i>	19
2.1.1 Classificação das Mastites	19
2.1.2. Mastite Bovina causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.3 Tratamento das Mastites Bovinas.....	22
2.2 <i>Produção de Antibióticos</i>	22
2.3 <i>Actinomicetos</i>	23
2.4 <i>Resistência Bacteriana</i>	24
2.5 <i>Inibidores de β-lactamases</i>	26
3.0 OBJETIVOS.....	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	30
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	30
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPITULO I	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÕES	45
AGRADECIMENTOS	45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPITULO II	54
RESUMO	55
ABSTRACT	56
INTRODUÇÃO	56
MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
Anexo I.....	76

LISTAS DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura química de inibidores de β -lactamases mais utilizados na clínica médica (Venkatesan et al., 2004).....24

CAPITULO I

Figura 1. Curva de crescimento e de pH do *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e do *Nocardia* sp. DPUA 1571 cultivados no meio MS-2 em agitador orbital (200rpm) a 28°C por 144 horas.....53

CAPITULO II

Figura 1. Gráfico de Pareto da produção de inibidores de β -lactamases por *Nocardia* sp . DPUA 1571 tendo como variável resposta a biomassa.....64

Figura 2- Gráfico de Pareto da produção de inibidores de β -lactamases por *Nocardia* sp . DPUA 1571 para a variável resposta atividade antimicrobiana (halos de inibição) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 após 120 horas de cultivo.....65

Figura 3. Gráfico da atividade antimicrobiana frente à *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 em diferentes níveis de pH, concentração de farinha de soja e concentração de glicerol de acordo com o planejamento fatorial descrito na Tabela 2.....66

Figura 4- Gráfico de Pareto da produção de inibidores de β -lactamases por *Nocardia* sp . DPUA 1571 para a variável resposta atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina após 120 horas de cultivo.....67

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Combinações de β -lactâmicos/inibidores de β -lactamases utilizados clinicamente (Williams, 1999).....	28
---	----

CAPITULO I

Tabela 1. Atividade antimicrobiana expressa por halos de inibição produzidos pelos actinomicetos frente a <i>K.pneumoniae</i> para seleção dos produtores de inibidores de β -lactamases pela técnica do bloco de gelose.....	49
--	----

Tabela 2. Atividade antimicrobiana expressa por halos de inibição (mm) apresentados pelos actinomicetos frente aos <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina através da técnica do bloco de gelose.....	50
--	----

Tabela 3. Atividade antimicrobiana apresentadas pelo <i>Streptomyces sp.</i> (DPUA 1542) e <i>Nocardia sp.</i> (DPUA 1571), expressas por halos de inibição (em mm) frente aos microrganismos testes <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de mastite bovina através da técnica de difusão em disco e poço.....	51
---	----

CAPITULO II

Tabela 1. Níveis dos fatores utilizados no estudo das melhores condições de cultivo dos inibidores de β -lactamases.....	60
---	----

Tabela 2. Resultados do planejamento fatorial 2^3 para a produção de inibidores de β -lactamases.....	62
--	----

Tabela 3. Concentração de glicerol e valores de peso seco no cultivo de <i>Nocardia sp.</i> DPUA 1571 em comparação com halos de inibição apresentados para os microrganismos teste utilizados (<i>K. pneumonie</i> DPUA 1571 e <i>S. aureus</i>) utilizando a técnica de difusão em disco no ensaio 3 (concentração de glicerol 1,0%; filtrado de soja 1% e pH 6,0).....	63
--	----

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima do líquido metabólico produzido por <i>Nocardia sp.</i> DPUA 1571 após 120 horas de cultivo.....	68
---	----

1.0 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, a qual frequentemente tem origem bacteriana, mais de 80 diferentes espécies de microrganismos foram identificadas como agentes causadores de mastite bovina (HOLTENIUS, 2004). Estimativas feitas em vários países indicam perdas na ordem de 10% a 15% da produção de leite e derivados devido à doença, sendo a redução na produção total representada principalmente pela forma subclínica, pois sua prevalência é maior que a da forma clínica. Os prejuízos com a mastite no Brasil representam diminuição na produção de 30% e 70%, atribuídos às formas clínica e subclínica da doença, respectivamente (SANTOS, 2006).

Staphylococcus aureus destaca-se como o microrganismo de grande importância na incidência de mastite nos rebanhos leiteiros mundiais (ZECCONI; HAHN, 2000). A maioria das amostras de estafilococos tem se tornado resistente a múltiplos antibióticos, incluindo β -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, mupirocina e outros (SANTOS, 2006).

O tratamento antibiótico é uma alternativa recomendada para reduzir a infecção intramamária e, conseqüentemente, a prevalência da mastite no rebanho (BRITO; BRITO, 1998). Entretanto, o nível de resistência de muitos microrganismos a drogas antimicrobianas tem aumentado consideravelmente tornando-se um fator preocupante no controle de mastites bovinas.

A utilização de antibióticos no combate a doenças provocadas por bactérias tem encontrado problemas devido ao aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos mais comumente utilizados, os pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos (NETO, 2004). Essa resistência se dá principalmente pela produção das enzimas β -lactamases, as quais hidrolizam o anel β -lactâmico dos antibióticos desativando penicilinas e cefalosporinas (BEHARRY, 2004).

O uso indiscriminado dos antibióticos acoplado com a mudança dos elementos genéticos que codificam todas as classes de enzimas β -lactamases dificulta as terapias atuais de combate às infecções bacterianas e promove a resistência bacteriana aos compostos β -lactâmicos. Conseqüentemente, se torna necessário desenvolver novos antibacterianos (BEHARRY, 2004). A fim de superar

esta resistência, diversas combinações antibióticas de inibidores de β -lactamases / β -lactâmicos estão sendo utilizadas atualmente na área clínica (VENKATESAN et al., 2004).

Três inibidores de β -lactamases estão sendo utilizados em uso clínico associados com β -lactâmicos: ácido clavulânico; sulbactam e o tazobactam. (LYNCH; YANG, 2004). O principal inibidor de β -lactamase utilizado clinicamente é o ácido clavulânico que é produzido industrialmente por culturas submersas do actinomiceto *Streptomyces clavuligerus*. Os actinomicetos são de grande valor para a biotecnologia, pois, são fontes de vários metabólitos secundários de interesse industrial, em particular os antibióticos (CHATER, 2006).

Tendo em vista a necessidade de obtenção de novos compostos antimicrobianos e fármacos de importância biotecnológica, tais como os inibidores de β -lactamases, que vêm se mostrando eficientes no combate a doenças provocadas por bactérias resistentes a antibióticos, a exemplo das mastites bovinas. O objetivo deste trabalho foi selecionar actinomicetos isolados de líquens da região Amazônica produtores de inibidores de β -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina de rebanhos do Estado de Pernambuco.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mastite Bovina

A mastite é consequência da interação de fatores relacionados ao animal, patógenos e ambiente (BRITO; BRITO, 2000). A mastite é definida como uma inflamação no parênquima da glândula mamária promovida por diferentes fatores, tais como, agressões físicas, químicas, térmicas ou microbianas (TOZZETI et al., 2008). No entanto, cerca de 90% das mastites são causadas por infecções bacterianas (RIBEIRO et al., 2003). Mais de 80 diferentes espécies de microrganismos foram identificadas como agentes causadores de mastites, as espécies mais frequentemente isoladas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (HOLTENIUS, 2004). Dentre as espécies comumente isoladas nas mastites bovinas o *Staphylococcus aureus* assume um papel de destaque como agente etiológico causador da doença (CARDOSO et al., 2000).

A mastite é uma doença que causa muitos prejuízos, estima-se que, mundialmente as perdas anuais causadas pela doença são por aproximadamente 35 bilhões de dólares (BENEDETTE et al., 2008). A principal perda econômica causada pela mastite bovina resulta da redução na produção de leite e produtos derivados, levando ainda a perdas devido ao descarte prematuro de vacas, custos com drogas e com serviços veterinários (RADOSTIS et al., 2002). A mastite provoca ainda problemas de saúde pública devido a alterações na composição do leite (ZADOKS, 2004).

2.1.1 Classificação das Mastites

Conforme sua forma de manifestação, a mastite pode ser dividida em dois grupos; a forma clínica e a forma subclínica. A forma clínica apresenta como sinais evidentes, edema, hipertemia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou alterações das características do leite. No caso das formas clínicas, o diagnóstico pode ser realizado pelo uso da caneca de fundo preto ou telada onde visualizam-se as alterações macroscópicas do leite (RIBEIRO et al., 2003).

Enquanto que na mastite subclínica não existem alterações visíveis relacionadas ao aspecto do leite ou do úbere, esta forma se caracteriza por alterações não evidentes na composição do leite, entre as principais alterações destaca-se o aumento no número de células somáticas (CSS), o aumento nos teores de proteínas séricas, diminuição do percentual de caseína, lactose, gordura e cálcio total do leite (TOZZETTI et al., 2008). Células somáticas são todas as células presentes no leite, que incluem as células originárias da corrente sanguínea como leucócitos e células de descamação do epitélio glandular secretor. Na secreção láctea de vacas com infecção intramamária, ocorre um aumento no número de células de defesa passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos, linfócitos e o número de células epiteliais permanece inalterado (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

A mastite subclínica pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite. Estas são compostas basicamente por dois tipos de células principais; células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue, sendo que estas se apresentam com elevadas concentrações nos casos de mastite (RIBEIRO et al., 2003)

Na forma subclínica os prejuízos econômicos são maiores, levando-se em consideração a sua frequência nos rebanhos e o longo período de infecção inaparente (DIAS, 2007). A contínua ação dos microrganismos sobre a mucosa, durante uma ou várias lactações provoca a perda progressiva do epitélio secretor, reduzindo a produção láctea (SOMMERHAUSER et al., 2003).

As mastites podem ainda serem classificadas em dois grandes grupos, ambientais e contagiosas, de acordo com o tipo de microrganismo causador da maioria das infecções no rebanho (DIAS, 2007).

A mastite ambiental geralmente ocorre no período entre as ordenhas, podendo também ocorrer novas infecções no período das ordenhas, é de fácil disseminação colocando em risco todas as categorias de animais: vacas em lactação, vacas secas e novilhas (BEAUDEAU et al., 2002).

A mastite contagiosa caracteriza-se pela alta incidência de casos subclínicos de longa duração ou crônicos e apresentam alta contagem de células somáticas

(CCS). A mastite contagiosa é causada por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície dos tetos, sendo a ordenha a maior forma de transmissão desta forma da doença (ESSELEMONT; KOSSAIBATI, 2002).

Staphylococcus aureus destaca-se como o microrganismo de grande importância na incidência de mastite infecciosa nos rebanhos leiteiros mundiais, e em função de sua elevada resistência aos antibióticos, seu tratamento torna-se difícil (ZECCONI; HAHN, 2000).

2.1.2. Mastite Bovina causada por *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é reconhecido como o principal patógeno da mastite bovina e seus principais sítios de localização nos animais são os quartos infectados, portanto a sua transmissão se dá geralmente entre vacas durante a ordenha (ZAFALON et al., 2008). O *S. aureus* tem sido o agente mais frequentemente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas (BRITO et al., 1999).

Para o diagnóstico da mastite o teste de produção de coagulase em tubo é empregado para classificar os *Staphylococcus* em dois grupos; os coagulase-positivos e os coagulase-negativos. O *S. aureus* apresenta hemólise incompleta em ágar sangue e resultado positivo para o teste de coagulase em tubo após quatro horas de incubação (HARMON et al., 1990). Entretanto ainda é recomendado um teste adicional para diferenciar as espécies coagulase-positivas que é a produção de acetoina a partir de glicose ou piruvato, o *S. aureus* apresenta resultado positivo para o teste em questão (BRITO et al., 2002).

A produção da coagulase pelo *S. aureus* constitui um importante determinante fenotípico, uma vez que está associado à virulência destes microrganismos. Estudos correlacionam a produção de enterotoxinas com a presença de enzimas como a coagulase (ZAFALON et al., 2008).

Um dos fatores considerados para o controle das mastites é a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos. O *S. aureus* de origem humana podem apresentar resistência à penicilina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, cefalotina, cloranfenicol, sulfametoxazol, ciprofloxacina e clindamicina (TEXEIRA et al., 1995).

Desta forma torna-se necessário o conhecimento de novas estratégias que atuem como alternativas para o controle da mastite bovina.

2.1.3 Tratamento das Mastites Bovinas

O tratamento das mastites é uma das medidas preconizadas para o seu controle, além de prevenir a morte dos animais, atua no retorno à composição e produção normal do leite (CULLOR, 1993). O tratamento a ser seguido nas mastites clínicas e subclínicas deve diferir de acordo com a intensidade da infecção (ALMEIDA, 2005).

A eficácia clínica de um antimicrobiano é de quantificação muito difícil, porque há grandes variações na resposta individual e do rebanho, por causa do tipo de microrganismo envolvido, localização dos sítios infectados, grau de endurecimento da glândula mamária, duração da infecção e outros fatores indefinidos (REBHUM, 2000).

A antibioticoterapia atua como prevenção da mortalidade nos casos hiperagudos, o retorno da composição e produção normal de leite, a eliminação das fontes de microrganismos invasores. Tradicionalmente utiliza-se a via de administração intramamária, numa tentativa de aumentar a concentração do agente quimioterápico no local ativo da infecção (REBHUM, 2000).

O método via intramamária de agentes antimicrobianos para o tratamento de mastite clínica ou subclínica é também a preferida, pela indústria do leite, permitindo aplicações de pequenas quantidades de agentes antimicrobianos diretamente no local da infecção (SMITH, 1994). Entretanto, o alto custo e a resistência bacteriana a esses compostos vêm dificultando o tratamento das mastites por métodos convencionais, este fato sugere a necessidade de se estudar novos antibióticos com eficácia no tratamento das mastites bovinas.

