

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Estabelecimento de meios de cultura para o cultivo de**  
***Streptomyces* isolados de sedimento marinho.**

Mestrando: Luis Henrique Romano

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos – SP

2009

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Estabelecimento de meios de cultura para o cultivo de**  
***Streptomyces* isolados de sedimento marinho.**

**Luis Henrique Romano**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Mestrando: Luis Henrique Romano

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos – SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R759em

Romano, Luis Henrique.

Estabelecimento de meios de cultura para o cultivo de *Streptomyces* isolados de sedimento marinho / Luis Henrique Romano. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Biotecnologia. 2. Compostos bioativos. 3. Antitumoral. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

Luis Henrique Romano

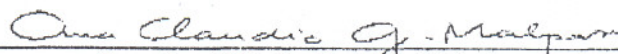
Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

Aprovado em: 16/10/2009

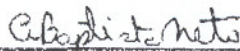
**BANCA EXAMINADORA**



Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (Orientadora)  
Universidade Federal de São Carlos/Departamento de Morfologia e Patologia



Dra. Ana Cláudia Granato Malpass  
Universidade Federal de São Carlos/DEQ



Dr. Alvaro de Baptista Neto  
Empresa Verdris

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.” Albert Einstein

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus. Agradeço a meus pais, José Luis Romano e Maria Luisa Costa Romano, a meus avós Sebastião Romano e Maria Rosa Romano e Irene G. Costa e ao irmão Luis Gabriel Romano pelo apoio e amor, sem os quais nada seria possível.

Obrigado aos amigos Liliane Maciel de Oliveira, Amadeus Gomes de Azevedo, Douglas Ferreira, Ana Cláudia Granato Malpass e Clóvis Saccardo da Silva.

Obrigado também ao amigo e colaborador Álvaro de Baptista Neto por todo auxílio durante e após o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a meus orientadores o professor doutor Carlos Osamu Hokka e a professora doutora Cristina Paiva Sousa.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	I
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	II
<b>RESUMO</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
<b>4.1. MICRORGANISMOS</b> .....	22
<b>4.2. MEIOS DE CULTURA</b> .....	22
<b>4.3. Equipamentos principais</b> .....	24
<b>4.4. METODOLOGIA ANALÍTICA</b> .....	25
<b>4.4.1. Determinação da concentração celular</b> .....	25
<b>4.4.2. Análise das concentrações das fontes de carbono</b> .....	25
<b>4.4.3. Análise das fontes de Nitrogênio</b> .....	26
<b>4.4.4. Estimativa da Velocidade Especifica Máxima de Crescimento Celular e Rendimento de Substrato às Células</b> .....	28
<b>4.4.5. Determinação de Atividade Anti-<math>\beta</math>-lactamásica e Antimicrobiana</b> ...	29
<b>4.4.6. Determinação de Atividade Cytotóxica</b> .....	30
<b>5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>5.1. Preservação das linhagens</b> .....	30
<b>5.1.1. Liofilização</b> .....	30
<b>5.1.2. Conservação em criotubos</b> .....	33
<b>5.1.3 Preservação dos Microrganismos Teste</b> .....	34
<b>5.2. Cultivos em Meio Sólido</b> .....	35
<b>5.3. Cultivo Submerso</b> .....	37
<b>5.3.1. Cultivo em Mesa Incubadora Rotativa</b> .....	37
<b>5.3.2. Cultivo em Biorreator</b> .....	39
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>6.1. Características Morfológicas e Culturais dos Microrganismos em Meio Sólido</b> .....	40
<b>6.2. Ensaio em Mesa Incubadora Rotativa</b> .....	44
<b>6.3. Ensaio em Biorreatores</b> .....	53
<b>7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b> .....	62
<b>7.1. Conclusões</b> .....	62
<b>7.2. Sugestões</b> .....	65
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>ANEXOS</b> .....	74

## Índice de Figuras

Figura 1: Metodologia utilizada na liofilização das linhagens.....	31
Figura 2: Metodologia utilizada para obtenção um lote de criotubos.....	33
Figura 3: <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio sólido.....	34
Figura 4: <i>Streptomyces acrymicini</i> em meio sólido.....	35
Figura 5: <i>Streptomyces cebimarensis</i> em meio sólido.....	35
Figura 6: Fases de Inóculo para Cultivo em Mesa Incubadora Agitada.....	37
Figura 7: Fases de Inóculo para Cultivo em Biorreator.....	39
Figura 8: Perfil de crescimento de <i>Streptomyces carpaticus</i> nos meios A1RDP, Gym, ISP4 e ISP5.....	45
Figura 9: Perfil de crescimento de <i>Streptomyces acrymicini</i> nos meios A1RDP, Gym, ISP4 e ISP5.....	45
Figura 10: Perfil de crescimento de <i>Streptomyces cebimarensis</i> nos meios A1RDP, Gym, ISP4 e ISP5.....	46
Figura 11: Perfil do consumo das fontes de carbono durante o cultivo em meio Gym das três linhagens de <i>Streptomyces</i> .....	46
Figura 12: Perfil de crescimento de <i>Streptomyces carpaticus</i> no meio Gym em três condições de concentração osmótica.....	48
Figura 13: Perfil de crescimento de <i>Streptomyces acrymicini</i> no meio Gym em três condições de concentração osmótica.....	49
Figura 14: Perfil de crescimento de <i>Streptomyces cebimarensis</i> no meio Gym em três condições de concentração osmótica.....	49
Figura 15: Perfil da concentração dos substratos glicose (Cg) e maltose (Cm) durante os cultivos de <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio Gym nas três condições osmóticas.....	50
Figura 16: Perfil de crescimento do <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio mínimo com glicose como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.....	51
Figura 17: Perfil de crescimento do <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio mínimo com sacarose como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.....	52
Figura 18: Perfil de crescimento do <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio mínimo com amido como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.....	52
Figura 19: Perfil de crescimento do <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio mínimo com extrato de malte como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.....	53
Figura 20: Evolução da concentração celular, do pH e do O.D. referente ao cultivo de <i>Streptomyces carpaticus</i> em biorreator.....	54
Figura 21: Evolução da concentração celular, do pH e do O.D. referente ao cultivo de <i>Streptomyces acrymicini</i> em biorreator.....	55
Figura 22: Evolução da concentração celular, do pH e do O.D. referente ao cultivo de <i>Streptomyces cebimarensis</i> em biorreator.....	55
Figura 23: Perfil da concentração de substrato (Cg e Cm) e da concentração celular (Cx), no cultivo do <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio Gym em biorreator.....	57
Figura 24: Perfil da concentração de substrato (Cg e Cm) e da concentração celular (Cx), variando com o tempo no cultivo do <i>Streptomyces acrymicini</i> em meio Gym em biorreator.....	58
Figura 25: Perfil da concentração de substrato (Cg e Cm) e da concentração celular (Cx), variando com o tempo no cultivo do <i>Streptomyces cebimarensis</i> em meio Gym em biorreator.....	59



Figura 1: Perfil da concentração de substrato ( $C_g$ e $C_m$ ) e da concentração celular ( $C_x$ ), variando com o tempo no cultivo do <i>Streptomyces cebimarensis</i> em meio Gym em biorreator.....	60
Figura 2: Calculo do $\mu_{max}$ no cultivo do <i>Streptomyces carpaticus</i> no meio Gym em biorreator.....	61
Figura 3: calculo do $\mu_{max}$ no cultivo do <i>Streptomyces cebimarensis</i> no meio Gym em biorreator.....	61
Figura 4: Perfil da concentração celular ( $C_x$ ) das três linhagens de <i>Streptomyces</i> em 72 horas de cultivo em mesa encubadora rotativa com meio proposto.....	62

