



Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara

Bachiega, G.L.¹; Vilegas, W.²; Ujikawa, K.^{3*}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara.

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP.

³Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Recebido 03/03/05 / Aceito 13/07/05

RESUMO

Com o aumento significativo na incidência de infecções fúngicas invasivas durante a última década, principalmente em pacientes com câncer, AIDS, ou hospitalizados por período prolongado em unidades de terapia intensiva, há a necessidade da pesquisa de novos agentes antifúngicos com qualidade superior aos existentes. Esta pesquisa objetivou a procura de um microrganismo produtor de substâncias antibacterianas e antifúngicas. Microrganismos das amostras de solo da região de Araraquara, Brasil, foram coletados e analisados quanto ao seu potencial antimicrobiano contra microrganismos padrões (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus oryzae*). Das 64 cepas isoladas, 34 apresentaram atividade antimicrobiana. A cepa Ar 4014 foi escolhida para dar continuidade ao trabalho por apresentar boa atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*. Estudos fermentativos mostraram que os Meios 608-K e 602-B foram os melhores para produção e extração de substâncias antifúngicas de Ar 4014. Após cromatografia em coluna de sílica do extrato bruto, as frações ativas obtidas mostraram picos de absorção UV-VIS característicos de pentaenos normais. O antibiótico foi denominado provisoriamente Ara 4014-75.

Palavras-chave: Antibiótico Ara 4014-75, *Streptomyces*, pentaenos, antifúngico, rastreamento.

ABSTRACT

Antifungal antibiotic produced by a streptomycete isolated in the region of Araraquara (SP), Brazil

With the significant increase in the incidence of invasive fungal infections during the last decade, mainly in patients with cancer, AIDS and other hospitalized patients who stay for long periods in intensive care units, there is an urgent need to screen for new antifungal agents possessing some advantages over known ones. This article reports a search in the field for a microorganism producing antibacterial and antifungal substances. Strains from soil samples collected in the region of Araraquara, Brazil, were isolated and analyzed for their antimicrobial potential against standard microorganisms (fungi *Candida albicans* and *Aspergillus oryzae* and bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). Out of the 64 strains isolated, 34 produced detectable antimicrobial activity. The streptomycete strain Ar4014 was chosen for further study, owing to its good antimicrobial activity against *Candida albicans*. Two of the fermentation media tested, 608-K and 602-B, were found to be best for the production and extraction of the antibiotic from Ar4014. After chromatographic separation of the crude extract on a silica column, the active fractions obtained showed UV-VIS absorption peaks characteristic of normal pentaenic antibiotics. The antibiotic was provisionally designated Ara 4014-75.

Keywords: Antibiotic Ara 4014-75, *Streptomyces*, pentaene, antifungal, screening.

*Autor correspondente: Keidi Ujikawa - Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil. E-mail: ujikawa@uol.com.br, Fone. 016-3301-6965, Fax: 016-2220073.

INTRODUÇÃO

O solo é um vasto reservatório de microrganismos. Grande parte destes microrganismos é encontrada na rizosfera que pode conter 2 toneladas de microrganismos/hectare (Nwosu, 2001). As bactérias representam uma das mais diversas formas de vida da Terra e podem consistir em mais de um milhão de espécies (Kennedy, 1999). Em solos agrícolas elas chegam a 10⁶/g e em solos de florestas chegam a 10⁹/g (Nwosu 2001). Sabe-se que o maior grupo promissor de microrganismos capaz de produzir antibiótico são os actinomicetos (Sanglier et al., 1993).

A pesquisa de novos antibióticos continua, pois tem o objetivo de combater patógenos, bactérias e fungos naturalmente resistentes e micróbios previamente susceptíveis a desenvolver resistência, melhorar propriedades farmacológicas, combater tumores, vírus e parasitas. Na pesquisa de novos antibióticos, muitos dos novos produtos são feitos por modificações químicas de antibióticos naturais, ou seja, pela via semi-sintética (Demain, 2000). Outras estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos incluem a triagem clássica de produtos naturais ou substâncias sintéticas, o projeto de compostos contra alvos moleculares além da abordagem do seqüenciamento genômico e bioinformática (Groll et al., 1998).

Durante a última década, houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas invasivas observadas em várias categorias de pacientes, incluindo aqueles com câncer, AIDS e hospitalizados por períodos prolongados em unidades de terapia intensiva (Nwosu, 2001). Os fungos do gênero *Candida* são os mais frequentemente isolados hoje de pacientes hospitalares (Dean & Burchard, 1996).

No laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da FCF-UNESP, onde foi realizado o presente trabalho, já foram isoladas diversas cepas de microrganismos produtores de antibióticos tais como 26 deoxilaidomicina (Ujikawa, 1995, 1996, Ujikawa et al. 1996), e antibióticos antifúngicos poliênicos dos grupos de heptaenos, hexaenos, pentaenos, tetraenos e antifúngicos não polienos (Oliveira, 1999, Ujikawa, 1999, 2000, 2001a, 2001b, 2003, Ujikawa & Vilegas, 1999a, 1999b). A triagem de compostos poliênicos em ambientes naturais tem sido um aliado na pesquisa de novas drogas antifúngicas.

Os objetivos desta pesquisa foram isolar novas cepas de microrganismos produtores de antibióticos da microbiota

de solos da região de Araraquara; selecionar uma cepa com boa atividade para a produção de antibiótico e realizar estudos para o isolamento da substância ativa e sua caracterização estrutural.