2.2 Produção de Antibióticos

Dos produtos tradicionais obtidos por processos fermentativos, um dos mais importantes são os metabólitos secundários, nos quais se destacam os antibióticos, compostos químicos que têm a capacidade de destruir, inibir a ação ou crescimento de outros microrganismos (TEODORO, 2003). Antimicrobianos são compostos com

a mesma função, porém podem também ser de origem sintética. O uso destes termos não segue exatamente esta definição, podendo ser usados como sinônimos (CHAMBERS, 2003). Os antimicrobianos são agrupados em classes de acordo com sua estrutura química e mecanismo de ação. A estrutura molecular define os mecanismos de ação. Podemos dividir os antimicrobianos em dois grandes grupos: β -lactâmicos e não- β -lactâmicos (ANDREAZZI; ROSSI, 2005).

A descoberta de novos compostos antimicrobianos tem muito sucesso quando são utilizados produtos naturais de origem microbiana, sobretudo actinomicetos e fungos, e esses produtos são normalmente metabólitos secundários (PELÁEZ, 2006).

Uma comprovação de que os produtos naturais são a melhor fonte de pesquisa de antibióticos é que nos últimos 30 anos, somente as oxazolidinones são de origem totalmente sintética (OVERBYE; BARRETT, 2005). Os actinomicetos têm sido o grupo de organismos mais bem sucedido na busca de compostos antimicrobianos, inclusive modelos matemáticos sugerem que o número de antibióticos a serem descobertos a partir do gênero *Streptomyces* pode ser maior que 10^5 (PELÁEZ, 2006; WATVE et al., 2001).

2.3 Actinomicetos

As bactérias da ordem Actinomycetales são denominadas genericamente por actinomicetos, apresentam características específicas, tais como: sensibilidade às lisozimas e agentes antibacterianas; apresentam crescimento de colônias cartilaginosas, filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas com diâmetro entre 0,5 a 2,0 μm , tipicamente ramificados e denominados micélios; e reprodução por fragmentos das hifas ou por produção de esporos assexuados em áreas especializadas do micélio (BERGEY'S MANUAL, 2001).

Os actinomicetos possuem uma morfologia que superficialmente assemelham-se à dos fungos filamentosos; no entanto, os filamentos dos actinomicetos consistem de células muito menores que a dos fungos filamentosos (TORTORA et al., 2000). São bactérias Gram positivas encontradas, sobretudo no solo, estima-se que cada grama de solo contenha 10^6 - 10^9 células dessas bactérias.

Os actinomicetos podem ainda estar presentes nos mais diversos ambientes, como águas, plantas e até mesmo em associação com líquens (GONZÁLEZ et al., 2005).

Estas bactérias se caracterizam por apresentar alta diversidade morfológica e metabólica, a diversidade morfológica dos actinomicetos pode ser exemplificada primariamente, pelas suas estratégias reprodutivas que levam a formação de uma variedade de estruturas de esporos, como: artrósporos, característicos de *Streptomyces*; endósporos, dos *Thermoactinomyces*; aleuriósporos, das *Micromonospora* e os zoósporos móveis dos membros dos *Actinoplanaceae*, assim como *Oerskovia*, *Geodermatophilus* e *Kitasatoa* (ENSIGN, 1978).

Um exemplo da sua diversidade de metabólitos é a produção de antibióticos produzidos principalmente, por seu metabolismo secundário no final da fase exponencial do ciclo de crescimento. Os actinomicetos são notáveis por sua produção de antibióticos (AL-ZAHRAMI, 2007). Segundo Sato (2001) das substâncias antimicrobianas conhecidas, os actinomicetos produzem 4.600, enquanto fungos produzem 1.600, e outras bactérias produzem apenas 950. Várias substâncias usadas em medicina humana e veterinária, tetraciclina, estreptomicina, avermectinas, e ionóforos com efeitos sobre bactérias e, endo e ectoparasitos são produzidas pelos actinomicetos. Existe uma grande variedade em estrutura e número de antibióticos que são encontrados nas substâncias produzidas por actinomicetos, especialmente os do gênero *Streptomyces*.

2.4 Resistência Bacteriana

A descoberta das sulfonamidas e da penicilina parecia ter acabado como problema das infecções bacterianas. Entretanto, já no início do século passado apareceram linhagens de *Streptococcus pyogenes* em hospitais militares que não respondiam mais ao tratamento com sulfas e nos anos 40 isolados de *Staphylococcus aureus* se mostraram resistentes à penicilina em hospitais de Londres (LEVY; MARSHALL, 2004).

O homem passou a conhecer e a se preocupar com as bactérias resistentes aos antibióticos. A utilização de antibióticos no combate a doenças provocadas por bactérias tem encontrado problemas devido ao aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos mais comumente utilizados, os pertencentes ao

grupo dos β -lactâmicos (NETO, 2004). Os antibióticos β -lactâmicos inibem o crescimento das bactérias ao interferir na síntese da parede celular bacteriana (KATZUNG, 2005).

Os mecanismos de resistência bacteriana dependem de vários fatores que podem ser inter-relacionados ou não e são divididos em quatro tipos diferentes. A inativação enzimática é um mecanismo relacionado com a produção de diferentes tipos de enzimas capazes de neutralizar a droga ou os efeitos antimicrobianos da mesma, como as β -lactamases. A alteração da permeabilidade da membrana ocorre devido a alteração na expressão dos canais de porina, modificando assim a penetração e conseqüente ação de diferentes antibióticos. O efluxo ativo de antibióticos é o mecanismo que dispõe de uma bomba de efluxo estas são proteínas integrantes da membrana plasmática bacteriana (PIDDOCK, 2006), e possuem a capacidade de expulsar ativamente os antibióticos para fora da célula, contribuindo para uma concentração inadequada da droga. A alteração do sítio de ligação do antibiótico impede que ele se ligue efetivamente ao seu sítio alvo, impedindo a sua atuação. Esta alteração diminui a afinidade da droga pelo sítio e faz com que haja perda da atividade antimicrobiana (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A produção de β -lactamases constitui o mecanismo mais comum de resistência bacteriana. Foram identificadas mais de 300 β -lactamases diferentes. Algumas delas como as produzidas por *Staphylococcus aureus* apresentam especificidade de substrato relativamente baixa, hidrolizando apenas as penicilinas e não as cefalosporinas. Outras β -lactamases como as produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* e por espécies *Enterobacter*, possuem um amplo espectro e são conhecidas como beta-lactamases de amplo espectro (Extended-Spectrum Beta-Lactamase - ESBL), são capazes hidrolizar tanto as penicilinas como as cefalosporinas (KATZUNG, 2005).

O número de antibióticos em pesquisas científicas diminuiu drasticamente nos últimos anos, enquanto a resistência às drogas antimicrobianas tem crescido de forma inexorável. Em 2002 foi descrita nos EUA a primeira cepa de *Staphylococcus aureus* totalmente resistente a vancomicina. Cepas produtoras de β -lactamases de espectro ampliado, conhecidas como ESBL, capazes de inativar cefalosporinas de terceira e quarta geração, passaram também a ser preocupação mundial. No Brasil

a prevalência de linhagens ESBL é bastante expressiva em diferentes centros, podendo exceder 50% quando relacionada ao gênero *Klebsiella* (ANDREAZZI; ROSSI, 2005). Estratégias para inativar essas enzimas têm assumido uma importância crítica na área médica (BETHEL et al., 2004).

2.5 Inibidores de β -lactamases

As β -lactamases são enzimas serino-dependentes produzidas por bactérias em defesa a todas as classes de antibióticos, como, as penicilinas, cefalosporinas, carbapênicos e monobactâmicos. São enzimas que hidrolizam a amida cíclica da molécula β -lactâmica (WILLIAMS, 1999). Baseado nas variações da seqüência de aminoácidos, as enzimas β -lactamases foram divididas nas classes A, B, C, e D (BUSH; JACOBY, 1995; BUSH, 1999). O número de enzimas β -lactamases descritos recentemente está aumentando exponencialmente, conforme mais enzimas plasmídeos-codificadas são identificadas e dados adicionais da seqüência dos genomas bacterianos e dos isolados clínicos são descobertos (BUSH et al., 1995).

A identificação de mais de 340 enzimas β -lactamases diferentes apresenta um desafio significativo no tratamento das infecções bacterianas (LEE, et al., 2003). Uma proposta para contornar esse problema é a utilização de um inibidor de β -lactamases juntamente com um antibiótico β -lactâmico (NETO, 2004).

Os inibidores de β -lactamases podem ser classificados como reversíveis e irreversíveis. Os inibidores reversíveis como a cloxacilina retardam a hidrólise do β -lactâmico associado a ela, e a enzima ativa é rapidamente regenerada do complexo enzima-inibidor. Dentre os inibidores de β -lactamases irreversíveis, encontram-se os mais efetivos desde que sejam hábeis para inativar a enzima por períodos extensos. Os inibidores utilizados clinicamente pertencem a este grupo, tais como as penicilinas sulfonas (sulbactâmico, tazobactâmico, e seus derivados) e o ácido clavulânico, produzido por *Streptomyces clavuligerus* (MILER et al., 2001).

Os inibidores de β -lactamases mais utilizados clinicamente são de três tipos: ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, assemelham-se morfológicamente a moléculas β -lactâmicas (Figura 1). Embora tenham ação antibacteriana muito fraca,

são potentes inibidores de muitas das β -lactamases bacterianas, de modo que são capazes de proteger as penicilinas hidrolisáveis contra a inativação por essas enzimas. Os três inibidores diferem levemente quanto à sua farmacologia, estabilidade, potência e atividade, porém essas diferenças possuem pouca importância terapêutica (KATZUNG, 2005).

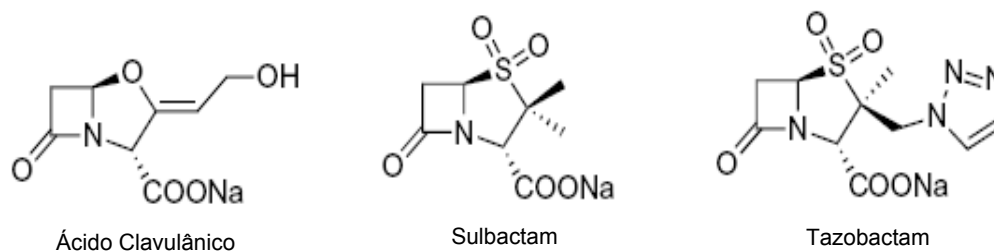


Figura 1. Estrutura química de inibidores de β -lactamases mais utilizados na clínica médica (Venkatesan et al., 2004).

Os inibidores de β -lactamases são mais ativos contra β -lactamases da classe A, os quais são codificadas por plasmídios e são as mais frequentemente encontradas, como as produzidas por *Staphylococcus*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, e *K. pneumoniae* (KATZUNG, 2005).

Os inibidores de β -lactamases são utilizados em uso clínico associados com β -lactâmicos, cinco combinações de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase estão comercialmente disponíveis para tratamento de algumas infecções (Tabela 1)

A combinação de um β -lactâmico com um inibidor de β -lactamase se apresenta como uma opção de tratamento de grande importância, uma vez que restaura a atividade do antibiótico β -lactâmico resultando na efetividade desta família de antibióticos para o tratamento de várias infecções (WILLIAMS, 1999).

Tabela 1. Combinações de β -lactâmicos/inibidores de β -lactamases utilizados clinicamente (Williams, 1999).

β-lactâmicos	Inibidor de β-lactamase	Administração
Ampicilina	Sulbactam	Parenteral e oral
Cefoperazone	Sulbactam	Parenteral
Piperacilina	Tazobactam	Parenteral
Ticarcilina	Ácido clavulânico	Parenteral
Amoxicilina	Ácido clavulânico	Parenteral e oral

3.0 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar actinomicetos isolados de líquens da Região Amazônica, produtores de inibidores de β -lactamases e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina.

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar dentre as 71 espécies de actinomicetos isolados de líquens da Região Amazônica, os melhores produtores de inibidores de β -lactamases;

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos inibidores de β -lactamases produzidos pelos actinomicetos previamente selecionado frente a isolados de mastite bovina;

- Avaliar o efeito das condições de cultivo, em frascos agitados, (pH, agitação, concentrações das fontes de nitrogênio e carbono) utilizando a linhagem previamente selecionada, na produção dos inibidores de β -lactamases utilizando planejamento estatístico;

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, R. M. R. G.; Estudo da purificação do ácido clavulânico utilizando processo contínuo de absorção – Universidade Federal de São Carlos, p. 42-25, 2003.
- Al-Zahrami, S. H. M. (2007), Studies on antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Jazan *JKAU: Sci.*, 19, 127-138
- Andreazzi, D.; Rossi, F. (2005) Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. 1. ed. São Paulo, Rio de Janeiro, BH: Atheneu, v. 1. p.118.
- Beaudeau, F., Fourichon, C., Seegers, H., Bareille, N. (2002) Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual Milk somatic-cell counts. *Prev. Vet. Med.* v. 53, p. 43-54.
- Beharry, Z.; Chen, H.; Gadachanda, V. R.; Buynak, J.; Palzkill, T. (2004), Evaluation of penicillin-based inhibitors of the class A and β -lactamases from *Bacillus anthracis*. *Biochemistry and Biophysics*, v. 313, p. 541-545.
- Benedette, M. F., Silva, D., Rocha, F. P. C., Santos, D. A. N., Costa, E. A. A., Avanza, M. F. B. (2008), Mastite Bovina. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*. Ano VI, n. 11.
- Bethel C. R.; Hujer A. M.; Helfand M. S.; Bonomo R. (2004) Exploring the effectiveness of tazobactam against ceftazidime resistant *Escherichia coli*: insights from the comparison between susceptibility testing and β -lactamase inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, v. 234, p. 99–103.
- Boone, D. R.; Castenholz, R. W., Eds., In: Garrity G. M. (2001), ed.-in-chief. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York: Springer, 2 ed., v.1, p. 721.
- Brito, M.A.V.P., Brito, J.R.F., Ribeiro, M.T. (1999), Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n.2, p.129-135.
- Brito, M. A. P. V.; Campos, G. M. M.; Brito, J. R. F. (2002), Esquema simplificado para identificação de estafilococos Coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural*, v.32, n.1, p.79-82.
- Brito, J.R.F; Brito, M. A.V.P. (2000), Mastite bovina, São Paulo: Manole, pp. 114-129.
- Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros A. A. A. (1995), Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.39, p.1211–1233.
- Bush, K. (1999), Beta-lactamases of increasing clinical importance. *Current Pharmaceutical*, v.5, p.839-845.