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição dos meios de cultura, componentes e suas respectivas concentrações. ....	23
Tabela 2: Componentes da solução de traço de sais. ....	23
Tabela 3: Composição do meio de cultivo proposto.....	24
Tabela 4: Quantidade de Nitrogênio Disponível em Cada Fonte.....	27
Tabela 5: Caracterização de <i>Streptomyces carpaticus</i> em meio sólido.....	41
Tabela 6: Caracterização de <i>Streptomyces acrymicini</i> em meio sólido .....	42
Tabela 7: Caracterização de <i>Streptomyces cebimarensis</i> em meio sólido.....	43

## RESUMO

Os microrganismos representam uma fonte importante para produção de metabólitos bioativos com diversas aplicações. A produção destas substâncias está diretamente relacionada aos meios de cultura associados às fontes de carbono e nitrogênio disponíveis. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma composição adequada de meios de cultura para o crescimento de *Streptomyces carpaticus*, *Streptomyces acrimycini* e *Streptomyces cebimarensis* isolados de sedimento marinho que foram preservadas em criotubos acondicionados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As espécies estudadas foram cultivadas nos meios sólidos ISP4, ISP5 e GYM e caracterizadas fenotipicamente em que salienta-se o *Streptomyces carpaticus* que desenvolveu-se de forma homogênea em todos os meios de cultivo e apresentou produção de pigmento em meio Gym. As também foram cultivadas em meios sólidos (Gym, A1RDP, ISP4 e ISP5), sendo o melhor meio para crescimento o Gym, as linhagens foram cultivadas em diferentes concentrações osmóticas em meio Gym e em meio mínimo com diferentes fontes de carbono e nitrogênio em cultivos com frascos agitados. As três linhagens foram cultivadas em batelada utilizando-se biorreatores convencionais com meio Gym e obteve-se em termos de massa celular 4 g/L para *S. carpaticus* e *S. acrimycini* e 6 g/L para *S. cebimarensis*. Observou-se também a presença de substâncias com atividade citotóxica nos caldos de cultivo. Observou-se que as três espécies apresentavam comportamento possivelmente diáuxico. *S. carpaticus* consumiu maltose preferencialmente, diferindo das outras espécies que utilizam primeiramente glicose.

## Abstract

Microorganisms represent an important source for production of bioactive metabolites for diverse applications. The production of these substances is directly related to the culture medium associated with sources of carbon and nitrogen available. Thus this study aimed to establish an appropriate composition of culture media for growth of *Streptomyces carpaticus*, *Streptomyces acrimycini* and *Streptomyces cebimarensis*. These microorganisms were isolated from marine sediments that were preserved in cryovials stored at -80°C. The species studied were grown on solid media ISP4, ISP5 and GYM and phenotypically characterized. It was observed that *Streptomyces carpaticus* developed uniformly in all culture media and presented production of pigment in Gym medium. Microorganisms were also grown in solid media (Gym, A1RDP, ISP4 and ISP5). It was observed that Gym is the best medium to promote the microorganism growth. The strains were grown in different concentrations on osmotic medium Gym and on minimal medium with different sources of carbon and nitrogen in crops with flasks. The three strains were grown in batch bioreactors using conventional Gym medium and it was obtained 4 g / L of cell mass of *S. carpaticus* and *S. acrimycini* and 6 g / L of cell mass of *S. cebimarensis*. It was observed the presence of substances with cytotoxic activity on the breeding grounds. Besides, it was observed that the three species probably present diauxic behavior. *S. carpaticus* consumed preferentially maltose, while other species used glucose first.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos pelo homem data de muitos anos antes de Cristo, como exemplos têm-se a atuação de leveduras na fermentação da uva e do trigo para produção de vinho e pão há muitos séculos. Os estudos sobre organismos microscópicos começaram no século XVII, sendo difícil definir exatamente quando Antony van Leeuwenhoek viu pela primeira vez as bactérias e os outros microrganismos. No entanto, sabe-se que em 1674 Leeuwenhoek começou a escrever sobre seus estudos em protozoa, e observou diversos tipos de microrganismos presentes na água chamados por ele de “animalcules”, dando início a ciência da microbiologia. (Porter, 1976). Desde então a microbiologia se desenvolveu para diversas áreas e aplicações, entre elas a farmacologia.

A grande diversidade microbiana supera todos os grupos de seres vivos em número de táxons e em variabilidade genética. O avanço nas tecnologias, como a biologia molecular e a informatização, associadas ao avanço nas técnicas de “screening” da diversidade biológica geram novas aplicações biotecnológicas e possibilidades de investimentos científicos no domínio, por exemplo, dos tratamentos com antibióticos e conseqüentemente à descoberta de novos fármacos.

Os microrganismos representam uma fonte muito importante e vasta de potenciais produtores de metabólitos bioativos, com muito potencial a ser explorado tanto no ponto de vista científico como econômico. O país conta com uma enorme diversidade microbiológica, porém, ainda assim carece de tecnologia para produção de fármacos e de pesquisas para o desenvolvimento destes. Desta forma é demonstrada a importância do incentivo de pesquisas sobre o crescimento e comportamento de novas linhagens com potencial para produção de moléculas de interesse para as diversas indústrias.

Há cada vez mais estudos que visam aperfeiçoamentos e avanços na farmacologia, pois este já é comprovadamente um mercado que garante ao ser humano a possibilidade de melhorar a qualidade de vida e prolonga-lá, tratando doenças antes tidas como incuráveis, desenvolvendo medicamentos mais eficazes e de menor toxicidade para o paciente.

Atualmente, ocorrem dificuldades no tratamento de certas infecções por consequência da crescente resistência microbiana. Ciente desse fato, tanto a indústria quanto a academia voltam-se para a pesquisa em microbiologia, aprofundando os estudos sobre rotas metabólicas, metabólitos bioativos mais eficientes produzidos por microrganismos já conhecidos bem como de novas linhagens.

A microbiologia possui inúmeras ramificações, dentre elas a microbiologia marinha, um campo relativamente recente da pesquisa que começou a ser explorado mediante a adaptabilidade e já identificado potencial de oferta de biomoléculas com várias aplicações produzidas por organismos e microrganismos marinhos.

As linhagens de bactérias estudadas nesse trabalho são de origem marinha e representantes do gênero *Streptomyces*. São elas: *Streptomyces carpaticus*, *Streptomyces acrimycini* e *Streptomyces cebimarensis* sp. nov. Os meios utilizados já descritos na literatura foram: meio A1RDP, meio Gym (Mugnai et al., 1989), meios ISP 4 (Küster, 1959) e ISP 5 (Shirling & Gottlieb, 1966).

O interesse em estudar esses três representantes dos *Streptomyces* marinhos do ponto de vista biotecnológico resulta do fato que a literatura mostra-se muito limitada em referências a estas três espécies quanto ao crescimento e sobre a produção de metabólitos bioativos; ressalta-se que já foram isoladas moléculas de interesse da linhagem *S. acrimycini* e que a linhagem *S. cebimarensis* é uma linhagem nova ainda sem muitos estudos. Assim a ênfase desse trabalho foi o estabelecimento de algumas condições básicas de crescimento das três linhagens de *Streptomyces* marinhos, buscando as fontes de carbono e nitrogênio que propiciem uma melhor produção de biomassa celular, considerando também que não só o crescimento, mas também a produção de substâncias de interesse estão diretamente relacionados aos meios de cultura em que os microrganismos se desenvolvem (Macedo, Sette e Sato, 2007).