MATERIAIS E MÉTODOS

Meios de cultura: Foram preparados os seguintes meios: meios 29, 534 e 535 (Ujikawa 1995, 1996); 602-B (Ujikawa, 2001b), 605 (Gopalkrishnan et al, 1968); 606 (Linke, 1974); Meio Amido Caseína (ACN) (Kuster et al., 1964); meio de Czapeck (Mc Guinis, 1980); meio Garrad (Schlingmann, 1999); meios ISP3, ISP4, ISP5 e ISP7 (Shirling & Gottlieb, 1966); meio MCIIA (Farmacopéia Brasileira 1988); meio farinha de semente de algodão; meio extrato de levedura composto pelo meio ISP2 sem agar e meio de aveia composto de meio ISP3 sem agar (Shirling & Gottlieb, 1966). O meio 581 foi composto de amido solúvel 35,0 g; farinha de semente de algodão 8,0 g; carbonato de cálcio 7,0 g; sulfato de amônio 7,5 g; cloreto de amônio 1,5 g e água destilada 1 Litro (Ujikawa, roteiro de Biotecnologia Farmacêutica, 2000). O meio 599 foi preparado segundo Ujikawa & Vilegas, 1999a e o meio 604-3 foi composto de glicose 50,0 g; CaCO₃ 10,0 g; macerado de milho 30,0 g e água destilada 1,0 Litro.

Isolamento de novos microrganismos: Foram coletadas assepticamente 10 amostras de solo da região de Araraquara-SP das quais foram preparadas suspensões com 10,0 g de cada amostra de solo e 90,0 mL de solução salina 0,9% estéril. Após, os frascos foram agitados em agitador rotativo e uma alíquota de 10,0 mL de cada suspensão foi diluída em 90,0 mL de solução salina (10⁻²), das quais foram feitas diluições seriadas das amostras de solo até 10⁻⁵. Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram semeadas por espalhamento em placas de Petri contendo meio ACN que foram incubadas por 4-10 dias a 29°C. Após incubação foram isoladas através de repique colônias de Actinomicetos e fungos para placas de Petri contendo Meio 29, que foram incubadas por 7 dias a 29° C na estufa. Cada colônia isolada foi transferida para tubos de ensaio contendo Meio 29.

Conservação das cepas: As cepas isoladas foram conservadas à temperatura ambiente, através de repiques quinzenais e mensais em meio 29 e meio ISP-2 e por congelamento.

Placas de Microrganismos padrões para ensaios de atividade inibitória: Foram preparadas placas de ensaio de antibióticos conforme Farmacopéia Brasileira IV (1988), semeadas com bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Gram-negativa *Escherichia coli* Ar70 e os fungos *Candida albicans* MJ322 e *Aspergillus oryzae* Ar 25.

Teste de atividade antimicrobiana: Após o crescimento por 7 dias, foram retirados quadrados de 6 mm das culturas isoladas em meio 29 e colocados em placas de Petri contendo o meio MCAII inoculado com microrganismos padrões utilizados para ensaios de atividade inibitória. Após

24 horas de incubação a 28° foi verificada a ocorrência de halos de inibição (Ujikawa, 1995).

Fermentação dos microrganismos selecionados: Os microrganismos que apresentaram resultados significativos (halo de inibição maior que 9 mm) no teste de atividade antimicrobiana e com características de actinomicetos foram submetidos à fermentação em incubador com agitação orbital nos equipamentos Superohm modelo 25 e Marconi MA420.

A fermentação foi realizada em duas etapas: o desenvolvimento do inóculo e o desenvolvimento da fermentação. Para o desenvolvimento do inóculo adicionaram-se 5 mL de solução salina estéril nos tubos que continham os microrganismos cultivados a 29°C por 7 a 14 dias, movimentando a pipeta sobre o crescimento do microrganismo e transferiu-se um mililitro da suspensão para um frasco erlenmeyer contendo 25 mL de meio 534 o qual foi incubado com agitação orbital de 150 rpm por 5 dias.

Para o desenvolvimento da fermentação uma alíquota de 1mL do inóculo homogeneizado de cada microrganismo foi transferido para um erlenmeyer com 25 mL do Meio 534 e mais 1 mL do inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 25 mL do Meio 604. Os erlenmeyers foram submetidos à fermentação com agitação orbital por 7 dias.

Atividade antimicrobiana: Os caldos fermentados foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em agar (Farmacopéia Brasileira, 1988). Uma alíquota de 0,15 mL de cada fermentado homogeneizado foi transferida para orifícios de “templates” colocadas sobre placas de ensaio de atividade preparadas conforme foi descrito acima. As placas tendo bactérias como microrganismos detectores foram incubadas por 24 horas e as com fungos por 48 horas a 29° C para a leitura dos resultados.

Análise espectroscópica: Após a fermentação alíquotas de 0,1 mL do vinho de fermentação de cada microrganismo foram misturadas num béquer com 9,0 mL de metanol. Depois de filtradas as soluções foram analisadas por varredura UV-VIS em comprimento de onda de 200-450 nm no Espectrofotômetro mod. 1603 Shimadzu Corporation e os títulos calculados (Ujikawa, 2001b, 2003).

Fermentação da cepa Ar 4014: Por apresentar resultados e características convenientes o microrganismo Ar 4014 foi escolhido para dar prosseguimento à pesquisa. Para tanto foram preparados inóculos e feitas fermentações conforme descrito acima, variando-se os meios utilizados: meios 533, 534, 581, 599, 602-B, 604-3, 605, 606B e 608-K, Meio Extrato de levedura, Meio Aveia, Meio Garrad e Meio Farinha de Semente de Algodão, já descritos.

Os meios 534, 602-B e 608-K foram os melhores meios testados, para fermentação, sendo o meio 608-K escolhido para fazer fermentações, a fim de obter maior quantidade de produto para purificações.

Extração do antibiótico: A extração foi feita segundo o esquema constante da **Figura 1**. Foram adicionados a cada frasco erlenmeyer 50,0 mL de metanol. Os frascos foram

agitados por 20 minutos com agitação lenta e adicionados 2 g de celite , a cada frasco.