- Cardoso, H. F. T., Carmo, L.S., Silva, N. (2000), Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.7-10.
- Chambers, H. F. Antimicrobianos: considerações Gerais; In: Goodman, G. (2003), As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc-Graw Hill, p.859 – 875.
- Chater, K. F. (2006), *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v.361, p. 761 – 798.
- Cullor, J. S. (1993), The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis. *Vet Med.*, p. 571-579.
- Dias, R. V. C. (2007), Principais Métodos de Diagnóstico e Controle da Mastite Bovina. *Acta Veterinária Brasileira*, v.1, n.1, p.23-27.
- Esslemont, D. e Kossaibati, M. (2002) Mastitis: how to get out of the dark ages. *Vet. J.* v. 164, p. 85-86.
- González, I.; Sacido, A. A.; Anderson, A.; Geniloud, O. (2005), Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, Oxford, England, v. 54, p. 401-415.
- Harmon, R.J., Eberhart, R.J., Jasper, D.E. (1990), Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington : National Mastitis Council, p. 34
- Holtenius, K., Persson, W. K., Essen-Gustavsson, B., Holtenius, P., Hallen Sandgren, C. (2004). Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *Vet. J.* v. 168, p.65-73.
- KATZUNG, G. Bertram. (2005), Farmacologia Básica & Clínica. 9ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.
- Lee, N., Yuen, K. Y., Kumara, C. R. (2003), Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs*, v. 63, p. 1511-1524.
- Levy, B.S.; Marshall, B. (2004), Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine supplement*, New York, United States, v. 10, p122-129.
- Lynch, H.C.; Yang, Y. (2004) Degradation products of clavulanic acid promote clavulanic acid production in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34 p. 48–54.

- Miller, L. A., Ratnam, K., Payne, D. J. (2001), β -lactamases-inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. *Current Opinion in Pharmacology*. v.1, p. 451-458.
- Neto, A. B. (2004) Estudo do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular, *Tese de Doutorado*, Universidade de São Carlos, São Carlos-SP, 206 pp.
- Overbye, K. M., Barrett, J. F. (2005), Antibiotics: Where did we go wrong, *Drug Discovery Today*, London, England, v. 10, p. 45-52.
- Peláez, F. (2006), The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, London, England, v.7 1, p.981– 990.
- Philpot, W. N.; Nickerson, S. C. (1991), Mastitis: Counter Attack. A strategy to combat mastitis. Illinois: Babson Brothers Co. p.150.
- Radostits, O. M., Blood, D.C., Gay, C. C. (2002), Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.1737.
- Rebhun, W. C. (2000), Doenças do Gado Leiteiro, São Paulo: Roca, p. 339-370.
- Ribeiro, M. E. R., Petrini, L. A., Aita, M. F., Balbinotti, M. (2003), Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Revista brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 3, p 287-290.
- Santos, C. D. M.; Leal, G. S.; Rossi, D. A.(2006), Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da Região de Uberlândia – MG. *Vet. Not.*, v. 12, n. 2, p. 83-88.
- Sato S. Produção de antibióticos. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani, W, Schmidell W. (2001), Biotecnologia industrial - Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p.101-124.
- Smith, B. (1994), Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. v. 2, São Paulo: Manole, p 1045-1056.
- Sommerhauser, J.; Klopper, B.; Wolter, W.; Zschock, M.; Sobiraj, A.; Failing, K. (2003), The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection from subclinical mastitis in dairy cows. *Livest Prod. Sci*, v. 77, p. 23-34.
- Teixeira, L. A. (1995), Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus* spp. clone in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 2400-2404.

- Teodoro, J. C., Baptista-Neto, A., Baldino Jr, A. C. (2003), Influência da velocidade de alimentação de glicerol na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada. In: XIV SINAFERM, Anais do XIV SINAFERM, Florianópolis, Santa Catarina.
- Tortora, G. J., Funck, B. R., Case, C. L. (2000) Microbiologia, 6ª edição, Porto Alegre, *Artmed*.
- Tozzetti, D. S.; Bataier, M. B. N.; Almeida, L. R. (2008), Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de literatura. *Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária* – issn: 1679-7353, n. 10.
- Venkatesan, A. M.; Agarwal, A.; Abe, T.; Ushirogochi, H.; Yamamura, I.; Kumagai, T.; Petersen, P. J.; Weiss, W. J.; Lenoy, E.; Yang, Y.; Shlaes, D. M.; Ryan, J. L.; Mansour, T. S. (2004) Novel imidazole substituted 6-methylidene-penems as broad-spectrum b-lactamase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.12, p.5807–5817.
- Watve, M.G.; Tickoo, R.; Maithili M. ; Bhalachandra, J.; Bhole, D. (2001), How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, v.176, p.386–390.
- Willians, J. D. (1999), β -lactamases and β - lactamases inhibitor. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.12, p S3-S7.
- Zadoks, R.N. (2004), Molecular methods on dairy farms: case studies. In: Molecular Methods in Milk Quality: Proceedings of a Symposium to celebrate the opening of the new Ithaca facilities of Quality Milk Production Services, Ithaca, NY. Proceedings Ithaca: Cornell University, p. 31-38.
- Zafalon, L. F., Langoni, H., Benvenuto, F., Castelani, L., Broccolo, C. R. (2008), Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Veterinária e Zootecnia* v. 15, n. 1, p. 56-65.
- Zecconi, A.; Hahn, G. (2000), *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.345, p.15-18.

CAPITULO I

**ACTINOMICETOS PRODUTORES DE INIBIDORES DE β -LACTAMASES COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

**ACTINOMYCETES PRODUCERS β -LACTAMASES INHIBITORS WITH
ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS**

Submetido a revista:

**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)**

Qualis: (0102-0935) B1 - MEDICINA VETERINÁRIA



1 **ACTINOMICETOS PRODUTORES DE INIBIDORES DE β -LACTAMASES COM**
2 **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

3 **ACTINOMYCETES PRODUCERS β -LACTAMASES INHIBITORS WITH**
4 **ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS**

5

6 Márcia Nieves Carneiro da Cunha^{1,2}; Nelly Mara Vinhote da Silva³; Maria Francisca Simas
7 Teixeira³; Rinaldo Aparecido Mota¹; José Luiz de Lima-Filho²; Tatiana Souza Porto^{1,2}; Ana
8 Lúcia Figueiredo Porto^{1,2*}

9 ¹Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal - Laboratório de Tecnologia de
10 Bioativos. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

11 ²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA – Universidade Federal de
12 Pernambuco.

13 ³Departamento de Parasitologia - Laboratório de Micologia - Universidade Federal do
14 Amazonas.

15 Autor de Correspondência: Ana Lúcia Figueiredo Porto, Endereço: Rua Dom Manoel de
16 Medeiros SN, Dois Irmãos, Recife – Pernambuco. CEP. 52171-900 Tel: (81)3320-6345 e-
17 mail: analuporto@yahoo.com.br.

18

19 **RESUMO**

20 O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de 71 actinomicetos isolados de líquens da
21 Região Amazônica em produzir inibidores de β -lactamases coma atividade antimicrobiana
22 utilizando *Staphylococcus aureus*, resistentes à penicilina, isolados de mastite bovina do
23 Estado de Pernambuco. A seleção dos actinomicetos produtores de inibidores de β -lactamases
24 foi realizada através da técnica de bloco de gelose contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC
25 29665 e os actinomicetos selecionados, foram testados frente a 17 linhagens resistentes a
26 penicilina de *Staphylococcus aureus*. Os melhores produtores de inibidores de β -lactamases
27 foram *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e *Nocardia* sp DPUA 1571, os quais foram submetidos
28 ao cultivo submerso para determinação da curva de crescimento, pH e atividade
29 antimicrobiana. Os maiores halos de inibição foram obtidos pelos metabólitos produzidos

30 após 96 horas de cultivo tanto para *Nocardia* sp (13,5 e 12,0 mm) como para *Streptomyces* sp.
31 (8,0 e 14,0 mm) com os testes-difusão nos discos e poços, respectivamente. Os resultados
32 permitiram concluir, que os actinomicetos são uma fonte promissora de inibidores de β -
33 lactamases, com potencial para uso no tratamento de mastites bovinas.

34 **Palavras-chaves:** inibidor de β -lactamase, actinomicetos, atividade antimicrobiana,
35 *Staphylococcus aureus*, mastite bovina

36 **ABSTRACT**

37 The aim was to evaluate the ability of 71 actinomycetes isolated from the Amazon lichens to
38 produce β -lactamase inhibitors with antimicrobial activity using *Staphylococcus aureus*,
39 penicillin-resistant isolates of bovine mastitis in Pernambuco State. The selection of
40 actinomycetes producing β -lactamase inhibitors was performed using Agar-plug method
41 against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 and selected actinomycetes were tested against
42 17 penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. The best producers of β -lactamase
43 inhibitors were *Streptomyces* sp. DPUA 1542 and *Nocardia* sp DPUA 1571, were submitted
44 to the submerged cultivation to determine the growth and pH curve, and antimicrobial
45 activity. The highest inhibition halo zone was obtained by metabolites produced after 96
46 hours of cultivation for both *Nocardia* sp (13.5 and 12.0 mm) and *Streptomyces* sp. (8.0 and
47 14.0 mm) with discs and wells diffusion tests, respectively. The results showed that the
48 actinomycetes are a promising source of β -lactamase inhibitors, with potential for use in the
49 bovine mastitis treatment.

50 **Key Words:** β -lactamase inhibitor, actinomycetes, antimicrobial activity, *Staphylococcus*
51 *aureus*, bovine mastitis

52

53

54

55

56

57 INTRODUÇÃO

58 A mastite é a inflamação da glândula mamária de diferentes etiologias e em 90% dos
59 casos são causadas por bactérias (Tozzeti et al., 2008; Benedette et al., 2008). A mastite
60 bovina é apontada como a principal doença dos rebanhos leiteiros no mundo inteiro, causando
61 prejuízos econômicos tanto ao produtor de leite quanto a indústria de laticínios (Tozzeti et
62 al., 2008), pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite
63 produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (Ribeiro et al.,
64 2003).

65 *Staphylococcus aureus* é reconhecido como o principal patógeno nos casos de mastite
66 (Salasia, 2004). Ainda que o controle da mastite fundamente-se principalmente nas medidas
67 higiênico-sanitárias, a antibioticoterapia exerce papel importante no caso de infecções por
68 bactérias, tendo em vista a possibilidade de eliminar as infecções intramamárias e reduzir
69 prováveis fontes de infecção (Erskine et al., 1993). Um dos fatores que vêm sendo
70 considerado para o controle das mastites é a resistência dos agentes etiológicos aos
71 antimicrobianos (Zafalon et al., 2008).

72 O uso indiscriminado e prolongado de antibióticos tem levado a seleção de
73 microrganismos patogênicos resistentes a esses compostos (Tresoldi et al., 2000). Um dos
74 mecanismos mais importantes da resistência exibidos por uma variedade de bactérias Gram-
75 positivas e Gram-negativas é sua habilidade de produzir β -lactamases. Essas enzimas
76 inativam penicilinas e cefalosporinas por meio da hidrólise do anel β -lactâmico (Brown et al.,
77 1976). O grau de resistência da bactéria depende da quantidade de enzima produzida, da
78 habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão e da velocidade com que
79 o β -lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (Macedo et al., 2005).

80 Estratégias para inativar essas enzimas têm assumido uma importância crítica na área
81 médica (Bethel et al., 2004). Uma proposta para contornar esse problema é a utilização de um
82 inibidor de β -lactamase juntamente com um antibiótico β -lactâmico (Neto, 2004). Os
83 inibidores de β -lactamases são compostos similares aos antibióticos que se ligam às β -
84 lactamases, de forma geralmente irreversível, protegendo os antibióticos contra sua
85 destruição, garantindo sua atividade frente a microrganismos patogênicos (Macedo et al.,
86 2005).

87 Neste trabalho foram selecionadas espécies de actinomicetos isolados de líquens da
88 Região Amazônica, produtoras de inibidores de β -lactamases, utilizando como microrganismo
89 teste a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 e 17 linhagens de *Staphylococcus aureus*,
90 isoladas de mastite bovina em rebanhos do Estado de Pernambuco, resistentes à penicilina e
91 amoxicilina.

92 **MATERIAIS E MÉTODOS**

93 **Microrganismos**

94 Os microrganismos utilizados foram 71 Actinomicetos isolados de líquens da Região
95 Amazônica, pertencentes à coleção de microrganismos do Departamento de Parasitologia da
96 Universidade do Amazonas (DPUA), cedidos pela Profa. Maria Francisca Simas Teixeira.