## 2. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo geral estabelecer a metodologia de cultivo das três espécies de *Streptomyces* marinhos, incluindo algumas condições ambientais e composição de meios de cultura para cultivos submersos. Esses estudos podem ser utilizados no desenvolvimento de trabalhos que visam a bioprospecção, isolamento e identificação de metabólitos secundários bioativos produzidos por essas linhagens.

Para tanto foram buscados os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar morfológicamente as linhagens em meio sólido;
- Avaliar o efeito da variação da concentração de sais, que compõem a água do mar, no crescimento dos Streptomycetos;
- Propor formulação e composição de um meio de cultivo adequado ao desenvolvimento das linhagens;
- Desenvolver metodologia de cultivo submerso em mesa incubadora rotativa e em biorreator de bancada, para propiciara detecção preliminar de substâncias com ação antitumoral e antimicrobiana no caldo de cultivo dos *Streptomyces*, de um trabalho em colaboração.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A grande diversidade de compostos químicos sintetizados por espécies de plantas, animais, microrganismos e fungos pode ser resultado da evolução na seleção e conservação de importantes mecanismos de defesa utilizados para repelir, inibir ou destruir competidores, predadores ou parasitas (Cragg et al., 1997; Faulkner, 2000) fatos apoiados pela teoria de Darwin sobre a seleção natural e sobrevivência do organismo mais apto.

Desde a descoberta da produção de penicilina por fungos do gênero *Penicillium* por Fleming em 1928 ficou em evidência a capacidade de alguns microrganismos produzirem substâncias que possam interagir e afetar outros microrganismos ou células. Desde então há procura por outros grupos de organismos, em destaque, fungos e bactérias com capacidades similares à relatada produção de antibióticos como apresentado pelo gênero *Penicillium*.

Os actinomicetos se destacaram dentre os outros grupos de microrganismos quanto a capacidades de produção de metabólitos bioativos de interesse. Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, também chamadas actinobactérias. Esta divisão compreende organismos com alto teor de G+C (de 69% a 78%), da família Actinomycetales e gêneros relacionados (Korn-Wendisch e Kutzner, 1992 e Stackbrand et al., 1997). Estes organismos são caracterizados por apresentarem micélios cenocíticos e ramificados, são eubactérias heterotróficas, produtoras de cadeias de esporos, e geralmente aeróbicas (Bradbury, 1986). Em geral, não são móveis na fase vegetativa e apresentam pleomorfismo em alguma fase do ciclo celular, podendo formar filamentos. Exemplos comuns desse grande grupo são os microrganismos dos gêneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* e *Streptomyces*.

O gênero *Streptomyces* foi proposto por Waksman e Henrici em 1943 (família *Streptomycetaceae*, ordem *Actinomycetales*). Alguns representantes deste gênero são responsáveis por 70% da produção dos antibióticos conhecidos, como exemplos o cloranfenicol, a estreptomicina, a vancomicina, tetraciclinas e o ácido clavulânico, além de outras inúmeras substâncias



bioativas, mostrando-se, desta forma, microrganismos com aplicação promissora na indústria de fármacos.

Os representantes do gênero *Streptomyces* são comumente encontrados em solos e por todo o mundo, citando-se como exemplo o *Streptomyces spp AM-2282 (Streptomyces staurosporeus)*, isolado de uma amostra de solo recolhidas em Iwate no Japão (Iwai *et al.*, 1977) e associados à plantas também por todo o planeta. *Streptomyces lavendulae var. glaucescens* é um microrganismo endofítico isolado por Zhi-Qi *et al.*, (2006) na China em raízes de tomates (*Lycopersicon esculentum*). Além da presença por todo o globo, também se evidenciam por povoarem os mais diversos ambientes, inclusive o marinho.

Verificou-se também que inúmeras substâncias de interesse já conhecidas pela indústria farmacêutica derivadas de organismos pluricelulares eram também produzidos naturalmente por microrganismos. Assim, vê-se que o medicamento já testado contra o câncer fase I e fase II a “Dolastatin 10” que provoca a inibição do crescimento celular, originalmente isolado do molusco *Dolabella Auricularia* por Pettit *et al* (1987) também foi isolado de uma cultura de cianobactéria *Symploca spp.* por Luesch *et al* (2001). A biotecnologia também busca alternativas microbiológicas em relação as capacidades dos organismos pluricelulares em produzir metabólitos de interesse são insuficientes para atender a demanda por essas substâncias, por exemplo, na descoberta, produção e aplicação de “drogas candidatas” (quanto ao desenvolvimento e comercialização) de invertebrados que é extremamente limitada. Como no caso da esponja *Lissodendoryx* que produz as halicondrinas, agentes antimetabólicos que estão em triagem pré-clínica, a aquacultura da esponja produz uma quantidade bastante limitada do composto anticancerígeno de interesse (Bowling *et al*, 2007).

A produtividade de halicondrinas a partir de amostras de esponja é de 1,5mg/kg e essa produtividade diminui para 30-60% em amostras de esponja cultivadas em aquacultura. Este obstáculo e o crescente re-isolamento de compostos já conhecidos forçaram muitos pesquisadores a encarar o ambiente marinho em nível microscópico.

Mais de dois terços da superfície da Terra estão cobertos pelas águas, e cerca de 97,5% dessa água se encontra nos mares e oceanos que abrigam

quase todos os grupos de organismos vivos, incluindo representantes de 34 dentre os 36 filos descritos (Lotufo, 2009). Dessa forma, há o ambiente marinho como uma ampla fonte de espécies e uma grande variedade de compostos ainda pouco explorada.

Os microrganismos marinhos ocupam ambientes de pressão, salinidade e temperatura maiores que a água doce ou solo. Para tal, eles desenvolveram capacidades fisiológicas e metabólicas únicas que lhes permitem sobreviver em uma grande variedade de habitats e condições tidas como inóspitas para os demais organismos, além de lhes conferir potencial para a produção de metabólitos não produzidos pelas bactérias terrestres (Jensen *et al.*, 1993).

São encontrados na literatura muitos exemplos de trabalhos sobre o isolamento de substâncias bioativas com alto valor agregado produzidos por organismos marinhos, como saponatos, polihidroxiesteróides, alcalóides, e aminoácidos (Rigueira, 1997). Foi constatada, também no ambiente marinho, a presença de microrganismos, em especial bactérias produtoras de substâncias com significativa atividade antitumoral, antiinflamatória, analgésica, antiviral e com efeitos no sistema imunológico e sendo capazes de atuar em respostas alérgicas. Segundo Newman (2004) além de inúmeras moléculas de interesse farmacológico e industrial diretamente provenientes de fontes marinhas, diversas moléculas e medicamentos puderam ser sintetizados como resultado da aplicação do conhecimento ganho com o estudo de composto típicos desses seres e de seu metabolismo.

Os microrganismos marinhos são hoje reconhecidos como rica fonte produtora de metabólitos secundários e substâncias bioativas de interesse humano. Esse fato, junto a sua grande capacidade de adaptação, atraiu atenção considerável para maiores estudos biomédicos sobre seus metabólitos e sobre seu ciclo de vida (Lee *et al.*, 2005). Esses microrganismos fornecem componentes chaves de inúmeras estruturas que provaram seu potencial em diversos campos, particularmente, como agentes terapêuticos novos para grande variedade das doenças. É extensa a lista de medicamentos formulados a partir de substâncias produzidas por microrganismos marinhos.