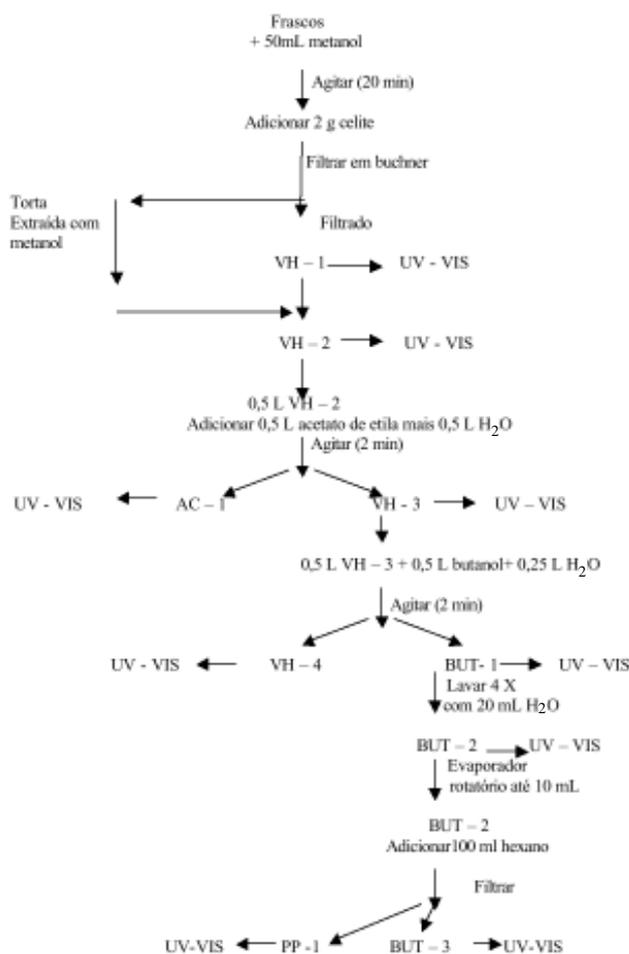


FIGURA 1 - Processo da extração do antibiótico produzido pela cepa Ar 4014

Todos os frascos foram reunidos e filtrados em Buchner com papel de filtro forrado de celite. O vinho filtrado foi chamado de VH-1. Após, passou-se pelo filtro com resíduo metanol e o filtrado foi recolhido no mesmo frasco do VH-1 e foi chamado de VH-2.

Cerca de 0,5 L do VH-2 foi colocado num funil separador de 2,0 L com 0,5 L de acetato de etila e 0,5 L de água. O funil separador foi agitado vigorosamente por 2 minutos. Ao separar as fases, a fração de acetato foi chamada de AC-1. A fase aquosa denominada VH-3 foi recolhida num funil separador e extraída novamente com o mesmo volume de butanol e metade do volume de água destilada. O vinho foi chamado de VH-4 e a fração de butanol foi chamada de BUT-1. Após a fração BUT-1 foi lavada 4 vezes com 20 a 30 mL de água destilada e denominada BUT-2. A fração butanólica foi concentrada no evaporador rotatório a 10 mL. Após concentrar foram adicionados 100 mL de hexano e a mistura filtrada em papel de filtro. O filtrado foi chamado de BUT-3 e o

precipitado de PP-1. Todas as frações foram submetidas à varredura no UV-VIS de comprimento de onda 200 a 450 nm.

Cromatografia em coluna de sílica: O processo de cromatografia em coluna de sílica foi descrito por Komori (1990) O eluente foi preparado com 400 mL de clorofórmio, 400 mL de metanol e 200 mL de água destilada em funil separador de 2 litros que foi agitado vigorosamente. Após separação das fases, a camada inferior foi utilizada. Foi preparada uma coluna de 2,80 cm de diâmetro e 28 cm de comprimento contendo 50 g de sílica gel para cromatografia e 100 mL do eluente. Após a drenagem do eluente, a solução da amostra foi colocada na coluna e desenvolvida com eluente recolhendo os eluídos em frações de 20mL. As frações foram submetidas à varredura espectrofotométrica UV-VIS de 200-450nm para verificar as frações ativas.

Os cálculos dos títulos espectrofotométricos foram feitos segundo Ujikawa (2001b, 2003)

Espectrometria RMN 1H: As frações 67 e 75 foram submetidas à análise por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de prótons realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar em metanol deuterado CD³OD.

Espectrometria Infravermelha: A espectrofotometria no infravermelho foi realizada com as frações 67 e 75 no Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp – Campus Araraquara em pastilhas de KBr (Silverstein et al, 1994).

Espectrometria UV – VIS: Todas as frações recolhidas foram submetidas à espectrometria de varredura de 200 a 450 nm em Espectrofotômetro UV – VIS. 1603 CE Shimadzu Corporation.

Estudo taxonômico do microrganismo: A cepa Ar 4014 foi submetida a estudos taxonômicos de caracterização cultural, morfológica e fisiológica, conforme os métodos descritos por Cross (1994) e Lechevalier (1994).

Microscopia eletrônica de varredura: A microscopia eletrônica de varredura da cultura liofilizada do actinomiceto foi realizada no Instituto de Química da Unesp, Campus de Araraquara sob a assistência do Sr. Sebastião Anésio Dametto.

RESULTADOS

Culturas isoladas e atividade antimicrobiana

Foram coletadas 10 amostras de solo da região de Araraquara que permitiram isolamento de 64 cepas de microrganismos que foram numeradas de Ar 4001 a Ar 4064.

Destas 64 cepas, 34 (53,1%) apresentaram atividade antimicrobiana quando cultivadas em meio sólido, sendo que 21 cepas apresentaram atividade contra *S. aureus*, 17 contra *A. oryzae*, 13 contra *C. albicans* e 6 contra *E. coli*.