97 Os microrganismos testes utilizados foram 17 linhagens de *S. aureus* isolados de
98 mastite bovina de rebanhos do Estado de Pernambuco, resistentes à penicilina (Medeiros et
99 al., 2009), cedidas pelo Prof. Rinaldo Aparecido Mota do Departamento de Medicina
100 Veterinária da UFRPE e *K. pneumoniae* ATCC 29665 produtora de β -lactamase.

101 **Manutenção dos microrganismos**

102 O meio de cultura utilizado para manutenção das amostras de actinomicetos foi o meio
103 ISP-2 (Pridham et al., 1957), modificado pela retirada de glicose. As culturas de
104 actinomicetos foram semeadas em placas de Petri, incubadas a 30°C por 168 horas e mantidas
105 em temperatura ambiente, as amostras foram repicadas a cada 30 dias. O caldo nutriente foi
106 utilizado como o meio de manutenção para os microrganismos testes *K. pneumoniae* ATCC
107 29665 e *S. aureus*. Todos os microrganismos testes foram conservados como cultura estoque
108 em criotubos utilizando glicerol 20% (v/v) e incubados a -20°C.

109 **Seleção dos actinomicetos produtores de inibidores de β -lactamases por bloco de gelose**

110 A produção de inibidores de β -lactamases foi avaliada através da técnica de bloco de
111 gelose por difusão em ágar segundo Brown et al. (1976), utilizando *K. pneumoniae* ATCC
112 29665 como microrganismo teste. Os testes foram realizados em Ágar Müller-Hinton
113 adicionado de solução de benzil-penicilina G (0,01 μ g/mL). O meio foi distribuído em placas
114 de Petri (90x15mm de diâmetro) e na superfície do meio foi semeada uma suspensão do
115 microrganismo teste, crescidos em Erlenmeyers (50mL) contendo o meio Tryptic Soy Broth
116 (TSB) incubados a 37°C por 24 horas, na concentração de 10⁸ UFC/mL o que corresponde a

117 uma solução padrão de McFarland a 0,5, ou seja, um valor de absorbância igual a 0,1 a 600
118 nm (National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2003). Nas placas foram
119 adicionados fragmentos de 6mm de diâmetro, retirados da área central das culturas dos
120 actinomicetos, crescidos em meio ISP-2 sólido a 30°C por 168 horas. O padrão utilizado foi o
121 clavulanato de potássio (Sigma Aldrich - São Paulo, Brasil) na concentração de 10 mg/mL.
122 Após incubação das placas a 37°C por 24 e 48 horas foram realizadas as leituras dos
123 diâmetros dos halos de inibição, expressos em milímetro.

124 **Determinação atividade antimicrobiana por bloco de gelose dos actinomicetos** 125 **selecionados frente às amostras de *S. aureus* isolados de mastite bovina**

126 A técnica utilizada nesta etapa foi a técnica de bloco de gelose por difusão em ágar
127 segundo Brown et al. (1976) como descrito no item anterior. Os microrganismos testados
128 foram 17 estirpes de *S. aureus* isolados de mastite bovina e resistentes a penicilina e
129 amoxicilina.

130 **Produção de inibidores de β -lactamases pelos actinomicetos selecionados por cultura** 131 **submersa**

132 Fragmentos de 6mm de diâmetro retirados da área central das colônias dos
133 actinomicetos crescidos em placas contendo o meio ISP-2 a 30°C por 168 horas, foram
134 cultivados em Erlenmeyers (125mL) contendo 25mL do meio ISP-2 e mantidos sob agitação
135 (200rpm) a 28°C por 48 horas. Após esse período 10% (v/v) deste pré-inóculo foi transferido
136 para Erlenmeyers de 250mL contendo 100mL do meio de cultivo MS-2 descrito por Porto et
137 al. (1996), a constituição do meio para 100mL foi de: 50 mL de filtrado de soja (4% p/v), NH₄
138 Cl (0,1 % p/v), MgSO₄ 7H₂ O (0,06 % p/v), extrato de levedura (0,1% p/v), glicerol (1 %
139 p/v), K₂HPO₄ (0,435 % p/v) e 1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO₄ 7H₂O; 100 mg de
140 MnCl₂ 4H₂O; 100 mg de ZnSO₄ H₂O; 100 mg de CaCl₂ H₂O e água destilada q.s.p. 100
141 mL). Os cultivos foram realizados em agitador orbital (200 rpm) a 28°C por um período de
142 144 horas, onde a cada 24 horas um Erlenmyers era retirado para acompanhar a cinética de
143 crescimento, curva de pH e determinação da atividade antimicrobiana do líquido metabólico.

144 **Determinação da atividade antimicrobiana dos líquidos metabólicos produzidos pelos** 145 **actinomicetos selecionados através da técnica de difusão em disco e poço.**

146 A atividade dos inibidores de β -lactamases nos líquidos metabólicos produzidos pelos
147 actinomicetos foi estimada empregando-se o método biológico de difusão em disco descrito

148 por Ericsson e Sherris (1971) e difusão em poço. Na técnica de difusão em disco placas
149 contendo Agar Müeller Hinton adicionado com uma solução de benzil-penicilina G
150 (0,01µg/mL) foram semeadas com uma suspensão dos microrganismos teste *K. pneumoniae*
151 ATCC 29665 e *S. aureus* isolados de mastite bovina, crescidos em meio TSB a 37°C por 24
152 horas com concentração de 10⁸ UFC/mL o que corresponde a uma solução padrão de
153 McFarland a 0,5, ou seja, um valor de absorbância igual a 0,1 a 600 nm (National Comité
154 Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2003). Nestas placas foram adicionados discos de
155 papel de filtro de 6mm de diâmetro impregnados com 10µL dos líquidos metabólicos livre de
156 células, as placas foram incubadas a 37°C por 24h.

157 Para o teste de difusão em poço, o mesmo meio de cultura foi utilizado e distribuído
158 em placas de Petri, onde foi semeada uma suspensão dos microrganismos testes na mesma
159 concentração utilizada no teste de difusão em disco. No centro das placas de Petri foram
160 realizados orifícios de 6mm de diâmetro onde foram adicionados 30µL do líquido metabólico
161 produzido pelos actinomicetos selecionados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por
162 24 horas. Em seguida, foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição
163 expressos em mm. Os ensaios foram realizados em duplicata.

164 **Determinação da curva de biomassa e de pH**

165 A avaliação da biomassa foi realizada por gravimetria (peso seco) e o pH foi medido
166 por potenciometria no decorrer do cultivo a cada 24 horas.

167

168 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

169 Os ensaios em bloco de gelose mostraram que dentre as 71 amostras de actinomicetos
170 testadas, 18% apresentaram atividade antimicrobiana frente ao microrganismo teste *K.*
171 *pneumoniae* ATCC 29665 produtora de β-lactamase após 24 horas de cultivo e 22% após 48
172 horas de cultivo. As melhores atividades antimicrobianas obtidas frente à *K. pneumoniae*
173 ATCC 29665 após 24 horas de cultivo foram apresentadas pelos *Streptomyces* sp. DPUA
174 1542 e DPUA 1543, e pelo *Nocardia* sp. DPUA 1571 com halos de inibição de 30mm, 28mm
175 e 24mm respectivamente (Tab. 1). Ceylan et al. (2009) isolaram 15 amostras de *Streptomyces*
176 *sp* do solo da Turquia e estudaram suas atividades antimicrobianas frente a *S. aureus*,
177 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* e obtiveram

178 halos de inibição de ≥ 30 mm. Estes resultados corroboram com os dados obtidos neste
179 trabalho.

180 Os actinomicetos selecionados, os quais apresentaram maior atividade antimicrobiana
181 frente ao microrganismo teste *K. pneumoniae* ATCC 29665, foram submetidos novamente a
182 testes de bloco de gelose frente a 17 linhagens de *S. aureus*, isolados de mastite bovina
183 resistentes a penicilina. Os resultados das atividades antimicrobianas das linhagens de
184 actinomicetos frente aos isolados de mastite bovina estão apresentados na Tab. 2.

185 Das 16 amostras de actinomicetos pré-selecionadas, apenas *Streptomyces* sp. DPUA
186 1547 e *Streptomyces* sp. DPUA 1605 não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos
187 isolados de mastite bovina testados. Os actinomicetos *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e
188 *Nocardia* sp. DPUA 1571 foram os que apresentaram maiores halos de inibição frente aos *S.*
189 *aureus* 28 e 31mm, respectivamente (Tab. 2). Estes resultados comprovam a produção de
190 inibidores de β -lactamases, pois os *S. aureus* utilizados neste estudo foram os descritos por
191 Medeiros et al. (2009), o quais estudaram o perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de 291
192 linhagens de *Staphylococcus* spp isoladas de mastites bovina, e foram testadas frente aos
193 seguintes antibióticos: amoxicilina, ampicilina, azitromicina, cefquinome, cephalonium,
194 ciprofloxacina, cloxacilina, danofloxacina, enrofloxacina, eritromicina, florfenicol,
195 gentamicina, penicilina + novobiocina, trimetoprim, tobramicina, tetraciclina+ neomicina+
196 bacitracina. Os autores observaram também um perfil de multirresistência para 65 dos *S.*
197 *aureus* isolados, onde: 44 estirpes apresentaram resistência de 2 – 4; 17 estirpes apresentaram
198 resistência de 5 – 7 e 4 dos *S. aureus* foram resistentes a 8 ou mais antibióticos.

199 Al-Zahrami (2007) quando estudou a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp.
200 (J12) isolados do solo da Arábia Saudita, frente a amostras de *S. aureus* através da técnica
201 bloco de gelose, utilizando blocos de 5mm de diâmetro, observaram halos de inibição de até
202 29mm de diâmetro, resultados semelhantes aos obtidos neste estudo.

203 Thakur et al. (2007) isolaram 110 amostras de actinomicetos do solo da Índia e destas,
204 39 (60%) apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*. Das amostras testadas
205 neste estudo contra estirpes de *S. aureus*, 14 apresentaram atividade inibitória, o que
206 corresponde a 87,5% do total.

207 *Streptomyces* sp DPUA 1542 e *Nocardia* sp DPUA 1571 apresentaram um perfil de
208 crescimento característico durante o cultivo em meio líquido (MS-2), como apresentado na

209 Fig. 1. Observou-se, durante o crescimento microbiano que os microrganismos apresentaram
210 fase lag de 24 horas e uma fase logarítmica característica, a qual exibiu crescimento máximo
211 no tempo 72 horas para *Nocardia* sp DPUA 1571 e 96 horas para *Streptomyces* sp. DPUA
212 1542, o qual apresentou maior valor de biomassa que nas mesmas condições de cultivo. O pH
213 do meio de cultivo aumentou de 7,0 para 8,5 ao final das 144 horas de cultivo (Fig. 1).

214 Verificou-se tanto para *Streptomyces* sp. DPUA 1542 como para *Nocardia* sp. DPUA
215 1571 que a produção de metabólicos com atividade antimicrobiana teve início no tempo
216 correspondente ao início da fase estacionária do crescimento microbiano, ou seja, como
217 metabólito secundário. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Yu et al. (1999)
218 os quais descreveram que a produção de metabólitos secundários pelos actinomicetos em
219 meio líquido é limitada à fase estacionária, que frequentemente coincide com a escassez dos
220 nutrientes do meio de cultura.

221 Durante o crescimento também foi avaliada a atividade antimicrobiana do líquido
222 metabólico produzido pelas culturas dos actinomicetos através da técnica de difusão em
223 discos e em poços e os resultados estão apresentados na Tab. 3. Foi possível observar a
224 atividade antimicrobiana apresentada pelo *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e *Nocardia* sp.
225 DPUA 1571 com diâmetros de halos de inibição de 8,00 e 13,5mm utilizando *S. aureus* e de
226 9,00 e 12,00mm com *K. pneumoniae*, respectivamente. *Streptomyces* sp. DPUA 1542
227 produziu halos de inibição apenas no tempo de 96 horas de crescimento, já *Nocardia* sp.
228 DPUA 1571 produziu halos de inibição em 72 horas e 96 horas de crescimento,
229 respectivamente.

230 Para a atividade antimicrobiana utilizando a técnica difusão em poço, foi possível
231 detectar halos de inibição na maioria dos tempos para os dois microrganismos. Esta maior
232 detecção ocorreu devido à maior quantidade de líquido metabólico (30 μ L), bem como pela
233 maior difusão do mesmo utilizando esta metodologia, como pode ser observado na tab. 3.

234 De acordo com a NCCLS (2003) um microrganismo é sensível a combinação β -
235 lactâmico/inibidor de β -lactamase quando utilizando de 20 - 10 μ g deste composto em testes
236 de difusão em disco, halos \geq 18mm de diâmetro de inibição são produzidos. Através da
237 comparação dos halos de inibição apresentados por *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e por
238 *Nocardia* sp. DPUA 1571 frente aos microrganismos teste *K. pneumoniae* ATCC 29665 e *S.*
239 *aureus* resistente a penicilina, não foram obtidos halos de inibição maiores que 18mm, no

240 entanto, as amostras testadas não podem ser classificadas como resistentes, visto que, a
241 concentração de inibidores de β -lactamases contida nos líquidos metabólicos não foi
242 determinada, e como encontram-se em solução, supõe-se que as concentrações são menores
243 que as recomendadas pelas normas da NCCLS. Estudos serão realizados visando identificar e
244 purificar esses compostos.

245 Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os dados apresentados por
246 Alberton et al (2006) que estudaram a atividade antimicrobiana do líquido metabólico obtido
247 da fermentação do *Streptomyces viridosporus* T7A e observaram que este não foi capaz de
248 inibir o crescimento de *Salmonelas* sp., *Pseudomonas* sp., e *Escherichia coli*. O extrato bruto
249 também não promoveu grandes halos de inibição frente as culturas de *S. aureus* causadoras de
250 intoxicação alimentar e de mastites. Estes autores justificaram os resultados obtidos devido ao
251 metabólito está diluído no extrato bruto, por isso a utilização de um processo de separação e
252 purificação visando concentrar este extrato irá possibilitar melhores resultados.