A substância “Bengamide” extraída de *Jaspis sp* possui um efeito inibidor também empregado no tratamento do câncer durante a fase I (Newman, 2004). O “GTS-21” (Aka DMBX) é um medicamento obtido através

da modificação de uma toxina encontrada em vermes marinhos, e tem sua aplicação no tratamento de casos de Alzheimer. O “IPL-576, 092”, medicamento derivado do contignasterol, produzido pela bactéria *Petrosia contignata*, geralmente é utilizado no tratamento de asma (Newman, 2004; Fenical, 2006). Também o medicamento “Ziconotide” (aka Prialt), extraído do organismo marinho *Conus magnus*, é atualmente utilizado no tratamento de dores neuropáticas. O composto “CGX-1007”, extraído de *Conus geographus*, constitui um medicamento utilizado no tratamento de dor e de epilepsia (Newman, 2004).

Além das já citadas aplicações e fármacos desenvolvidos, em relação ao gênero *Streptomyces*, como exemplo da utilidade dos metabólitos biotativos desse gênero para o homem, temos o antibiótico “TH818”, que foi isolado a partir do cultivo da linhagem *Streptomyces fulvoviolaceus* 818. Este antibiótico possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, atuando ainda eficazmente contra fungos filamentosos e leveduriformes (Rachev *et al*, 2003).

O grupo participante do projeto temático “Produção e purificação de ácido clavulânico e cefamicina C e outros metabólitos bioativos de *Streptomyces*” (projeto FAPESP 2005/55079-4) tem estudado principalmente o *Streptomyces clavuligerus*, obtendo resultados de grande importância como o esclarecimento de partes da rota metabólica do ácido clavulânico e a identificação da produção de cefamicina C (Baptista Neto, 2008).

Muitas das substâncias de interesse, das indústrias cosméticas e farmacológicas, são sintetizadas a partir do metabolismo secundário, que são conectadas e influenciadas pelo metabolismo primário. Os metabólitos intermediários do metabolismo primário servem como precursores para a biossíntese dos antibióticos e outras substâncias bioativas. A produção dos metabólitos secundários está diretamente ligada à forma de desenvolvimento do microrganismo e este desenvolvimento está ligado ao meio de cultura em que se encontra (Sujatha, 2004). Segundo Vining (1986), o crescimento celular e a formação de metabólitos secundários, como os exemplos descritos, estão vinculados entre outros fatores, às fontes de carbono e nitrogênio, consideradas vitais para tais fins.

Há também no grupo que desenvolve esse projeto temático exemplos de trabalhos que envolveram o estudo da composição de meios de cultura como influencia na produção do ácido clavulânico. Como exemplo, os três trabalhos de Gouveia et al (1999, 2000 e 2000), e o trabalho de Baptista Neto, et al. (2000). A importância do estudo dos meios de cultivo e de sua relação com a produção de metabólitos bioativos torna-se então ainda mais evidente.

Apesar da grande variedade de compostos antibióticos já identificados, muitas bactérias patogênicas desenvolveram mecanismos de resistência à ação dessas substâncias. A bactéria *Klebsiella pneumoniae* produz  $\beta$ -lactamases (Kuboyama, 2009). Há, porém compostos produzidos por microrganismos que podem neutralizar essa enzima. A bactéria *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064) produz o ácido clavulânico, composto que possui pequena atividade antibacteriana, e atua como um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases. É utilizado comercialmente em conjunto com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como as penicilinas.

Além dos antibióticos e inibidores de mecanismos de defesa, também no contexto da pesquisa do projeto temático, está a busca por outros metabólitos bioativos produzidos por *Streptomyces*, por exemplo, substâncias que possuam aplicação no tratamento do câncer. O câncer pode ser definido como um crescimento descontrolado prejudicial e invasivo de células de algum tecido. Drogas quimioterápicas (citotóxicas ou citotásticas) trabalham prejudicando a mitose celular, afetando mais intensamente células de crescimento rápido, porém afetando também células saudáveis.

Há um grande incentivo para identificação e isolamento de novas linhagens em novas regiões de estudo. Berlink et al. (2004) relata que os estudos na costa brasileira são muito recentes. Os primeiros levantamentos de identificação e isolamento no Brasil foram feitos pelo Professor Tom Booth, que descreveu várias ocorrências de grupos de fungos marinhos. Dentre eles o *Lignicolous fungi*, *Foliicolous fungi*, *Rhizosphere fungi*, *Algicolous fungi*, *Chytrids* e *Thraustochytrids*, e *Nematode-trapping fungi*.

Segundo Berlink et al (2004), também foram realizados estudos na praia de Ipanema no Rio de Janeiro, onde foram isoladas 4285 colônias de bactérias e 6956 colônias de fungos filamentosos com incidência dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*,

e *Acremonium*. Em 1999 começaram estudos químicos de microrganismos no Brasil foram isolados e identificados os três actinomicetos deste trabalho *Streptomyces carpaticus*, *Streptomyces acrymicini* e *Streptomyces cebimarensis sp. nov.* isolados em sedimento extraído da baía de São Sebastião, São Paulo, Brasil em profundidade de 12 a 15 metros. Iniciando os arquivos do primeiro programa brasileiro de produtos naturais de microorganismos marinhos (Berlink et al., 2004).

A linhagem de *Streptomyces carpaticus*, foi identificada por Maximova e Terekhova em 1986 (*Apud. International Journal of Systematic Bacteriology*, 1986), e não foram encontrados relatos de estudos químicos realizados com esta espécie de *Streptomyces*. Também não foi encontrado nenhum trabalho na literatura descrevendo o cultivo e conservação desta espécie.

*Streptomyces acrymicini* foi identificado por Preobrazhenskaya, Blinov e Ryabova (1957). Esta espécie foi estudada no que diz respeito ao seqüenciamento, clonagem e expressão do gene que codifica a enzima cloranfenicol-acetyl-transferase (Wright & Hopwood, 1977; Gil et al, 1985; Murray et al, 1989; Wu & Janssen, 1997), à biossíntese da candicidina (Asturais et al, 1994) e com relação ao gene que reporta resistência a kanamicina (Cadenas et al, 1991). Também existem trabalhos relacionados à descrição de suas características morfológicas (Wildermu, 1972). Hernandez et al. (2002) relataram duas substâncias nitrogenadas puras obtidas a partir do filtrado da cultura líquida (8-amino-[1,4] dia-zonane-2,5-dione e leucyl-4-hydroxyproline).

A espécie *Streptomyces cebimarensis spp. nov.* estudada aqui foi isolada recentemente por Hernandez et al. (2002) de sedimento marinho e não possui estudos aprofundados sobre seu crescimento em meio líquido nem sobre a produção de metabolitos secundários bioativos. Esta linhagem é produtora da lactona da N-acetyl- $\gamma$ -hidroxivalina, composto de estrutura química inédita, isolado e purificado a partir do filtrado da cultura líquida por Hernandez et al, (2004).

Dentre os meios de cultura descritos na literatura, quatro meios de cultivo são utilizados neste trabalho, em estudos relacionados com o crescimento e preservação de estoque de trabalho. O meio Gym, que foi utilizado para o crescimento de culturas de fungos como visto no trabalho de

Attitalla et al (2004) Preobrazhenskaya et al. (1957) Dois meios foram escolhidos do ISP (*International Streptomyces Project*): Meio ISP 4, e Meio ISP 5, utilizados por Moncheva (2002) para caracterização, esporulação e crescimento de *Streptomyces spp.* isolados na Antártica. Wu et al. (2008) utilizaram o Meio ISP 4 para a esporulação de *Streptomyces padanus* PMS-702. O quarto meio escolhido foi o meio A1RDP.