A conservação dos microrganismos à temperatura ambiente foi possível em todos os meios utilizados.

Atividade antimicrobiana e análise espectroscópica dos caldos fermentados

Das 34 colônias de microrganismos isoladas que apresentaram atividade antimicrobiana quando cultivadas em meio sólido, 9 foram escolhidas para fermentação em meios líquidos M 534 e M 604. As cepas 4014, 4025, 4027 e 4041 apresentaram boa atividade antimicrobiana quando cultivadas em meio líquido. Os caldos de meios M 534 e M 604, fermentados com as cepas Ar 4014, Ar 4034 e Ar 4025 e submetidos à espectrofotometria em UV-VIS varredura em comprimento de onda de 200-450nm, apresentaram curvas características de políenos.

A cepa escolhida para dar continuidade ao trabalho foi a cepa Ar 4014 devido à sua boa atividade antimicrobiana quando cultivada em meio líquido.

Atividade antimicrobiana dos caldos fermentados com o microrganismo Ar 4014

O microrganismo Ar 4014 foi fermentado nos meios M 606-B, M 605, M 533, M 604-3, M 581, Meio Extrato de levedura, Meio Aveia, Meio Garrad, Meio Farinha de semente de algodão, M 599, M 602-B e M 608-K.

A Tabela 1 mostra que os meios 602-B e 608-K apresentaram melhor atividade contra *C. albicans*.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana da cepa Ar 4014 fermentada em diversos meios.

Meio	<i>S. aureus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. albicans</i>
533	+++	-	+
581	++	-	-
599	+	+	++
602-B	+	+	+++
604-3	-	-	++
605	++	+	++
606-B	+++	-	+
608-K	++	+	+++
Aveia	++	+	+
Extrato de levedura	++	+	+
Garrad	++	-	-
Semente de algodão	+	+	++

Foram realizados novos testes para definir o meio a ser utilizado para a fermentação do microrganismo Ar 4014 (Tabelas 2, 3 e 4) nos meios 534, 602 e 608-k pois a cepa apresentou boa atividade antimicrobiana.

Tabela 2 - Desenvolvimento temporal da atividade inibitória da cepa Ar 4014 fermentada em meio 534.

Tempo (dias)	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. oryzae</i>
4	25 mm	16 mm	12 mm
5	28 mm	17 mm	9 mm
6	32 mm	18 mm	16 mm
7	33 mm	18 mm	11 mm
8	35 mm	16 mm	18 mm
9	26 mm	23 mm	14 mm
10	17 mm	15 mm	13 mm

Tabela 3 – Desenvolvimento temporal da atividade inibitória da cepa Ar 4014 fermentada em meio 602-B.

Tempo (dias)	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. oryzae</i>
4	27 mm	18 mm	16 mm
5	32 mm	19 mm	14 mm
6	35 mm	22 mm	23 mm
7	36 mm	20 mm	22 mm
8	39 mm	19 mm	21 mm
9	19 mm	19 mm	19 mm
10	19 mm	19 mm	17 mm

Tabela 4 - Desenvolvimento temporal da atividade inibitória da cepa Ar 4014 fermentada em meio 608-K.

Tempo (dias)	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. oryzae</i>
4	23 mm	17 mm	12 mm
5	25 mm	20 mm	13 mm
6	29 mm	19 mm	14 mm
7	32 mm	19 mm	15 mm
8	38 mm	21 mm	14 mm
9	23 mm	20 mm	20 mm
10	8 mm	20 mm	18 mm

O meio 608-K foi escolhido por apresentar boa atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *C. albicans*. A concentração do antibiótico apresentou grau máximo no 8º dia, contra *S. aureus* e no 9º dia contra *C. albicans*.

Extração do antibiótico

O antibiótico foi extraído com butanol, lavado com água e precipitado com hexano, tendo sido obtido um precipitado que dissolvido e analisado no espectrofotômetro UV-VIS, apresentou bandas em 348, 330 e 317 nm.

Cromatografia em coluna de sílica

Foram realizadas duas separações por cromatografia em coluna de sílica. No primeiro fracionamento foram recolhidas 58 frações com 20,0 mL cada numeradas de 01 a 58 totalizando 393.731 unidade de pentaenos. No segundo foram recolhidas 46 frações com 20,0 mL cada numeradas de 59 a 104, totalizando 250,275 unidades de pentaeno, correspondente a 63,5% do primeiro fracionamento.

Espectrofotometria de RMN 1H

Os espectros obtidos apresentaram grande complexidade, indicando apresentar uma grande estrutura e possivelmente a presença de impurezas (Pandey et al., 1972, 1976, Silverstein et al., 1994).

Espectrometria Infravermelha

Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5 - Atribuição do espectro infravermelho da fração 75.

Posição	cm-1	Atribuição
A	3392	OH
B	2925	CH (alifático)
C	1627	C=C

Espectrofotometria UV-Vis

A Figura 2 apresenta o espectro UV-VIS da fração 75.

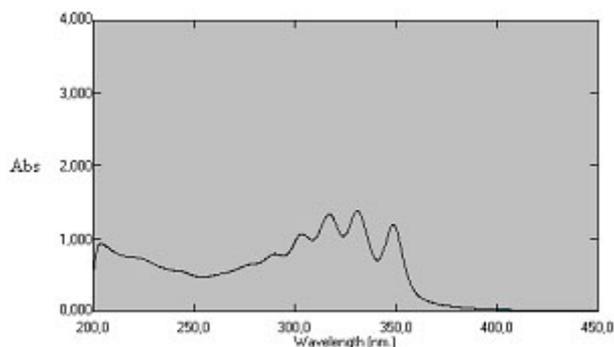


FIGURA 2 - Espectrofotometria UV 0– VIS de 200 a 450 nm da fração 75 do extrato da cepa 4014

A Tabela 6 apresenta as principais bandas do espectro UV-VIS da fração 75.