253

254 **CONCLUSÕES**

255 Estes resultados permitiram concluir que os actinomicetos *Streptomyces* sp. DPUA
256 1542 e *Nocardia* sp. DPUA 1571 foram capazes de produzir inibidores de β -lactamases
257 destacando-se frente a amostras de *S. aureus* resistentes à penicilina, isolados de mastite
258 bovina. Avaliações futuras deverão ser realizadas visando otimizar a produção e identificação
259 deste metabólito para aplicação no tratamento de mastites bovinas.

260 **AGRADECIMENTOS**

261 Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPQ, e as bolsas de estudo da CAPES e
262 da FACEPE.

263 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

264 ALBERTON, L. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; JOINEAU, M. E.; MARTINS, L. A.;
265 PACHALY, J. R.; ASSMAN, R.; CIFFONI, E. M. G.; SOCCOL, C. R. Avaliação do
266 Potencial de Uso do Extrato Bruto da Fermentação por *Streptomyces vidosporium* T7A em
267 Medicina Veterinária. *Arq. Ciên. Vet. Zool.*, n.9, p. 41-47, 2006.

- 268 AL-ZAHRAMI, S. H. M. Studies on antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. Isolated from
269 Jazan *JKAU: Sci.*, n.19, p.127-138, 2007.
- 270 BENEDETTE, M. F.; SILVA, D.; ROCHA, F. P. C.; SANTOS, D. A. N.; COSTA, E. A. A.;
271 AVANZA, M. F. B. Mastite Bovina. *Rev. Cien. Elet. Med. Vet.* Ano VI, n.11, 2008.
- 272 BETHEL C. R.; HUJER A. M.; HELFAND M. S.; BONOMO R. Exploring the effectiveness
273 of tazobactam against ceftazidime resistant *Escherichia coli*: insights from the comparison
274 between susceptibility testing and β -lactamase inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.234,
275 p.99–103, 2004.
- 276 BRITO, J.R.F; BRITO, M. A.V.P. Mastite bovina, São Paulo: Manole, p.114-129. 2000.
- 277 BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Programas de controle das mastites causadas por
278 microrganismos contagiosos e do ambiente. Embrapa CNPGL, Juiz de Fora, p. 25, 1998.
- 279 BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.;
280 READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally occurring β -Lactam inhibitors with antibacterial
281 activity. *J. Antibiotics*, v.29, n.6, p.668 – 669, 1976.
- 282 CEYLAN, O.; OKMEN, G.; UGUR, A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics
283 active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsia. J. BioSci.*, v. 2, p.73-83, 2008.
- 284 ERICSSON, H.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotic sensitivity testing-Report of an International
285 Collaborative Study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, n.217, p.1-90, 1971.
- 286 ERSKINE, R. J., KIRK, J. H., TYLER, J. W., DeGRAVES, F. J. (1993), Advances in the
287 therapy for mastitis. *Vet. Clin. N. Amer.*: Food Animal Practice. v. 9, n. 3, p. 499-513.
- 288 MACEDO, M. L. A. P.; CARTAXO, R. S.; ALMEIDA, T. C. C., SOUZA, L. B. S.;
289 SANTANA, W. J. Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. UNOPAR
290 *Cient., Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, v.7, n.1, p.59-63, 2005.
- 291 MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO
292 JÚNIOR, J. W.; TELES, J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de
293 *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.* v.29 n.7
294 p.569-574, 2009.

295 NCCLS - National Comité Clinical Laboratory Standards, *Methods for Dilution Antimicrobial*
296 *Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition.*
297 NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite
298 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2003

299 NETO, A. B. Estudo do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces*
300 *clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular, *Tese de Doutorado,*
301 Universidade de São Carlos, São Carlos-SP, pp. 206, 2004.
302

303 PORTO, A. L. F., CAMPOS-TAKAKI, G. M. and LIMA FILHO, J. L. Effects of culture
304 conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour
305 medium. *Appl. Biochem. Biotech.*, n.60, p.115-122, 1996.
306

307 PRIDHAM, T. G.; ADERSON, P.; Foley, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C.
308 W.; BENEDICT, R. G. A. Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of
309 *Streptomyces*. *Antibiot. M.*, p.947-953, 1957.

310 RIBEIRO, M. E. R., PETRINI, L. A., AITA, M. F., BALBINOTTI, M. Relação entre mastite
311 clinica, subclinica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na Região
312 Sul do Rio Grande do Sul. *R. bra. Agrocência*, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

313 SAHIN, N.; UGUR, A. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces*
314 isolates. *Turk J.Biol.*, n.27, p.79-82, 2003.

315 SALASIA, S. I. O. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of
316 *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonésia
317 and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.*, n.5, p.103-109, 2004.

318 THAKUR, D., YADAY, B. K. G., Bora, T. C. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil
319 of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial
320 metabolites. *J. Mycol Méd.*, n.17, p.242-249, 2007.

321 TOZZETI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento
322 das mastites bovinas – Revisão de literatura. *Rev. Cien. Elet. Med. Vet* – issn: 1679-7353,
323 v.10, 2008.

- 324 TRESOLDI, A. T.; BARISON, E. M.; PEREIRA, R. M.; PADOVEZE, M. C.; TRABASSO,
325 P. Risk factors associated with the acquisition of multiresistant bacteria in pediatric nursery.
326 *J. Pediatr.*, n.4, p.275-286, 2000.
- 327 YU, T. W.; SHEN, Y.; DOI-KATAYAMA, Y.; TANG, L.; PARK, C.; MOORE, B. S.;
328 HUTCHINSON, C. R.; FLOSS, H. G. Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase
329 assembles polyketides chains processively. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.9, p.9051-9056, 1999
- 330 ZAFALON, L. F., LANGONI, H., BENVENUTTO, F., CASTELANI, L., BROCCOLO, C.
331 R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Vet.*
332 *Zoot.*, v.15, n.1, p.56-65, 2008.
- 333

334 **Tabela 1.** Atividade antimicrobiana expressa por halos de inibição produzidos pelos
 335 actinomicetos frente a *K.pneumoniae* para seleção dos produtores de inibidores de β -
 336 lactamases pela técnica do bloco de gelose.

Amostras	Diâmetro do halo de inibição (mm) após 24 horas	Diâmetro do halo de inibição (mm) após 48 horas
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1542	30,0	39,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1543	28,0	37,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1547	10,0	10,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1549	14,0	17,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1550	18,0	18,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1557	14,0	14,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1559	10,0	14,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1566	10,0	10,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1568	16,0	16,0
<i>Nocardia</i> sp. DPUA 1571	24,0	38,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1573	18,0	24,0
<i>Nocardia</i> sp. DPUA 1577	14,0	14,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1586	-	14,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1587	-	12,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1591	14,0	14,0
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1605	-	10,0

337

338 **Tabela 2.** Atividade antimicrobiana expressa por halos de inibição (mm) apresentados pelos
 339 actinomicetos frente as estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina através
 340 da técnica do bloco de gelose.

	DPUA 1542	DPUA 1543	DPUA 1547	DPUA 1549	DPUA 1550	DPUA 1557	DPUA 1559	DPUA 1566	DPUA 1568	DPUA 1571	DPUA 1573	DPUA 1577	DPUA 1586	DPUA 1587	DPUA 1591	DPUA 1605
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	13	11	-	8	8	-	9	8	10	12	-	8	8	-	8	-
S3	28	18,5	-	10	8	-	-	13	-	23	13	-	-	-	11	-
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	26	19	-	9	9	-	8	9	19	21	10	-	-	-	15	-
S6	20	14	-	12	-	13	7	9	12	24	7	7	-	-	12	-
S7	19	12,5	-	-	-	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-
S8	24	18,5	-	10	8	-	-	9	13,5	23	13	7,5	-	-	10	-
S9	28	29	-	18,5	13	-	19	12	18	28	8	10	-	-	15	-
S10	24	21	-	14	-	-	-	11	-	30	10	-	-	-	10	-
S11	26,5	21	-	15	18	-	-	9	11	31	9	8	-	-	10	-
S12	24,5	19	-	13,5	13	-	-	13	19	21	8	7	-	-	12	-
S13	24,5	19	-	11,5	15	-	-	12	14	28	11	8	-	-	12	-
S14	25	16	-	11	-	-	-	-	13,5	26	12	12	-	-	-	-
S15	19	13	-	17	12	-	-	10	13	30	8	7	-	7,5	13	-
S16	27	19	-	17	12	-	-	10	13	30	8	7	-	7,5	13	-
S17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

341

342

343 **Tabela 3.** Atividade antimicrobiana apresentadas pelo *Streptomyces sp.* (DPUA 1542) e
 344 *Nocardia sp.* (DPUA 1571), expressas por halos de inibição (em mm) frente aos
 345 microrganismos testes *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* isolados de mastite
 346 bovina através da técnica de difusão em disco e poço.

Microrganismos	<i>Streptomyces sp</i> DPUA 1542				<i>Nocardia sp</i> DPUA 1571			
	48h	72h	96h	120h	48h	72h	96h	120h
<i>K. pneumoniae</i> (Disco)	-	-	9,00	-	-	12,00	12,00	-
<i>K. pneumoniae</i> (Poço)	-	12,25	14,25	10,00	-	12,50	17,50	9,00
<i>S. aureus</i> (Disco)	-	-	8,00	-	-	9,00	13,50	-
<i>S. aureus</i> (Poço)	-	11,00	10,50	9,5	-	11,00	9,00	12,00

347

348

349 LEGENDA DA FIGURA

350

351

352 **Figura 1.** Curva de crescimento e de pH do *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e do *Nocardia* sp.

353 DPUA 1571 cultivados no meio MS-2 em agitador orbital (200rpm) a 28°C por 144 horas.

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

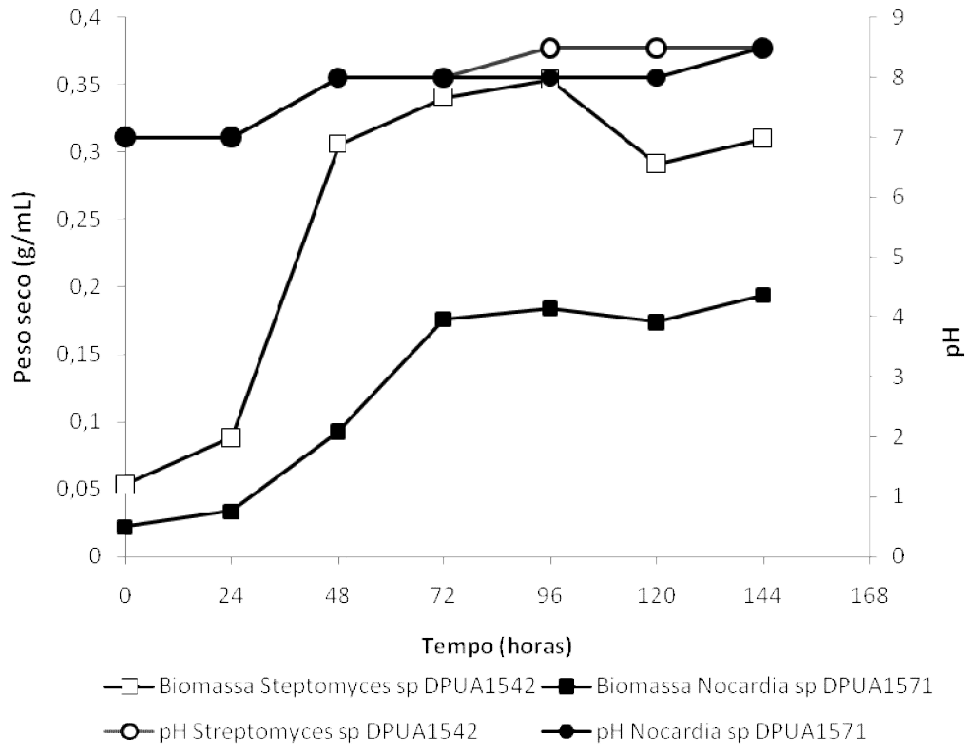
364

365

366

367

368



CAPITULO II

**PRODUÇÃO DE INIBIDORES DE β -LACTAMASES POR *Nocardia* sp. DPUA
1571**

PRODUCTION OF β -LACTAMASE INHIBITORS BY *Nocardia* sp. DPUA 1571

**PRODUÇÃO DE INIBIDORES DE β -LACTAMASES POR *Nocardia* sp. DPUA
1571**

PRODUCTION OF B-LACTAMASE INHIBITORS BY *Nocardia* sp. DPUA 1571

M. N. CARNEIRO-DA-CUNHA^{1,2}, N. M. V. SILVA³, M. F. S. TEIXEIRA³, R. A. MOTA¹, J. L. LIMA-FILHO², T. S. PORTO^{1,2}, A. L. F. PORTO^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal - Laboratório de Tecnologia de Bioativos - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA – Universidade Federal de Pernambuco.