Além da descoberta de novas linhagens e de novos compostos bioativos, é também importante o emprego de métodos que garantam a preservação das linhagens microbiológicas. Entre muitos métodos empregados para esse fim, ressaltam-se dois: preservação a  $-80^{\circ}\text{C}$  em criotubos e a liofilização citados por Siberry et al., (2001) como métodos ideais para conservação de microrganismos como *Streptococcus pneumoniae*, apresentando células viáveis no congelamento a  $-70^{\circ}$  em um período de 16 meses preservados em criotubos e quando preservadas através da liofilização a viabilidade chegou a 68 meses. Essas metodologias também preservam características de produção dos microrganismos. A liofilização é considerada um dos melhores processos para se preservar a viabilidade de microrganismos, particularmente de bactérias e fungos (Figueiredo, 2001), porém o tempo de reativação das linhagens preservadas dessa forma é alto. Penna, Amaral e Aquarone (1998) obtiveram células viáveis de *Streptomyces aureofaciens* mutantes, depois de liofilizadas as linhagens foram estocadas à  $18^{\circ}\text{C}$  por períodos acima de 15 meses.

Não foram encontradas na literatura, referências sobre a liofilização das linhagens de trabalho ou sobre o período de viabilidade celular máximo mediante esses processos para os três *Streptomyces* marinhos.

Frente ao exposto, evidencia-se a necessidade de estabelecer meios de cultura apropriados para crescimento desses microrganismos, uma vez que a literatura não apresenta estudos semelhantes visando desenvolvimento de bioprocessos. Também é relevante se verificar os possíveis métodos para a preservação de microrganismos bioativo-produtores, assegurando a conservação de suas características fenotípicas e genotípicas, e a capacidade de produção de seus metabólitos de interesse ao homem.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Microrganismos

As três linhagens utilizadas neste trabalho foram: *Streptomyces carpaticus*, *Streptomyces acrymicini* e *Streptomyces cebimarensis sp nov.* isolados e cedidas por Berlinck et al. (2004). Estas linhagens foram isoladas de sedimentos marinhos coletados a uma profundidade que variava de 12 a 15 metros no canal de São Sebastião (litoral do estado de São Paulo, Brasil) (Hernandez et al, 2002).

### 4.2 Meio de Cultura

Para fins de avaliação do crescimento e conservação das linhagens, foram utilizados inicialmente quatro meios de cultura já relatados na literatura e meio mínimo adicionado de fontes determinadas e conhecidas de carbono e nitrogênio. Os componentes dos meios de culturas e a solução de sais estão dispostos nas Tabelas 1 e 2. Estes meios foram usados nos experimentos em mesa incubadora agitada ("shaker"). Nos experimentos com os meios ISP4, ISP5, Gym e A1RDP foram feitas adições de sais que simularam as condições da água do mar (sal sintético comercial Red Sea Coral), na concentração de 33g. L<sup>-1</sup>.

Quando testado o efeito da concentração osmótica sobre o crescimento no meio Gym, o sal sintético Red Sea Coral foi adicionado nas proporções de 33g.L<sup>-1</sup>, 16 g.L<sup>-1</sup> e na terceira condição o sal não foi adicionado.

Nos experimentos em meio mínimo, a concentração de sais usada foi de 16,5g.L<sup>-1</sup>. Nos experimentos em biorreatores, foi utilizado o meio Gym sem a adição dos sais que simulam água do mar. Para o meio sólido, foi adicionado Agar na concentração de 20g.L<sup>-1</sup> para os meios ISP4 e ISP5, e 12g.L<sup>-1</sup> para os meios Gym e A1RDP, conforme é descrito na literatura.

Ressalta-se que o nível natural de cálcio na água do mar é de aproximadamente 400 ppm. E no Sal marinho utilizado Coral Pro é de 420 ppm

(salinidade 30.6 ppt, sendo que a quantidade para simular as condições da água do mar natural recomendada pelo fabricante é de  $33,4 \text{ g.L}^{-1}$ ).

**Tabela 1:** Composição dos meios de cultura, componentes e suas respectivas concentrações.

Componentes do meio	Meios de Cultura				
	ISP4	ISP5	Gym	A1RDP	Meio Mínimo
Amido	$10\text{g.L}^{-1}$			$10\text{g.L}^{-1}$	
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (base anidra)	$1\text{g.L}^{-1}$	$1\text{g.L}^{-1}$			$3,5\text{g.L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1\text{g.L}^{-1}$				$1,22\text{g.L}^{-1}$
NaCl	$1\text{g.L}^{-1}$				
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$2\text{g.L}^{-1}$				
$\text{CaCO}_3$	$2\text{g.L}^{-1}$		$2\text{g.L}^{-1}$		
Solução de traços de sais	$1\text{mL/L}$	$1\text{mL/L}$			$1\text{mL/L}$
MOPS					$21 \text{ g.L}^{-1}$
L-Asparagina (base anidra)		$1\text{g.L}^{-1}$			
Glicerol		$10\text{g.L}^{-1}$			
Glicose			$4\text{g.L}^{-1}$		
Extrato de Levedura			$4\text{g.L}^{-1}$	$4\text{g.L}^{-1}$	
Extrato de Malte			$10\text{g.L}^{-1}$		
Peptona				$2\text{g.L}^{-1}$	
<b>pH</b>	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2

**Tabela 2:** Componentes da solução de traço de sais.

Solução de sais	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1 \text{ g.L}^{-1}$
<b>H<sub>2</sub>O</b>	q.s.p. 1.000 ml



A composição do meio sugerido descrito na Tabela 3 em termos de fontes de C e N foram estimadas considerando-se um rendimento em massa celular em relação à fonte de C e Energia principal consumida de 0,5 determinado experimentalmente e composição celular tal como sugerido na literatura supondo que cada microrganismo apresente a seguinte composição elemental de biomassa CH 1,81; O 0,52; N 0,21 (Stephanopoulos *et al*, 1998).

O pH de preparo do meio foi estabelecido em 7 e a temperatura de cultivo em 28°C . A agitação foi de 200 rpm em mesa incubadora rotativa.

**Tabela 3:** composição do meio de cultivo proposto

<b>Composição do Meio de Cultura Proposto</b>	
Glicose	10 g/L
K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub>	0,4 g/L
Soytone	5 g/L
Extrato de Levedura	1 g/L
CaCO <sub>3</sub>	2 g.L
<b>Solução de traços de sais</b>	1 mL

#### 4.3 Equipamentos Principais

Os cultivos foram realizados em mesa incubadora agitada (“Shaker”), New Brunswick Scientific e em biorreatores modelos Bioflo II, Bioflo III e Bioflo 310 New Brunswick Scientific;

Também foram utilizados equipamentos de uso comum em laboratório como pHmetro de bancada Qualxtron 8010, câmara de fluxo laminar marca Veco, autoclave marca Fabbe Prima de 75 e 250 litros, balança de precisão da marca Marte, balança analítica da marca Mettler Toledo, bomba peristáltica MCP Ismatec, estufa marca Fanem, frascos Erlenmeyers, placas de Petri, provetas, copo Beckers, agitador magnético, alça de platina e pipetas.

## 4.4 Metodologia Analítica

### 4.4.1 Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi determinada avaliando-se a massa seca de uma quantidade conhecida de amostra. As amostras (20 ml) foram centrifugadas por 15 minutos, 11.000 rpm (15.500×g) em centrífugas Eppendorf modelo 5403 e 5810R a 4 °C.