Tabela 6 - Principais bandas do espectro UV – VIS da fração 75.

Picos	Nm
1	348,60
2	330,60
3	317,00
4	303,40
5	290,00

Estudo taxonômico do microrganismo Ar 4014

A cepa Ar 4014 escolhida para estudo foi submetida a estudos taxonômicos por meio de caracterização cultural, morfológica e fisiológica do microrganismo.

As lâminas foram analisadas no microscópio óptico.

De acordo com a Figura 3 obtida após 21 dias de incubação em meio ISP 2 as culturas apresentaram hifas sinuosas com diâmetros de 0,5 a 1 micrometro e com esporos terminais, sugestivos de *Streptomyces*.



FIGURA 3 – Fotomicrografia da cepa Ar 4014, ao microscópio óptico, após cultivo de 21 dias no meio ISP 2 (1000X).

A Figura 4 apresenta a fotomicrografia eletrônica de varredura da cepa Ar 4014 no meio ISP 2 após 21 dias de cultivo.

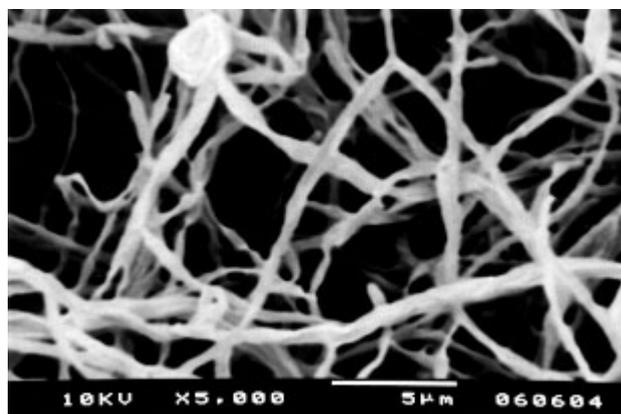


FIGURA 4 - Fotomicrografia eletrônica de varredura da cepa Ar 4014 cultivada em meio ISP 2 por 21 dias

Características fisiológicas

As características culturais da cepa Ar 4014 nos meios 29, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 e ISP7 após 21 dias podem ser vistas na Tabela 7.

Tabela 7 – Descrição da cepa Ar 4014 após 21 dias de cultivo.

Meios	Caracterização da cultura
ISP2	Colônias com diâmetro de 12 mm, de forma circular com margem irregular com aspecto avehulado, cor da frente gelo com borda bege e o verso possui o centro bege com borda gelo, pouco pigmento melanínico, superfície com sulcos, verso liso, crescimento médio.
ISP3	Colônias com aspecto avehulado, forma circular, cor da frente gelo e o verso com o centro creme escuro e borda clara, superfície com o centro mais alto e sulcos, verso liso, crescimento médio, colônias com diâmetro de 10 mm, margem irregular.
ISP4	Colônias com aspecto avehulado, forma circular, cor da frente bege com borda gelo e verso com centro rosa e borda gelo, pigmento melanínico, superfície com o centro mais elevado e verso liso, crescimento lento, diâmetro de 15 mm, margem irregular.
ISP5	Colônias com aspecto avehulado, forma circular, frente com centro amarelo e borda bege e verso com centro amarelo e borda bege, superfície com sulcos e o centro mais elevado e verso liso, crescimento médio, diâmetro de 11 mm, margem irregular.
ISP7	Colônias com aspecto avehulado, forma circular, cor da frente gelo no centro e bege na borda e verso com centro bege escuro e borda clara, pigmento melanínico, superfície com sulcos e mais elevada no centro, verso liso, crescimento médio, diâmetro de 14 mm, margem irregular.
29	Colônias com aspecto avehulado, forma circular, cor da frente centro bege depois gelo e borda bege, verso centro bege e borda gelo, pigmento melanínico, superfície com sulcos e o centro mais elevado e verso liso, crescimento médio, diâmetro de 19 mm, margem irregular.

A cepa Ar4014 foi testada quanto à capacidade de assimilação de açúcares.

Os açúcares utilizados como fonte de carbono foram a D-glicose (como controle positivo) L-arabinose, sacarose, D-xilose, I-inositol, D-manitol, D-frutose, ramnose, rafinose, celulose e meio ausente de açúcar como branco. O resultado foi positivo para L-arabinose, sacarose, I-inositol, D-manitol, frutose, ramnose e rafinose, após incubação por 21 dias. (Tabela 8). Os dados são conflitantes com espécies conhecidas, sendo necessário posterior estudo para conhecimento da espécie.

Tabela 8 - Assimilação de fontes de carbono da cepa Ar 4014.

Fontes de C	Grau de crescimento
D-glicose	+++
L-arabinose	+
Sacarose	+
D-xilose	-
I-inositol	+++
D-manitol	+
D-frutose	+++
Ramnose	+
Rafinose	+
Celulose	-

(-) crescimento menor que o meio basal; (+++) crescimento igual ou superior ao meio basal com glicose; (+) crescimento intermediário.

DISCUSSÃO

A maioria das pesquisas de novos compostos antimicrobianos consiste na triagem clássica de produtos naturais, em projetos de compostos que agem em alvos moleculares e no sequenciamento genômico (Groll et al, 1998). Assim, a pesquisa do potencial antimicrobiano derivado de fontes naturais, como os realizados nesta pesquisa, é justificável, tendo em vista o seu baixo custo.