³Departamento de Parasitologia - Laboratório de Micologia - Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

A disseminação do uso de antibióticos β -lactâmicos indiscriminadamente fez com que as bactérias desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos β -lactâmicos, com o conseqüente aparecimento de resistência, que ocorre principalmente pela produção de β -lactamases. A utilização de um inibidor de β -lactamase juntamente com um antibiótico β -lactâmico é uma alternativa viável para o tratamento de infecções provocadas por bactérias resistentes. Neste estudo foi avaliada a influência de três variáveis: concentrações da fonte de carbono (0,5, 1,0 e 1,5%), concentrações de fonte de nitrogênio (1,0, 2,5 e 4,0%) e pH (6,0, 6,5 e 7,0), através de um planejamento fatorial (2^3) para a produção de inibidor de β -lactamase por *Nocardia* sp. DPUA 1571. A produção ocorreu em Erlenmeyers de 250mL contendo 100mL do meio de cultivo MS-2 modificado de acordo o modelo experimental, os frascos foram incubados em agitador orbital (200 rpm) a 28°C por um período de 120 horas e a cada 24 horas, alíquotas de 5mL foram retiradas e centrifugadas a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C, para o estudo da atividade biológica e peso seco. A atividade biológica do líquido metabólico foi realizada através da técnica de difusão em disco e poço, nas melhores condições de cultivo (ensaio 3) com concentração da fonte de carbono de 1,5%, concentração do filtrado de soja de 1% e o pH 6,0, foram obtidos halos de inibição de até 22mm de diâmetro frente aos microrganismos teste utilizados. Os resultados permitiram concluir,

que os actinomicetos isolados de líquens da Região Amazônica são uma fonte promissora de inibidores de β -lactamases, com potencial para aplicação futura na indústria farmacêutica.

Palavras-chaves: inibidor de β -lactamase, *Nocardia* sp., planejamento fatorial, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The widespread use of antibiotics unfortunately caused the bacteria develop defenses for antibacterial agents, with the consequent appearance of resistance. This is caused mainly by β -lactamases production. The use of an inhibitor of β -lactamase with a β -lactam antibiotic is a viable alternative for the treatment of infections caused by resistant bacteria. This study using a factorial design (2^3) the influence of three variables: concentrations of carbon source (0.5, 1.0 and 1.5%), concentrations of nitrogen source (1.0, 2.5 and 4.0%) and pH (6.0, 6.5 and 7.0) were evaluated in the production of inhibitors of β -lactamases by *Nocardia* sp DPUA 1571. The production carried out in 250mL flasks containing 100mL of culture medium MS-2 modified according to the experimental design, the flasks were incubated in an orbital shaker (200 rpm) at 28 ° C for 120 hours and each 24 hours, aliquots of 5 mL were withdrawn and centrifuged at 5000 rpm for 20 minutes at 4 ° C for the study of biological activity and dry weight. The biological activity of the liquid assay was performed using the diffusion-tests on the discs and wells, the best cultivate conditions (test 3) with concentration of carbon source of 1.5% concentration of the soy bean flour 1% and pH 6,0, were obtained from the inhibition of up to 22mm diameter test against microorganisms used. The results showed that the actinomycetes are a promising source of β -lactamase inhibitors, demonstrated the potential application to pharmaceutical industry.

Key Words: β -lactamase inhibitor, *Nocardia* sp., factorial design, antimicrobial activities.

INTRODUÇÃO

Os antibióticos β -lactâmicos tais como as penicilinas e cefalosporinas estão entre os primeiros antibióticos descobertos e continuam sendo utilizados clinicamente no

combate à infecções causadas por bactérias, no entanto, o uso generalizado e indiscriminado dos antibióticos β -lactâmicos por mais de 50 anos, levou a redução de sua eficácia, devido ao aparecimento de bactérias resistentes a esses medicamentos (LI e TOWNSEND, 2006).

A resistência bacteriana é mediada por três mecanismos: menor acesso do antibiótico a célula bacteriana; alterações nas proteínas de ligação do antibiótico e a inativação enzimática que é um mecanismo relacionado com a produção de diferentes tipos de enzimas capazes de neutralizar a droga ou os efeitos antimicrobianos da mesma, tais como as β -lactamases (SYKES e MATTHEW, 1976; SANDERS e SANDERS, 1992; PIDDOCK, 2006).

A produção de β -lactamases constitui o mecanismo mais comum de resistência bacteriana. Essas enzimas catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico do antibiótico, originando um produto inativo, isto é, sem ação antibiótica (OLIVEIRA et al., 2009). A identificação de mais de 340 enzimas β -lactamases diferentes apresenta um desafio significativo no tratamento das infecções bacterianas (LEE, et al., 2003).

Para contornar o problema da resistência bacteriana foram desenvolvidas algumas estratégias, a primeira foi a modificação da estrutura química do antibiótico e a segunda a descoberta de compostos que inibem as enzimas β -lactamases. Os inibidores de β -lactamases são compostos que possuem baixa atividade antimicrobiana, mas potencializam a ação dos antibióticos β -lactâmicos (OLIVEIRA, 2004), sendo assim, a combinação de um β -lactâmico com um inibidor de β -lactamase se apresenta como uma opção de tratamento de grande importância, uma vez que restaura a atividade do antibiótico β -lactâmico resultando na efetividade desta família de antibióticos para o tratamento de várias infecções (WILLIAMS, 1999).

Os inibidores utilizados clinicamente são as penicilinas sulfonas (sulbactâmico, tazobactâmico, e seus derivados) e o clavulânico, produzido por *Streptomyces clavuligerus* (MILLER et al., 2001).

O ácido clavulânico é o mais efetivo inibidor de β -lactamases, produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas. Quando utilizado em combinação com estes antibióticos, o ácido clavulânico liga-se irreversivelmente à serina do grupo

hidroxila do centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário acilado estável e assim inativando a enzima (FOULSTONE e READING, 1982; BAGGALEY et al, 1997).

O mecanismo de inibição tanto para o sulbactâmico quanto para o tazobactâmico é parecido com o do ácido clavulânico, entretanto Payne e colaboradores (1994), estudaram a atividade desses compostos e observaram uma atividade inibidora de enzimas β -lactamase quase 5 vezes maior que o tazobactâmico e quase 600 vezes maior que o sulbactâmico.

Os inibidores de β -lactamase, a exemplo de outros antibióticos β -lactâmicos, são produzidos por microrganismos através de processos fermentativos, no entanto, o processo de obtenção industrial do ácido clavulânico, assim como dos demais inibidores de β -lactamase, é pouco documentado na literatura, e é uma premissa importante o conhecimento e melhoramento de sua obtenção e produção (ELANDER, 2003).

Actinobactérias em geral, e em particular o gênero *Streptomyces*, continuam sendo fonte de novos metabólitos secundários com uma grande variedade de atividades biológicas, tais como, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticancerígenas, antiparasitárias, entre outras (YU et al., 1999; THAKUR et al., 2007). *Nocardia* usualmente é o segundo gênero mais abundante de actinobactérias, a importância deste gênero também tem sido relacionada com a produção de antibióticos (KONEMAN et al., 2001), cuja ação é evidenciada principalmente em meio de cultura, através da produção de halos de inibição, onde se forma uma zona livre de crescimento microbiano, em torno da colônia do actinomiceto que sintetiza o antibiótico.

O planejamento estatístico de experimentos é uma ferramenta amplamente utilizada para a otimização e controle de processos, é um método muito eficiente para estudar a influência de um certo número de variáveis em uma determinada resposta de interesse. Por uma fração fatorial, os fatores significativos e seus efeitos podem ser estudados usando um número menor de experimentos, reduzindo assim os custos de operação (BRUNS et al., 2006).

Visto a necessidade do desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos o objetivo deste trabalho foi a obtenção de inibidores de β -lactamase produzidos por

Nocardia sp. DPUA 1571, bem como o estudo dos fatores que influenciam nesta produção, utilizando planejamento fatorial completo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos e manutenção

O microrganismo *Nocardia* sp. DPUA 1571 foi isolado de líquens de Região Amazônica, é produtor de inibidores de β -lactamases (CARNEIRO-DA-CUNHA et al, 2009), e pertencente à coleção de microrganismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA), gentilmente cedido pela Profa. Maria Francisca Simas Teixeira. As culturas foram repicadas em tubos de ensaio inclinados contendo o meio ISP-2 (PRIDHAM et al., 1957), modificado pela retirada de glicose, e incubadas a 30°C por 168 horas, após este procedimento foram mantidas sob refrigeração e repicadas a cada 30 dias

Os microrganismos testes, resistentes a antibióticos (MEDEIROS et al., 2009), utilizados foram 10 linhagens de *Staphylococcus aureus* isolada de mastite bovina de rebanhos do estado de Pernambuco e, cedida pelo professor Rinaldo Aparecido Mota do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE e o microrganismo produtor de β -lactamases foi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665. O meio de cultura caldo nutriente foi utilizado como o meio de manutenção para os microrganismos testes *K. pneumoniae* ATCC 29665 e *S. aureus*. Todos os microrganismos testes foram conservados na presença de glicerol para um volume final de 20% (v/v) a -20°C.

Condições de cultivo

Fragmentos de 6mm de diâmetro retirados da área central da colônia de *Nocardia* sp. DPUA 1571 crescidos em meio ISP-2 a 30°C por 168 horas, foram cultivados em Erlenmeyers (125 mL) contendo 25mL do meio ISP-2 e mantidos sob agitação (200rpm) a 28°C por 48 horas. Após esse período alíquotas deste pré-inóculo na concentração final de 10^6 células.mL⁻¹, correspondendo a 10% do volume total foi transferido para Erlenmeyers de 250mL contendo 100mL do meio de cultivo MS-2 descrito por Porto et al. (1996), a constituição do meio para 100mL foi de: 50 mL de filtrado de soja (4% p/v), NH₄ Cl (0,1 % p/v), MgSO₄. 7H₂ O (0,06 % p/v), glicerol (1 % p/v), K₂HPO₄ (0,435 % p/v), 5mL do tampão MOPS (100mM) e 1mL de solução

mineral (100 mg de FeSO₄. 7H₂O; 100 mg de MnCl₂ 4H₂O; 100 mg de ZnSO₄. H₂O; 100 mg de CaCl₂. H₂O e água destilada q.s.p. 100 mL). Os frascos foram incubados em agitador orbital (200 rpm) a 28°C por um período de 120 horas e a cada 24 horas, alíquotas de 5mL foram retiradas e centrifugadas a 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para o estudo atividade antimicrobiana. A massa celular obtida após a centrifugação foi lavada com 2mL de água destilada e mantida em estufa a 75°C por 24 horas para a determinação da biomassa seca por gavimetria.

Planejamento fatorial para Produção de inibidores de β -lactamases

O estudo da produção de inibidores de β -lactamases foram realizados baseados em um planejamento fatorial completo proposto por Bruns e colaboradores., (2002). Foram avaliadas variáveis em diferentes níveis, de acordo com a literatura (AHARONOWITZ e DEMAIN, 1978; VIANA et al., 2009) tais como, concentrações das fontes de nitrogênio e de carbono e o pH, utilizando um planejamento 2³ composto por 8 ensaios e 4 pontos centrais (Tabela 1), Foram selecionadas duas variáveis resposta: atividade antimicrobiana e biomassa. Após os experimentos foram realizadas as análises estatísticas dos resultados, com o auxílio do softwarer *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc , 2008).

Tabela 1- Níveis dos fatores utilizados no estudo das melhores condições de cultivo dos inibidores de β -lactamases

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
pH	6,0	6,5	7,0
Fonte de carbono (%p/v)	0,5	0,75	1,0
Fonte de nitrogênio (% p/v soja)	1,0	2,5	4,0

Determinação da atividade antimicrobiana através da técnica de difusão em disco e poço.

A atividade dos inibidores de β -lactamases no líquido metabólico obtido da fermentação de *Nocardia* sp. DPUA 1571 foi estimada empregando-se o método biológico de difusão em disco descrito por Ericsson e Sherris (1971) e difusão em poço.

Na técnica de difusão em disco, placas contendo Ágar Mueller Hinton adicionado de uma solução de benzil-penicilina G (0,01µg/mL), onde foram semeadas com uma suspensão dos microrganismos teste *K. pneumoniae* ATCC 29665 e *S. aureus* isolado de mastite bovina, crescidos em meio Tryptic Soy Broth (TSB) a 37°C por 24 horas com concentração de 10⁸ UFC/mL o que corresponde a uma solução padrão de McFarland a 0,5, ou seja, um valor de absorbância igual a 0,1 a 625nm. Nestas placas foram adicionados discos de papel de filtro de 6mm de diâmetro impregnados com 20µL dos líquidos metabólicos livre de células e as placas foram incubadas a 37°C por 24h.

Para o teste de difusão em poço, o mesmo meio de cultura foi utilizado e distribuído em placas de Petri, onde foi semeada uma suspensão dos microrganismos testes, na mesma concentração utilizada no teste de difusão em disco. No centro das placas de Petri foram realizados orifícios de 6mm de diâmetro onde foram adicionados 50µL do líquido metabólico produzido pelos actinomicetos selecionados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição expressos em mm. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do líquido metabólico produzido por fermentação de *Nocardia* sp. DPUA 1571 foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo. As amostras dos microrganismos testes foram inoculadas em meio (TSB) e incubadas à 37°C por 24 horas. Após, este período a cultura foi diluída até uma concentração de aproximadamente 5 x 10⁵ UFC/mL de caldo, utilizando-se como referência a escala de turbidez 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a um valor absorbância igual a 0,1 (625nm). Aliquotas de 5µL desta cultura foram depositadas em poços de microplacas de fundo redondo em até 15 minutos após a normatização do inóculo, um volume de 45µL do caldo Muller Hinton adicionado de benzil-penicillina G (0,02µg/mL) foi adicionado ao poço. Um volume de 50 µL do líquido fermentado por *Nocardia* sp. DPUA 1571 foi adicionado no primeiro poço de cada linha e diluído no fator 1:2 até a concentração mínima de 1:9. As microplacas foram incubadas à 37 °C por 24 horas. Foi observado o crescimento bacteriano nas diferentes concentrações do líquido fermentado e considerou-se a

concentração inibitória mínima a maior diluição de antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano.