Após esse processo o precipitado foi seguidamente lavado com o mesmo volume de solução de ácido acético 5% para dissolver o carbonato de cálcio presente no meio que poderia interferir no resultado da análise e re-centrifugado nas mesmas condições já citadas. Em seguida o processo foi repetido lavando o precipitado dessa vez com água destilada. A massa final obtida foi colocada em estufa a 60 °C por 24h em um recipiente massa cuja massa tenha sido previamente determinada. A relação entre a massa e o volume de amostra determinam a concentração celular expressa em massa seca.

### 4.4.2 Análise das Concentrações de Fontes de Carbono

Foram utilizados dois métodos para análise da concentração das fontes de carbono. O método do DNS visa analisar açúcares redutores como glicose e maltose e foi utilizado nos ensaios iniciais com meio Gym em mesa incubadora rotativa. No método de cromatografia líquida de alta eficiência também foram dosados esses açúcares, porém este método foi utilizado nos ensaios realizados em biorreatores, oferecendo maior riqueza de dados, pois possibilitou observar as concentrações dos açúcares separadamente.

### **Análise da Concentração de Açúcares Redutores de Cultivos em Shaker**

Inicialmente no estudo do consumo de diferentes carboidratos o método ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959), no qual a concentração de substratos é determinada através da análise de açúcares redutores (AR).

Para a análise de AR pelo método de DNS, inicialmente preparou-se uma solução de referência (1 mL de água destilada e 2 mL de reagente de ADNS) e as soluções para determinação da concentração de AR (1 mL de solução a ser determinada AR ou padrão e 2 mL de reagente de DNS). Após essa mistura, reagiu-se a solução resultante por 5 minutos a 100°C. Após a reação, resfriou-se a solução obtida e ajustou-se o volume em 25 mL com água destilada. Misturou-se a solução obtida e determinou-se o valor da absorbância no comprimento de onda de 540 nm, foi utilizada a solução de referência como o branco.

Para determinação da curva de calibração utilizou-se glicose previamente seca em estufa de 60°C. Soluções de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2 g.L<sup>-1</sup> foram utilizadas para determinar a curva de calibração.

### **Análise da Concentração das Fontes de Carbono dos cultivos em Biorreatores**

As concentrações de glicose, maltose do meio Gym provenientes do ensaio em biorreator foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS-802 (Lonpak, divisão da Millipore) e água Milli-Q como eluente. O equipamento foi operado nas seguintes condições: 80°C, 1 mL.min<sup>-1</sup>. Os picos foram detectados no medidor do índice de refração W410 (Waters). A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão do composto a ser analisado, com concentrações 4g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte.

#### **4.4.3 Análise das Fontes de Nitrogênio**

Tentou-se utilizar métodos para a determinação da concentração de nitrogênio (N) e com isso o seu consumo. Método de Kjeldahl, (procedimento de oxidação úmida) (Keeney e Bremner, 1967). Porém o método necessitava de uma quantidade de nitrogênio nas amostras maior do que havia. Foi testado também um método enzimático, adaptado de um kit de análise sensível de uréia que detectava menores concentrações de nitrogênio, porém a precisão desse método foi comprometida pela dificuldade de se realizar a digestão ácida das amostras.

Portanto para verificar se houve limitação pela disponibilidade da fonte de nitrogênio, foi empregada a relação entre a quantidade de nitrogênio e o crescimento celular, levando em consideração a quantidade de nitrogênio disponível no meio (Tabela 4) e a quantidade determinada na composição elementar da biomassa bacteriana ( $N_{0,21}$ ) (Stephanopoulos et al, 1998). A análise se limitou aos ensaios das três linhagens em biorreatores.

**Tabela 4:** Quantidade de Nitrogênio Disponível em Cada Fonte

	<i>Reagentes que Contém Nitrogênio</i>				
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Asparagina	Extrato de levedura	Peptona	Extrato de Malte
<b>Teor de N em Massa</b>	0,212121g/g	0,212121 g/g	0,109 g/g	0,158 g/g	0,011 g/g

$$Quant = \sum .[N].FN.Teor \quad (1)$$

$$\%N = \frac{\sum .N}{MM} \quad (2)$$

Onde: Quant= quantidade de N disponível

FN= Fonte de Nitrogenio

Teor = Teor de N

MM = massa molecular

Calculo de N Requerido:

Considerando que: CH<sub>1,81</sub>. O<sub>0,52</sub>. N<sub>0,21</sub> (Stephanopoulos et al, 1998)

$$TeorN = \frac{\sum \cdot N}{MM} \quad (3)$$

$$Req[N] = Cx \cdot Teor \quad (4)$$

Onde: Req[N] = Concentração de N Requerido

#### 4.4.4 Estimativa da Velocidade Especifica Máxima de Crescimento Celular e Rendimento de Substrato às Células

O cálculo do  $\mu_{max}$  foi realizado, considerando-se o cultivo como sendo pseudo-homogêneo, em reator batelada, perfeitamente agitado, de volume constante e sem variação de densidade. O balanço de massa para células durante a fase exponencial de crescimento no cultivo nas condições descritasja fornece a equação que segue:

$$\frac{dCx}{dt} = \mu_{max} Cx \quad (5)$$

Onde: Cx: concentração celular (g.L<sup>-1</sup>).

$\mu_{max}$ : velocidade de crescimento específica máxima (h<sup>-1</sup>).

t: tempo de cultivo (h).

A integração da equação 5 com a condição inicial,  $t = t_0 = 0$ ;  $Cx = Cx_0$ , leva as equações que seguem:

$$Cx = Cx_0 \cdot e^{\mu_{max}(t-t_0)} \quad (6)$$

$$\ln \frac{Cx}{Cx_0} = \mu_{max}(t - t_0) \quad (7)$$

Onde  $Cx_0$  é a concentração inicial de células ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

No calculo de  $Y_{x/s}$  (rendimento de células por substrato), foi considerado que o consumo de substrato para a manutenção celular estava sendo desprezível, também foi considerado que o cultivo ocorreu em reator em batelada.

$$(Cx - Cx_0) = Y_{x/s} \cdot (Cs_0 - Cs) \quad (8)$$

Onde:  $Cs$  é a concentração de substrato

$Cs_0$  é a concentração inicial de substrato

Para determinação dos valores da velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ) e o valor do coeficiente de rendimento de substrato a células ( $Y_{x/s}$ ) obtidos nos experimentos.

#### 4.4.5 Determinação de Atividade Anti- $\beta$ -lactamásica e Anti-microbiana

### Bioensaios

Foram realizados bioensaios para detecção de substâncias inibidoras de  $\beta$ -lactamases e/ou antibacterianas.

Nos testes para a detecção de compostos inibidores de  $\beta$ -lactamase, foram utilizadas a bactéria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, cultivado em Meio Nutriente Agar (Difco 0001) com penicilina G (de sal potássico 1600 UI/mg, Sigma) misturada ao agar a 50 mg/mL, tal como descrito por Romero, Liras e Martin (1984) para a determinação de ácido clavulânico.

Para detecção de substâncias antibacterianas o microrganismo teste foi a *Escherichia coli* ESS 2235. A metodologia é descrita por Liras (2005) para a determinação de compostos  $\beta$ -lactâmicos.

#### 4.4.6 Determinação de Atividade Citotóxica

Nos estudos que visaram à detecção de atividade citotóxica foi utilizado o caldo de cultivo das linhagens *Streptomyces carpaticus*, *Streptomyces acrymicini* e *Strptomyces cebimarensis* resultante do cultivo em biorreator no termino do cultivo com tempo de 72h.