Neste trabalho foram coletadas 10 amostras de solo da região de Araraquara sendo que 64 cepas de microrganismos foram isoladas e destas, 34 (53,1%) apresentaram atividade antimicrobiana quando cultivadas em meio sólido. Este número é relativamente alto quando comparado a outros autores (Ujikawa, 1995; Oliveira, 1999). As cepas Ar 4014, Ar 4025, Ar 4027 e Ar 4041 apresentaram melhores atividades antimicrobianas quando cultivadas em meio líquido.

As cepas Ar 4014, Ar 4025 e Ar 4034 apresentaram curvas de absorção características de polienos que são caracterizados por um espectro de absorção UV típico devido à presença de ligações duplas conjugadas no anel lactona (Etienne et al., 1990, Omura et al, 1979, Pandey & Rinehart, 1976, Silverstein et al, 1994). Estas duplas ligações subdividem o grupo em trieno, tetraeno, pentaeno, etc.

Vários antibióticos pentaênicos normais de espectros semelhantes já foram isolados inclusive neste laboratório (Bortolo et al, 1993, Nakagomi et al, 1990, Ujikawa, 2000, 2001a, 2001b, 2003, Ujikawa e Vilegas, 1999a) que apresentam geralmente o mesmo perfil de resistência antifúngica. Entretanto poderiam apresentar novas variações

nas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, devidas à possibilidade de várias diferenças nas estruturas secundárias, que podem diferenciar no perfil de permeabilidade através da membrana celular e no acesso a centros ativos das células mutadas, como as cancerosas, de modo que se julgou interessante continuar no estudo deste polieno.

O microrganismo Ar 4014, que apresentava boa reprodutibilidade em meio líquido com relação as atividades antifúngicas e antibacterianas, foi fermentado em 12 meios. Os fermentados desenvolvidos nos meios 602-B e 608-K apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra *C. albicans* embora os melhores espectros UV tenham sido obtidos no meio 599 (Tabelas 1, 2, 3 e 4). A concentração do antibiótico, no meio 608-k, apresentou valor máximo de atividade neste meio no 8º dia contra *S. aureus* e no 9º dia contra *C. albicans*, verificado pelo tamanho do halo de inibição (Tabelas 2, 3 e 4).

A extração do antibiótico produzido pela cepa Ar4014 a partir de caldos de fermentação foi realizada com acetato de etila e depois n- butanol, já que alguns autores verificaram que alguns pentaenos podem ser extraídos com acetato de etila (Oliveira, 1999, Tytell et al., 1955, Ujikawa, 1999), e outros (a maioria) com butanol (Ryu et al., 1999, Ubukata, 1995). A primeira extração com acetato de etila, além de separar alguns tipos de polienos, é útil para retirar impurezas menos polares. O primeiro extrato com acetato apresentou boa atividade antimicrobiana, que com as lavagens com água foi perdida, indicando que o antibiótico só foi extraído com acetato por estar misturado com metanol, isto é, à medida que o metanol é extraído com água de lavagem, o antibiótico também é carregado.

O isolamento de quantidade de antibiótico presente nos extratos, que é pequena, misturado com impurezas dos caldos de fermentação necessita do uso de vários sistemas cromatográficos de separação e ensaios biológicos para acompanhar a atividade inibitória.

O acompanhamento do processo extrativo foi realizado por espectroscopia em UV-VIS no comprimento de onda de 200- 450 nm que mostrou a presença do antibiótico produzido pela cepa Ar 4014 nos vinhos VH-1, VH-2 e VH-3 e no precipitado PP-1. As frações ativas submetidas a dois sistemas cromatográficos de coluna renderam a fração 75, que apresentou maior grau de pureza de acordo com maior absorvidade relativa entre comprimentos de onda de 330 e 250 nm

Os extratos obtidos da fermentação da cepa Ar4014 apresentaram bandas de absorção UV-VIS semelhantes aos antibióticos pentaênicos do tipo da eurocidina (Figura 5, Tabela 6).

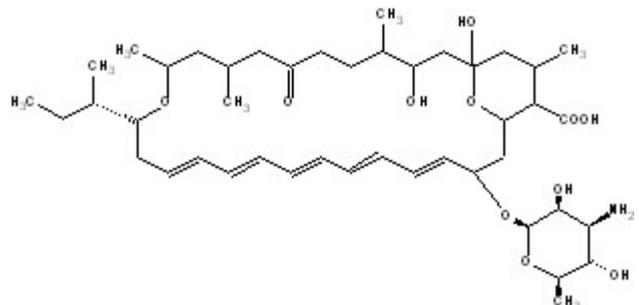


FIGURA 5 - Estrutura do antibiótico eurocidina

Hoje um número relativamente alto de polienos estão descritos como produtos metabólicos dos actinomicetos. Estes compostos podem ser reconhecidos por seu espectro UV – VIS característicos. Entretanto, a estrutura de poucos é conhecida atualmente (Schilingmann et al., 1999).

Os antibióticos pentaenos como a fungicromina (Cope et al, 1962, Nochughi et al, 1988, Robinson et al, 1971), elizabetina (Gopalkrishnan et al., 1968), chainina (Pandey et al., 1972), filipina (Whitfield, et al, 1955), lagosina (Dhar et al, 1964) e estreverteno (Schilingmann, et al., 1999) são conhecidos como antibióticos do grupo metilpentaênicos.

O antibiótico chainina apresenta bandas no UVI-VIS em 308, 324, 342 e 358nm, a filipina em 305, 322, 338 e 355nm e a lagosina em 322, 338 e 357nm.

Antibióticos como a eurocidina (Nakagomi et al, 1990) são conhecidos como pentaenos normais e apresentam bandas no UV – VIS em 317-8, 331-2 e 349-350 nm. O antibiótico isolado da cepa Ar 4014 apresentou bandas no UV-VIS em 317, 331 e 349 nm, portanto é mais semelhante a pentaenos normais, como a eurocidina (Tabela 6). Os pentaenos como filipina, chainina, elizabetina e fungicromina do grupo dos metilpentaenos são caracterizados por bandas no UV-VIS em 322, 338 e 355nm (Schlingmann et al.,1999).