Dosagem da concentração de glicerol

A concentração de glicerol no líquido metabólico foi determinada de acordo com Hae Bok and Demain (1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da produção de inibidores de β -lactamases por *Nocardia* sp DPUA 1571 de acordo com o planejamento fatorial completo estão apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que os melhores resultados de inibição dos microorganismos teste (*K. pneumoniae* ATCC 29665 e *S. aureus* resistentes a penicilina) foram obtidos com concentração do filtrado de soja a 1,0% (ensaios 3 e 5). Os maiores diâmetros dos halos de inibição foram detectados após 120 horas de crescimento de *Nocardia* sp DPUA 1571 em cultura submersa, sendo de 20mm frente *S. aureus* e de 22mm frente *K. pneumoniae* ATCC 29665.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores da biomassa em peso seco, consumo do glicerol e os diâmetros dos halos de inibição (mm) obtidos para os microorganismos teste (*K. pneumoniae* ATCC 29665 e *S. aureus* resistentes a penicillina) através da técnica de difusão em disco ao longo do período de cultivo no ensaio 3 (concentração de glicerol 1,0%; filtrado de soja 1,0% e pH 6,0). O líquido metabólico produzido pela fermentação de *Nocardia* sp DPUA 1571 só foi capaz de inibir o crescimento bacteriano após 96 horas de cultivo, apresentando maiores halos de inibição (16,0mm para *K. pneumoniae* ATCC 29665 e de 14,0mm para *S. aureus*) após 120 horas de cultivo.

Tabela 2- Resultados do planejamento fatorial 2³ para a produção de inibidores de β -lactamases.

Ensaio	Filtrado de soja (%)	Glicerol (%)	pH	Técnica de difusão em poço			
				Halos de inibição (mm)			
				<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665		<i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina	
				96 horas	120 horas	96 horas	120 horas
1	1	0,50	6,0	12,50	17,0	13,0	18,0
2	4	0,50	6,0	10,00	12,0	9,0	11,0
3	1	1,00	6,0	17,00	22,0	14,0	20,0
4	4	1,00	6,0	10,00	15,0	9,0	13,0
5	1	0,50	7,0	12,00	19,0	11,0	20,0
6	4	0,50	7,0	12,50	13,5	10,0	14,0
7	1	1,00	7,0	11,00	17,5	9,0	16,0
8	4	1,00	7,0	9,00	15,0	9,0	14,5
9 (C)	2,5	0,75	6,5	13,00	18,0	9,0	19,0
10 (C)	2,5	0,75	6,5	11,00	17,0	10,0	19,0
11 (C)	2,5	0,75	6,5	11,00	18,0	10,0	20,0
12 (C)	2,5	0,75	6,5	12,50	18,0	10,0	16,0

Os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram obtidos na fase estacionária de crescimento microbiano, com consumo da fonte de carbono, após 120 horas de cultivo. Estes resultados diferem dos obtidos por Ortiz et al. (2007), os quais estudaram a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* utilizando soja e derivados como fontes de nitrogênio. Estes autores observaram que a fonte de carbono utilizada foi consumida totalmente, antes das primeiras 40 horas de cultivo, enquanto que a melhor produção do inibidor de β -lactamase foi obtida após 100 horas de cultivo. No nosso estudo o consumo da fonte de carbono foi tardia, o que indica que ocorreu o fenômeno de dioxia, a fonte de nitrogênio (farinha de soja) foi primeiramente consumida, e apenas após 120 horas de cultivo a fonte de carbono (glicerol) foi consumida, período este onde foram obtidos os melhores resultados para a atividade antimicrobiana (Tabela 3).

Segundo Mayer e Deckwer (1996) durante a produção de ácido clavulânico por *S. clavuligerus* em meio utilizando farinha de soja como fonte de nitrogênio é possível que a presença de partículas da farinha de soja presentes no meio de cultivo leve a formação de hidrolases e particularmente proteases extracelulares produzidas por *S. clavuligerus*, induzindo a contínua degradação da farinha de soja durante a fase exponencial de crescimento, e assim forneceria uma fonte constante de nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo. Este fenômeno pode ter ocorrido no nosso estudo, pois a farinha de soja foi consumida inicialmente.

Os metabólitos secundários, como por exemplo, os antibióticos, são sintetizados por várias vias metabólicas e também por espécies geneticamente distintas, sendo sua produção afetada por diferentes condições ambientais. Parâmetros da fermentação tais como tempo, temperatura, pH e nutrientes, podem ser modificados visando ampliar a quantidade dos metabólitos secundários produzidos por microrganismos (PFEFFERLE et al., 2000).

Tabela 3. Concentração de glicerol e valores de peso seco no cultivo de *Nocardia* sp. DPUA 1571 em comparação com halos de inibição apresentados para os microrganismos teste utilizados (*K. pneumoniae* DPUA 1571 e *S. aureus*) utilizando a técnica de difusão em disco com concentração de glicerol 1,0%; filtrado de soja 1% e pH 6,0 (ensaio 3).

Tempo (horas)	Peso seco (gramas)	Concentração de glicerol (mg/mL)	Diâmetro dos halos de inibição frente	
			<i>K. pneumoniae</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
0	10,0	0,63	-	-
24	10,4	0,62	-	-
48	19,5	0,58	-	-
72	22,9	0,59	-	-
96	31,1	0,56	11,0	11,0
120	15,7	0,15	16,0	14,0

As Figuras 1, 2 e 4 apresentam o gráfico de Pareto, que apresenta os efeitos estimados das variáveis e das interações entre as variáveis (concentração de filtrado de soja, concentração de glicerol e pH) sobre as respostas (atividade antimicrobiana e biomassa) em ordem de magnitude. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significativos, ou seja, as barras que se estenderem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos com nível de confiança de 95% ou $p=0,05$

A análise estatística dos resultados foi inicialmente realizada para a variável resposta biomassa (Figura 1), a qual apresentou a concentração de filtrado de soja como à única variável com efeito positivo e estatisticamente significativa, ou seja, uma maior concentração da fonte de nitrogênio favoreceu o crescimento bacteriano.

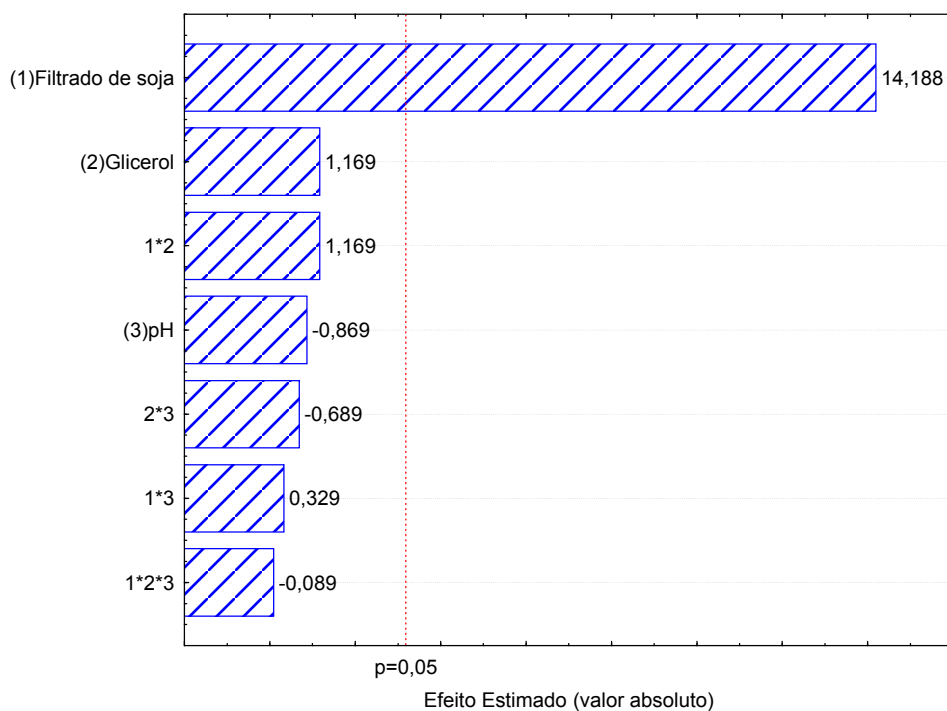


Figura 1- Gráfico de Pareto da produção de inibidores de β -lactamases por *Nocardia* sp. DPUA 1571 tendo como variável resposta a biomassa

A farinha de soja utilizada neste estudo pode ser considerada como fonte de nitrogênio, porém os esqueletos carbônicos dos aminoácidos gerados a partir da hidrólise por proteases podem ser utilizadas também como fonte de carbono (Mayer e Deckwer, 1996). Além da farinha de soja poder ser utilizada como fonte de nitrogênio e

de esqueletos carbônicos, ela é um substrato de baixo custo, quando comparado com outras proteínas de soja (Ortiz et al., 2007), sendo comercializada a US\$ 0,30/kg em fevereiro de 2010 segundo Index Mundi (2010).

A análise estatística dos resultados foi realizada para a variável atividade antimicrobiana frente *K. pneumoniae* ATCC 29665 durante as 120 horas de fermentação. Porém, apenas nos tempos de 96 e 120 horas o líquido metabólico apresentou halos de inibição, sendo em 120 horas a maior produção de inibidores de β -lactamases, com halos de inibição que variaram de 12 a 22 mm com a técnica de difusão em poço (Tabela 2).

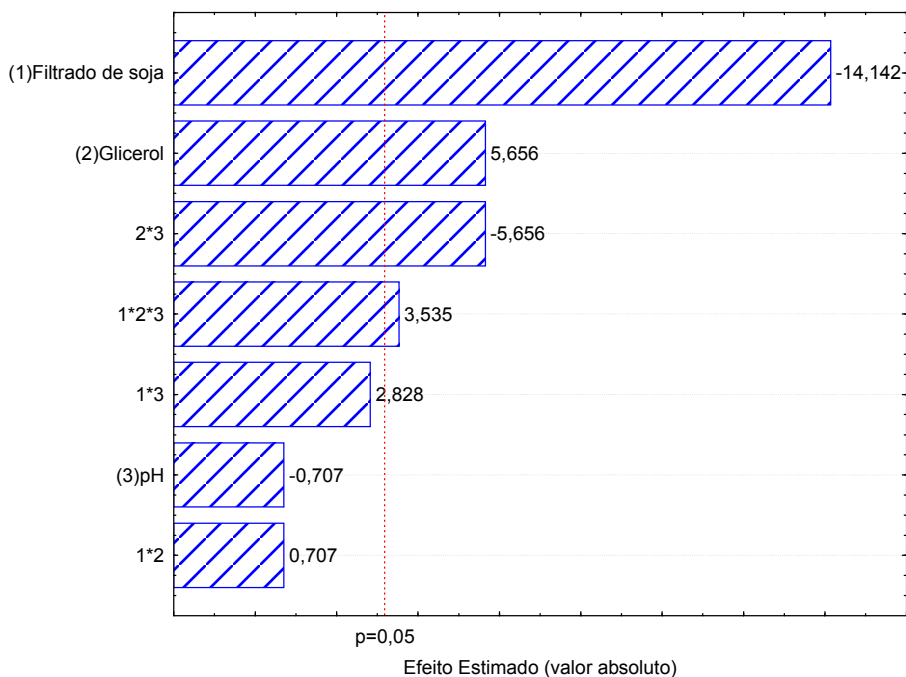


Figura 2- Gráfico de Pareto da produção de inibidores de β -lactamases por *Nocardia* sp . DPUA 1571 para a variável resposta atividade antimicrobiana (halos de inibição) frente a *K. pneumoniae* ATCC 29665 após 120 horas de cultivo.

A Figura 2 mostra os efeitos das variáveis sobre a atividade antimicrobiana frente a *K. pneumoniae* ATCC 29665 e as concentrações do filtrado de soja (1) e do glicerol (2) apresentaram efeitos significativos. Também pode-se observar interações significativas entre duas (1x2) e três (1x2x3) das variáveis estudadas.

O filtrado de soja apresentou efeito negativo sobre a produção de inibidores de β -lactamases, ou seja, uma maior concentração desta fonte de nitrogênio inibiu a produção deste metabólito. Resultados similares foram apresentados por Ortiz et al., (2007) os quais observaram que os carboidratos presentes na farinha de soja não foram consumidos pelo *S. clavuligerus*, não tendo influenciado a biossíntese de inibidor de β -lactamase (ácido clavulânico).

A concentração de glicerol como fonte de carbono apresentou efeito positivo sobre a produção de inibidores de β -lactamases, significando que uma maior concentração de glicerol favoreceu a produção do inibidor de β -lactamase. Similarmente ao ocorrido neste estudo, Gouveia e colaboradores (2001), os quais estudaram a otimização da composição do meio de cultivo para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, estes autores observaram baixos níveis de concentrações de glicerol no final da fermentação, tendo o consumo do glicerol influenciado positivamente para a produção do inibidor de β -lactamase.

As interações entre três variáveis são mais bem compreendidas utilizando a representação do gráfico cúbico, o efeito da interação entre a concentração da fonte de nitrogênio, concentração de fonte de carbono e o pH sobre a atividade antimicrobiana frente a *K. pneumoniae* ATCC 29665 após 120 horas de cultivo está representada na Figura 3. O maior valor de efeito indicou que as condições filtrado de soja a 1,0%, glicerol a 1,0% e pH 6,0 foram as melhores para a produção de inibidores de β -lactamases.