Os caldos obtidos de cultivos em biorreator dos três microrganismos após o termino do cultivo foram centrifugados para a remoção das células. O sobrenadante obtido foi seco em “Spped-Vac” e enviado para o Laboratório de Oncologia Experimental da UFC em Fortaleza para a determinação das atividade citotóxica. Foram utilizadas as seguintes células para análise: SF-295 (Sistema Nervoso Central), HCT-8 (Cólón) e MDA-MB435 (Melanoma).

Os laudos oriundo da UFC e demais detalhes dos resultados seguem no Anexo 1.

## 5. Procedimento Experimental

### 5.1 Preservação das Linhagens:

#### 5.1.1 Liofilização

#### **Conservação em Ampolas Liofilizadas**

Os microrganismos podem ser armazenados por longos períodos em ampolas de liofilização sob duas formas: Células vegetativas e esporos.

Para a liofilização de células vegetativas inicialmente, inoculou-se o conteúdo de 1 criotubo com capacidade para 3,5ml em um Erlenmeyer de 500 ml utilizando o meio Gym para reativação mantido por 24 horas a uma agitação de 200 rpm e a uma temperatura de 28°C. Após esse período, 5 mL de caldo de cultivo foram utilizados para inocular 45 mL do mesmo meio de crescimento

em frascos Erlenmeyers de 500 mL, mantendo-os nas mesmas condições por mais 24 horas.

Após a segunda etapa de crescimento, adicionou-se o conteúdo de 5 frascos Erlenmeyers. Separou-se o caldo resultante em tubos Falcon estéreis e estes foram centrifugados a 11000xg (7800 rpm utilizando a centrífuga Eppendorf modelo 5810R) por 10 minutos para retirar o caldo de cultivo. Após a retirada do caldo de cultivo, as células sedimentadas foram ressuspensas com solução salina. Centrifugou-se a suspensão resultante nas mesmas condições para se retirar a solução salina.

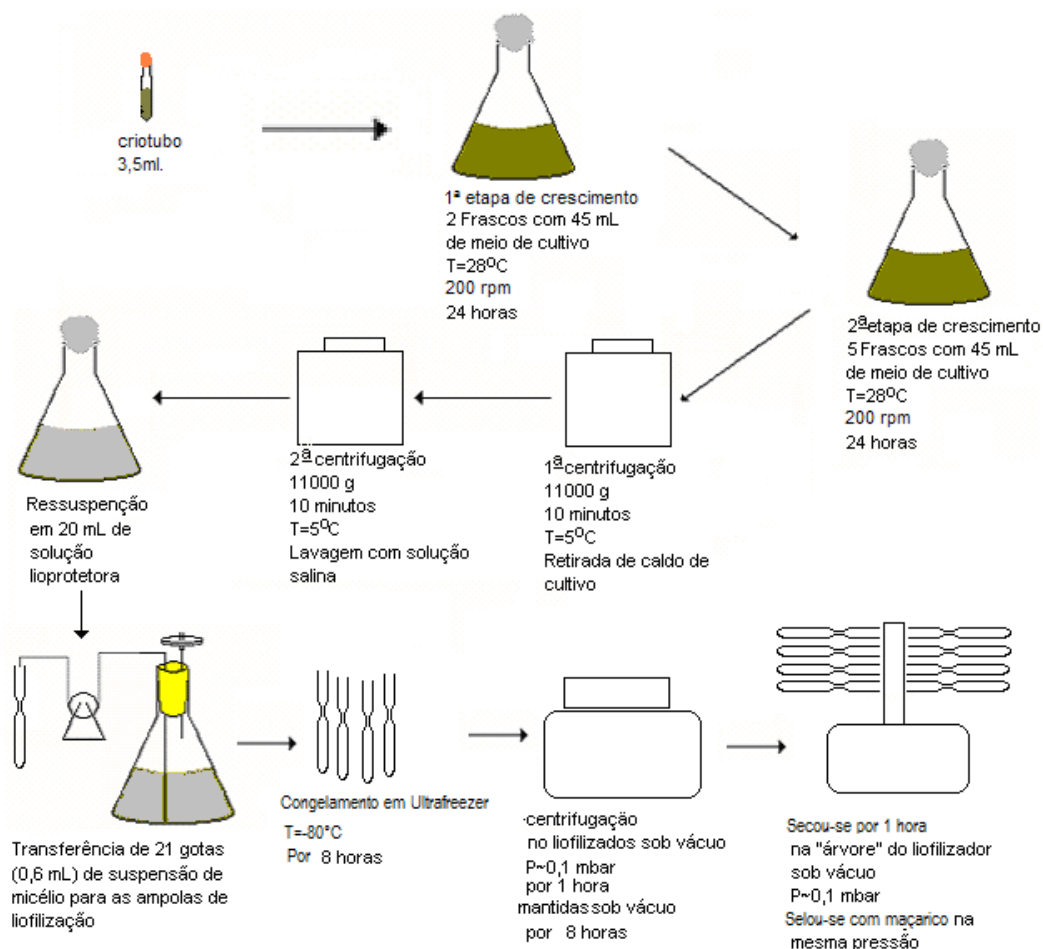
Após a retirada do caldo e da lavagem das células estas foram ressuspensas em 20 mL de solução lioprotetora (leite desnatado Difco e glutarato monosódico) com o objetivo de aumentar a concentração de células em 10 vezes em relação ao caldo inicial.

A seguir adicionaram-se 12 gotas (0,6 mL) de suspensão de células em cada ampola de liofilização. Congelou-se a suspensão de microrganismos em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 12 horas no suporte para ampolas "Spin Freezer" (centrífuga) do Liofilizador Thermo Sco. (IQ-UNESP/Araraquara). Após esse período, foi colocado o suporte no "Spin Freezer" sendo ligado sob o vácuo do liofilizador (0,1 mbar) por 1 hora e deixando as ampolas por 12 horas sob o vácuo do liofilizador (Figura 1).

Após esta etapa, abriu-se a válvula para entrada de ar no sistema do liofilizador e colocaram-se as ampolas em suporte específico que foram deixados por 1 hora sob vácuo e então foram seladas utilizando um maçarico.

Os microrganismos na forma liofilizada foram conservados em geladeira ( $T=4^{\circ}\text{C}$ ).