O antibiótico chainina foi isolado de *Chainina mimutisclerotica*, o antibiótico filipina foi isolado do *Streptomyces filipinensis* e o antibiótico lagosina foi isolado do *Streptomyces roseo-luteus*. A fungicromina e lagosina são nomes dados ao mesmo antibiótico, mas são isolados de espécies diferentes de *Streptomyces* (Cope et al, 1962). A eurocidina foi isolada do *Streptoverticillium eurocidicum* (Nakagomi et al, 1990). O *Streptomyces Ar386* isolado neste laboratório produz além do antifúngico pentaênico, o antibiótico polietérico 26-deoxilaidomicina (Ujikawa, 1995, 2000, Ujikawa et al, 1966).

A purificação do antibiótico produzido pela cepa Ar 4014 apresentou dificuldades devido à presença de vários antibióticos semelhantes e por serem bastante instáveis durante o processo de purificação. O perfil cromatográfico mostrou a presença de cinco antibióticos pentaênicos no extrato obtido dos caldos de fermentação. Geralmente estas purificações requerem a realização de várias passagens pela coluna cromatográfica, mas como ocorre degradação concomitante, frequentemente ao invés de purificar, aumentam impurezas provenientes de degradação. Entretanto, o espectro UV na região acima de 300 nm não apresenta muitas interferências e aliado a ocorrência de três picos coincidentes (Tabela 6), permite enquadrar o antibiótico entre os pentaenos normais do tipo de eurocidina (Schlingman et al, 1999). Os detalhes estruturais não foram determinados devido a complexidade e também porque este tipo de antibiótico tem apresentado problemas na sua utilização.

A caracterização cultural da cepa Ar4014 mostrou que as colônias apresentaram aspecto aveludado e forma circular, coloração bege em todos os meios onde o

microrganismo foi cultivado (Tabela 7). Ao microscópio óptico e eletrônico, apresentou hifas de cerca de meio a um micrômetro de diâmetro com poucos esporos (Figs 3 e 4) e como a maioria dos microrganismos do gênero *Streptomyces* é caracterizada por formar longas cadeias de esporos, embora algumas espécies apresentam poucos esporos, a cepa foi incluída neste gênero. Para a caracterização da espécie foi realizado o teste de assimilação de fontes de carbono (Tabela 8), resultando positivo para glicose, I-inositol, D-frutose e crescimento intermediário com os açúcares L-arabinose, sacarose, D-manitol, ramnose e rafinose sendo negativo com D-xilose e celulose, que não permitiram incluir nas espécies conhecidas (Cross, 1994, Lechevalier, 1994).

Muitas vezes a identificação das cepas, além do gênero, é inviável devido ao número e à complexidade dos testes químico-celulares necessários para a taxonomia de Actinomicetos. A análise do genoma não está ainda padronizada para os actinomicetos do solo.

Concluindo, das 64 cepas de microrganismos numeradas de Ar 4001 a Ar 4064, isoladas das 10 amostras de solos coletadas da região de Araraquara, Brasil, 34 cepas (53,1%) apresentaram atividade antimicrobiana quando cultivadas em meio sólido.

A cepa Ar 4014 apresentou maior atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *C. albicans*, *A. oryzae* e atividade antibacteriana contra *S. aureus*.

Este microrganismo foi classificado no gênero *Streptomyces*. Do cultivo da cepa Ar 4014 foi extraído um antibiótico antifúngico que apresenta características espectrométricas e de atividade antimicrobiana semelhantes à eurocidina, do grupo de pentaenos normais o qual foi denominado Ara 4014-75.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Salvador Lepera do Dep. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia de FCF Unesp pela cessão de aparelho espectrométrico, ao Sr. Sebastião A. Dametto do IQ-Unesp pela assistência na Microscopia Eletrônica, as técnicas Maria do Rosário G. Araújo e Luciene R. A. Tomiyama pelo trabalho de apoio e a CAPES, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bortolo R, Spera S, Guglielmetti G, Cassani G. Ab023, novel polyene antibiotics II. Isolation and structure determination. *J Antibiot* 1993; 46(2) 255-64.
- Cope AC, Bly RK, Burrows EP, Ceder OJ, Ciganek E, Gills BT, Potter RF, Johnson HE. Fungichromin, complete structure and absolute configuration. *J Am Chem Soci* 1962 84:2170 –8.
- Cross T. Growth and examination of Actinomycetes: Some guidelines. In: Holt JG, Krieg NR, Sneath PT, Staley JT, Williams ST. *Bergeys's Manual of Determinative*

- Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.p.605-9.
- Dean DA, Burchard K. Fungal infection in surgical patients. *Am J Surgery* 1996; 171:374-80
- Demain AL. Microbial Biotechnology. *Trends Biotechnol* 2000; 18(1):26-31.
- Dhar ML, Thaler VE, Whiting MC. Research on Polyenes. Part VIII. The structure of lagosin and Filipin. *J Chem Soci* 1964; 842-861.
- Etienne G, Armau E, Tiraby G. A screening method for antifungal substances using *Saccharomyces cerevisiae* strains resistant to polyene macrolides. *J Antibiot* 1990; 43(2):199-206.
- Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. V.5.2.17.5.
- Gopalkrishnan KS, Narasimhachari N, Joshi VB, Thirumala-Char MJ. Chainin: a new methylpentaene antibiotic from a species of *Chania*. *Nature*, 1968; 218:597-8.
- Groll AH, Delucca AJ, Walsh TJ. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol* 1998; 6(3):117-24.
- Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment* 1999; 74:65-76.
- Komori T. Trichomycin B, a polyene macrolide from *Streptomyces*. *J Antibiot* 1990; 43(7): 778-82.
- Kuster E, Williams ST. Selection of Media for Isolation of *Streptomyces*. *Nature* 1964;202:928-29.
- Lechevalier HA. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Williams ST. Share EME, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 611.
- Linke HAB, Mechlini W, Schaffener CP. Production of amphotericin B-C by *Streptomyces nodosus*. *J Antibiot*, 1974;27 (3):155-60.
- Mc Ginnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York: Academic Press, 1980. p.133-7
- Nakagomi K, Takeuchi M, Tanaka H, Tomizuka N. Studies on inhibitors of rat mast cell degranulation produced by microorganisms I. Screening of microorganisms and isolation and physico-chemical properties of eurocidins C, D and E. *J Antibiot* 1990;43(5) 462-69.
- Noguchi H, Harrison PH, Arai K, Nakashima TT., Trimble LAA, Veredas JC. Biosynthesis and full NMR assignments of fungichromin, a polyene antibiotic from *Streptomyces cellulosa*. *J Am Chem Soc* 1988; 110:2938-45.
- Nwosu VC. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Microbiology* 2001;152:421-30.
- Oliveira JRS. *Antibiótico antifúngico isolado de um Streptovorticillium do Brasil*. Araraquara, 1999, 74 p. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, Campus de Araraquara.
- Omura S, Tanaka H; Oiwa R, Nagai T, Koyama Y, Takahashi Y. Studies on bacterial cell wall inhibitors. VI-Screening methods for the specific inhibitors of peptidoglycan synthesis. *J Antibiot* 1979; 32:978-84.
- Pandey RC, Narasimhachari N, Rinehart KLJ, Millington DS. Polyene antibiotics. IV-Structure of chainin. *J Am Chem Soc* 1972; 94(12): 4306-10.
- Pandey RC, Rinehart KLJ. Polyene antibiotics. VIII-Carbon 13-nuclear magnetic resonance evidence for cyclic hemiketal in the polyene antibiotics amphotericin B, nystatin A1, tetrin A, tetrin B, lucensomycin and pimaricin. *J Antibiot* 1976;29(18): 1035-42.
- Robison RS, Aszalos A, Kraemer N, Giannini MS. Production of fungichromin by *Streptovorticillium cinnamomeum* subsp. *cinnamomeum* NRL B-1285. *J Antibiot* 1971;24:273.
- Ryu G, Choi WC, Hwang S, Yeo WH, Lee CS, Kim SK. Tetrin C, a new glycosylated polyene macrolide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. GK9244. *J Natural Prod*,1999;62:917-9.
- Sangler JJ, Haag H, Huck TA, FEHR T. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res Microbiol* 1993; 144: 633-42.
- Schlingmann G, Milne L, Borders D, Carter GT. Strevertenes, antifungal pentaene macrolides produced by *Streptovorticillium* LL – 30F848. *Tetrahedron* 1999;55:5977-90;
- Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Systematic Bacteriol* 1966;16(3):313-40.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill, TC. *Identificação de compostos orgânicos*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- Tytell, AA, Mccarthy, FH, Fisher, WP, Bolhofer, WA, Cherney J. Fungichromatin: new polyene antifungal agents. *Antib Ann* 1954-1955:716-718.
- Ubukata M, Shiraishi N, Kobinata K; Kudo T, Yamaguchi I, Osada H. Rs-22 A, B and C: new macrolide antibiotics from *Streptomyces violaceusninger*. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J Antibiot* 1995; 48: 289-92.
- Ujikawa K. *Isolamento e caracterização de um antibiótico polietérico obtido a partir de um microrganismo da região de Araraquara*. Araraquara, 1995, 99 p Tese: livre docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, campus de Araraquara.
- Ujikawa K. Fermentação de 26-deoxilaidlomicina por *Streptomyces* sp. Ar386. *Rev Bras Farm*, Rio de janeiro, 1996; 77:77-80.
- Ujikawa K. Antifungal antibiotic isolated from microbiota of Araraquara region, Brazil. *Boll Chim Farm* 1999; 138(2):136.
- Ujikawa K. *Streptomyces jacareensis* Ar386 produz um

Antibiótico da região de Araraquara

antibiótico antifúngico pentaênico além do antibacteriano 26-deoxilaidlomycina In: *Anais da 47ª Jornada Farmacêutica da Unesp*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, São Paulo. Araraquara, 2000:97.

Ujikawa K. Antifungal antibiotic groups prevalence among native microorganisms of Araraquara region, SP, Brazil. *Eur J Pharm Sci* 2001a;.13(suppl 1): S39.

Ujikawa K. Quantificação da biossíntese de antibióticos polienicos por actinomicetos isolados no estado de São Paulo e pesquisa de meios. *Rev Bras Ciênc Farmac* 2001b; 37 (Supl 2):104.

Ujikawa K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Rev Bras Ciênc Farm* 2003;. 39,

(2):149-158.

Ujikawa K, Vilegas W. Antibiótico antifúngico isolado de microrganismo nativo. *Farm Quím*, novembro, 1999a: 73.

Ujikawa K, Vilegas W. Antibiótico hexaênico isolado de microrganismo da região de Araraquara, SP, Brasil. *Farm Quím.*, novembro 1999b:78.

Ujikawa K, Vilegas W, Vilegas JHY, Llabrès G. Antibiotic 26-deoxylaidlomycin isolated from *Streptomyces* sp. Ar386 from brazilian soil. *Rev Latinoamer Microbiol* 1996;38(3-4):185-191.

Whitfield G B, Brock TD, Ammann A, Gottlieb D, Carter HE. Filipin, an antifungal antibiotic: isolation and properties. *J Am Chem Soci* 1955; 77: 4799-4801.