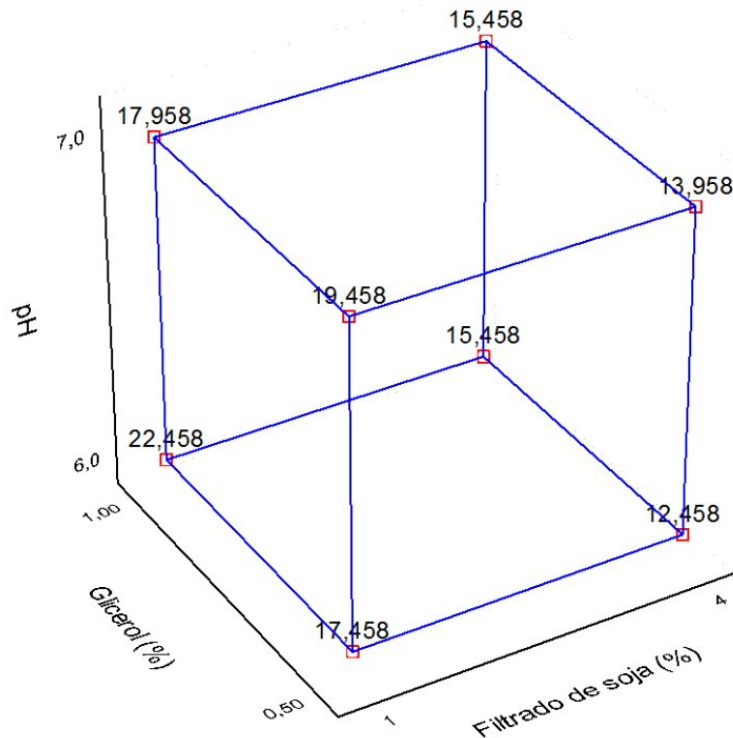


Figura 3. Gráfico da atividade antimicrobiana frente à *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 em diferentes níveis de pH, concentração de farinha de soja e concentração de glicerol de acordo com o planejamento fatorial descrito na Tabela 2.

A concentração do filtrado de soja apresentou efeito negativo sob a atividade antimicrobiana frente à *K. pneumoniae* ATCC 29665, como apresentado na Figura 4. Neto et al (2005) estudaram a influência da fonte de nitrogênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* esses autores supõem que uma concentração elevada de fonte de nitrogênio (3% de Samprosoy 90NB) podem inibir ou reprimir a formação deste inibidor de β -lactamases.

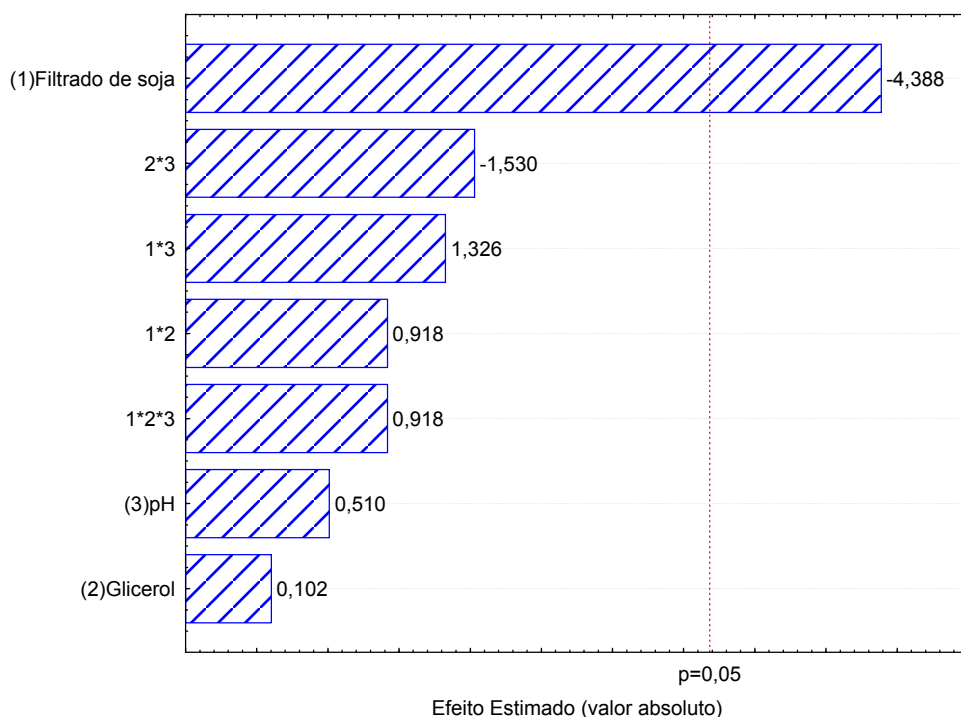


Figura 4- Gráfico de Pareto da produção de inibidores de β -lactamases por *Nocardia* sp. DPUA 1571 para a variável resposta atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* isolado de mastite bovina após 120 horas de cultivo.

A atividade antimicrobiana do líquido metabólico produzido por *Nocardia* sp. DPUA 1571 frente *S. aureus*, apresentou halos de inibição após 96 e 120 horas que variaram entre 9,0 e 20,0 mm utilizando a técnica de difusão em poço. Após a análise estatística dos resultados observou-se que apenas a concentração do filtrado de soja apresentou um efeito significativo negativo para a produção de inibidores de β -lactamases, ou seja, uma menor concentração do filtrado de soja favoreceu o aumento do halo de inibição (Figura 4). Os resultados de susceptibilidade para a *K. pneumoniae* ATCC 29665 e *S.aureus* isolados de mastite, resistentes à penicilina foram semelhantes, sendo o efeito da variável concentração da farinha de soja, o mais significativo para a produção de inibidores de β -lactamases.

Na literatura são encontrados trabalhos que descrevem a utilização de diferentes fontes de nitrogênio, os meios de cultura utilizados para o cultivo de *S. clavuligerus* na produção de ácido clavulânico, em geral contêm fontes de nitrogênio complexas que

variam entre 0,1 a 10% (v/v), tais como extrato de levedura, proteína vegetal, proteínas de sementes e fontes de proteínas hidrolisadas, além dessas, as proteínas da soja demonstraram ser de grande importância para a produção deste inibidor de β -lactamase (Butterworth, 1984; Gouveia, 2001). Spizek et al. (1995) ressaltam as vantagens da utilização de derivados de soja como constituintes do meio de cultura em processos fermentativos envolvendo actinomicetos. Em seus estudos Mayer e Deckwer (1996) descreveram a utilização de meio de cultura a base de farinha de soja. A farinha de soja é uma boa fonte de nitrogênio, o que pode explicar a alta produtividade de ácido clavulânico obtida neste trabalho.

A Tabela 4 apresenta os resultados do teste da concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano, o líquido metabólico depois de diluído na proporção de 1:2 em associação com a penicilina foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos testes, na proporção de 1:3 inibiu apenas 4 dos microrganismos testados, não houve, inibição nas demais diluições, esses resultados confirmam a presença dos inibidores de β -lactamase no líquido metabólico. Serão necessários estudos futuros para purificar e identificar esses compostos.

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima do líquido metabólico produzido por *Nocardia* sp. DPUA 1571 após 120 horas de cultivo.

Diluições do líquido metabólico	Microrganismos Teste										
	Kp	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S7	S9	S10
1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:3	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kp: *K. pneumoniae*; S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10: *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina; (+) houve inibição; (-) não houve inibição

CONCLUSÕES

Neste estudo foi investigada a influência das variáveis para a produção de inibidores de β -lactamase por *Nocardia* sp. DPUA 1571 isolado de líquens da Região Amazônica, de acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que maiores concentrações da fonte de carbono (1,0%), menores concentrações do filtrado de soja (1%) e o pH 6,0 foram as melhores condições para a produção desse metabólico

secundário, que em associação com a penicilina foi capaz de produzir halos de inibição frente aos microrganismos resistentes à penicilina. Serão necessários estudos posteriores visando a otimização da produção, bem como identificação e purificação desses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aharonowitz, Y.; Demain, A. L. (1978), Carbon Catabolite Regulation of Cephalosporin Production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 14, p. 159-164.

Baggaley, K.H., Brown, A.G.; Schofield, C.J. (1997). Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Natural Products Reports*, v.14, p.309-333.

Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; Barros-Neto, B. (2006). Statistical design—Chemometrics. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Butterworth, D. (1984) Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, ed. E. J. Vandamme, NY, M. Dekker, Inc., p.3-31.

Carneiro-da-Cunha, M. N., Viana Marques, D. A., Lima-Filho, J. L., Simas, M. F. T., Porto, T. S., Porto, A. L. F. (2009), Produção de Inibidores de β -lactamases por Actinomicetos Isolados de Líquens da Região Amazônica. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal - Brasil.

Elander, R. P. (2003) Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.61, n. 5-6, p.385-392.

Ericsson, H.M.; Sherris, J.C. (1971) Antibiotic sensitivity testing-Report of an International Collaborative Study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, n.217, p.1-90.

Foulstone, M.; Reading, C. (1982). Assay of amoxicillin and clavulanic acid, components of augmentin, in biological fluids with performance liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.22, p.753-762.

Gouveia, E. R. (2001), Desenvolvimento do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585. Tese de Doutorado, APG-DEQ/UFSCar, São Carlos, Brasil. pp. 133-172.

Hae Bok, S., & Demain, A. L. (1977). *Analytical Biochemistry*, 81, 18–20.

Koneman, E.W., Allen, S. D., Janda, W. A., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. (2001). *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido 5.ed.* Rio de Janeiro: MEDSI, p.551-588.

INDEX MUNDI (2010). Disponível em: <<http://www.indexmundi.com/pt/pre%C3%A7os-de-mercado/?mercadoria=farinha-de-soja>> Acessado em: 17 de março de 2010.

Lee, N., Yuen, K. Y., Kumara, C. R. (2003), Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs*, v. 63, p. 1511-1524.

Li, R.; Townsend, C. A. (2006). Rational strain improvement for enhanced clavulânico acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic Engineering* n.8 p.240–252.

Mayer A. F, Deckwer W. D. (1996) Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.45: p.41–6.

Medeiros, E. S.; Mota, R. A.; Santos, M. V.; Freitas, M. F. L.; Pinheiro Júnior, J. W.; Teles, J. A. A. (2009). Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.* v.29 n.7 p.569-574.

Miller, L. A.; Ratnam, K.; Payne, D. J. (2001) b-Lactamase inhibitor combination sinthe 21st century: current agents and new developments. *Curr. Opin. Pharmacol.* n.1, p.451–458.

NCCLS - National Comité Clinical Laboratory Standards (2003), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*;

Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Neto, A. B., Hirata, D. B., Cassiano-Filho, L. C. M., Badino-Júnior, A. C., Hokka, C. O. (2006) Influência da Concentração da Fonte de Nitrogênio na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos - Brasil.

Oliveira, P. M. S. Seleção de *Streptomyces* spp produtores de inibidores de beta lactamases (2004). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de produtos Bioativos) Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de produtos Bioativos, UFPE, Pernambuco.

Oliveira, J. H. H. L.; Granato, A. C.; Hirata, D. B.; Hokka, C. O.; Barboza, M. (2009). Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Quim. Nova*, v.32, n.8, p. 2142-2150.

Ortiz, S. C. A.; Hokka, C. O.; Badino-Jr, A. C. (2007), Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p.1071-1077.

Payne, D. J.; Cramp, R.; Winstanley, D. J.; Knowles, D. J. C. (1994). *Antimicrob. Agents Chemother.* p.767

Pfefferle, C.; Theobald, U.; Gürtler, H.; Fiedler, H.P. (2000), Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*, v. 80, p. 135-142.

Piddock, L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clin Microbiol Rev* n.19 p.382-402.

Porto, A. L. F., Campos-Takaki, G. M. and Lima Filho, J. L. (1996) Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. *Appl. Biochem. Biotech.*, n.60, p.115-122.

Pridham, T. G.; Aderson, P.; Foley, C.; Lindenfelser, L. A.; Hesseltine, C. W.; Benedict, R.G. (1957), A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of Streptomyces. *Antibiotics Manual*, p.947-953.

Sanders, C. C.; Sanders, W.E. (1992). b-lactam resistance in gram-negative bacteria: global trend sand clinical impact. *Clin Infect Dis* n.15 p.824–39.

Spizek, J. and Tichy, P. (1995) Some aspects of overproduction of secondary metabolites, *Folia Microbiologica*, v.40, N.1, p.43-50.

Statsoft, Inc. (2008). STATISTICA (data analysis soft-ware system), version 8.0.

Sykes, R. B.; Matthew, M. (1976). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, n.2 p.115–57.

Thakur, D., Yaday, B. K. G., Bora, T. C. (2007). Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal de Mycologie Médicale*, n.17, p.242-249.

Viana D. A.; Carneiro-Cunha, M. N.; Araújo J. M.; Barros-Neto, B.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Pessoa-Júnior, A.; Porto, A. L. F. (2009) Screening of Variables Influencing the Clavulanic Acid Production by Streptomyces DAUFPE 3060 Strain. *Appl Biochem Biotechnol*, DOI10.1007/s12010-009-8671-3.

Willians, J. D. (1999), β -lactamases and β - lactamases inhibitor. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.12, p S3-S7.

Yu, T. W.; Shen, Y.; Doi-Katayama, Y.; Tang, L.; Park, C.; Moore, B. S.; Hutchinson, C. R.; Floss, H. G. (1999). Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketides chains processively. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.9, p.9051-9056.

Anexo I



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Política editorial](#)
- [Preparação dos manuscritos para publicação](#)
- [Citações bibliográficas](#)
- [Submissão dos trabalhos](#)

ISSN 0102-0935 *versão*

impressa

ISSN 1678-4162 *versão online*

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Política editorial

Publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser

apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo.* México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo.* México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: *National Academy of Sciences*, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos*

de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Submissão dos trabalhos

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico
www.abmvz.org.br

Taxas de publicação

Taxa de submissão. O pagamento, no valor de R\$30,00, será feito por meio de boleto bancário (emitido quando da submissão do artigo). O autor deverá informar os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.