**Figura 5:** Metodologia utilizada na liofilização das linhagens.

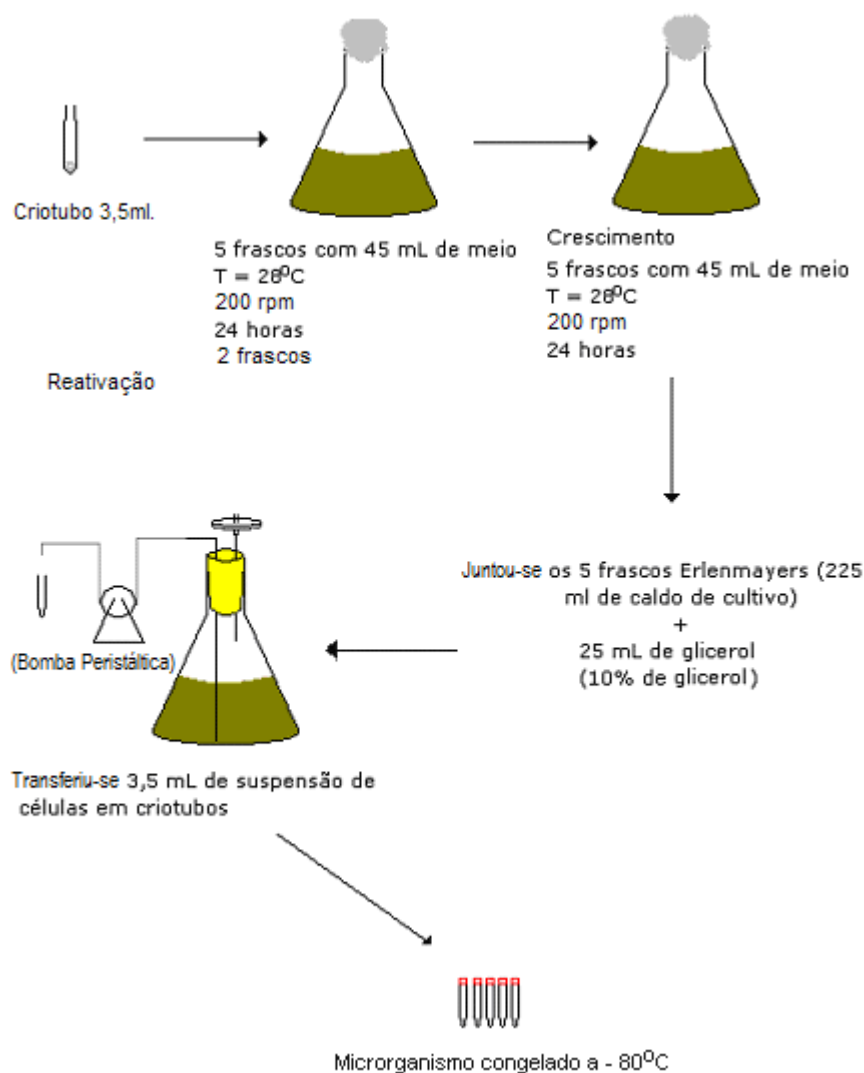
A liofilização de esporos também partiu de um criotubo. O criotubo de 3,5 ml foi vertido em um Erlenmeyer de 1L contendo 100 ml de meio Gym sólido. Após um período de 14 dias os esporos foram ressuspensos com 30 ml de solução salina (0,9 NaCl). A partir desse ponto o processo de liofilização foi o mesmo utilizado para liofilizar as células vegetativas, e as ampolas foram seladas com maçarico nas mesmas condições de pressão.

### 5.1.2 Conservação em Criotubos

Os microrganismos foram congelados em solução crio protetora (glicerol em 10% do volume do preparado) e foram mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Inicialmente um criotubo contendo 3,5 mL de microrganismo em suspensão foi utilizado para inocular 50 mL do meio Gym para reativação em 1 frasco Erlenmeyer de 500 mL e este foi mantido a  $28^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm por 24 horas. Após esse período 5 ml de inóculo foram transferidos para 2 frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultivo Gym, e mantidos nas mesmas condições por mais 24 horas. Após o cultivo, foi adicionada uma solução de glicerol de tal forma que se obteve uma suspensão com 10% de glicerol. Com o auxílio de uma bomba peristáltica transferiu-se 3,5 mL de suspensão de células para cada criotubo e em seguida congelou-se em ultrafreezer da marca Nova Forma a  $-80^{\circ}\text{C}$  (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Como descrito na literatura, os lotes de microrganismos apresentaram viabilidade para o crescimento por período superior a 6 meses, porém esse intervalo de tempo foi usado como tempo padrão para o desenvolvimento de todo o trabalho, tendo em vista que esta forma de preservação foi utilizada devido à praticidade para a realização de ensaios.



**Figura 6:** Metodologia utilizada para obtenção de um lote de criotubos

### 5.1.3 Preservação dos Microrganismos Teste

As linhagens *Escherichia coli* ESS e a *K. pneumoniae* utilizadas foram preservadas em tubo inclinado em geladeira (4°C). Nesse caso, repiques sucessíveis foram realizados para a preservação do microrganismo. Os tubos inclinados foram preparados utilizando o meio MB1. Para o crescimento do microrganismo em meio sólido, os tubos inclinados foram mantidos a uma temperatura de 37°C por 1 e 2 dias, para a *E. coli* e para a *K. pneumoniae* respectivamente.

## 5.2 Cultivos em Meio Sólido:

Para propagação em placa de Petri utilizaram-se três meios sólidos: meio ISP 4, meio ISP 5 e meio GYM descritos na Tabela 1 para cultivo em placas com a finalidade de estudar as características morfológicas das linhagens.

Foi utilizado o método de sementeira dos microrganismos por estrias nos três meios de cultivos. Esse método consistiu em realizar, com o auxílio de uma alça de platina, três grupos de estrias de maneira a levar ao esgotamento de células. O crescimento de *Streptomyces carpaticus* após 14 dias de cultivo em placa de Petri, pode ser acompanhado na Figura 3. Pode-se observar na Figura 4 o crescimento do *Streptomyces acrymicini* após 8 dias de crescimento. Observa-se que as colônias desenvolveram-se, de maneira a encobrir o traçado do estriamento característico do método de sementeira. Na Figura 5 está retratado o crescimento com 14 dias em meio sólido de *Streptomyces cebimarensis*.



**Figura 7:** *Streptomyces carpaticus* em meio sólido

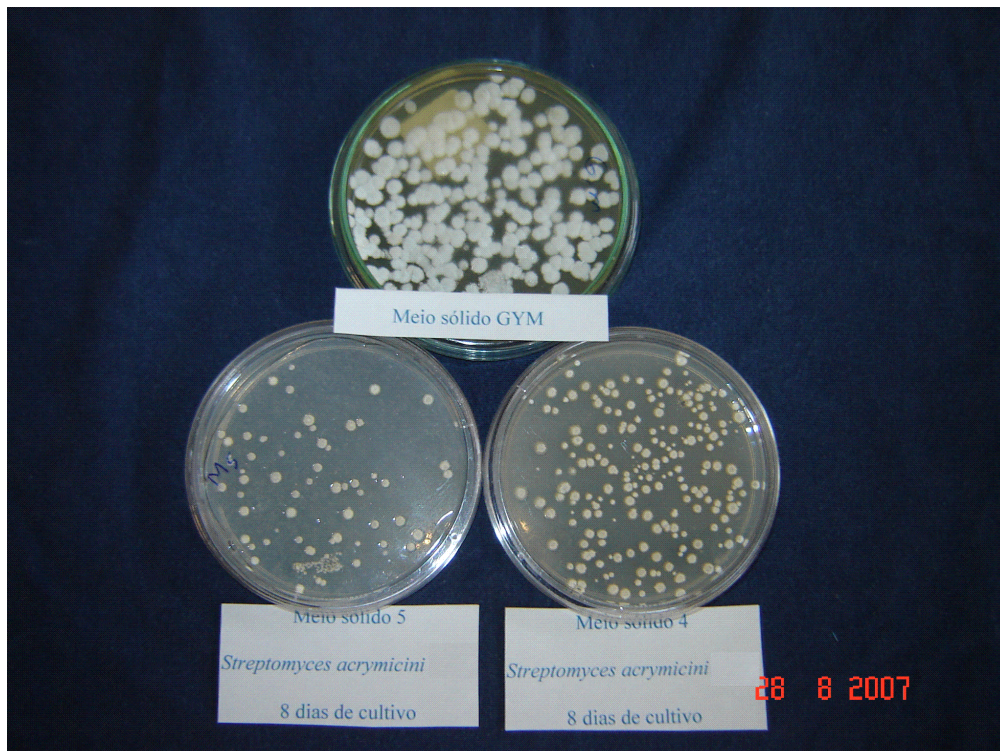


Figura 8: *Streptomyces acrymicini* em meio sólido

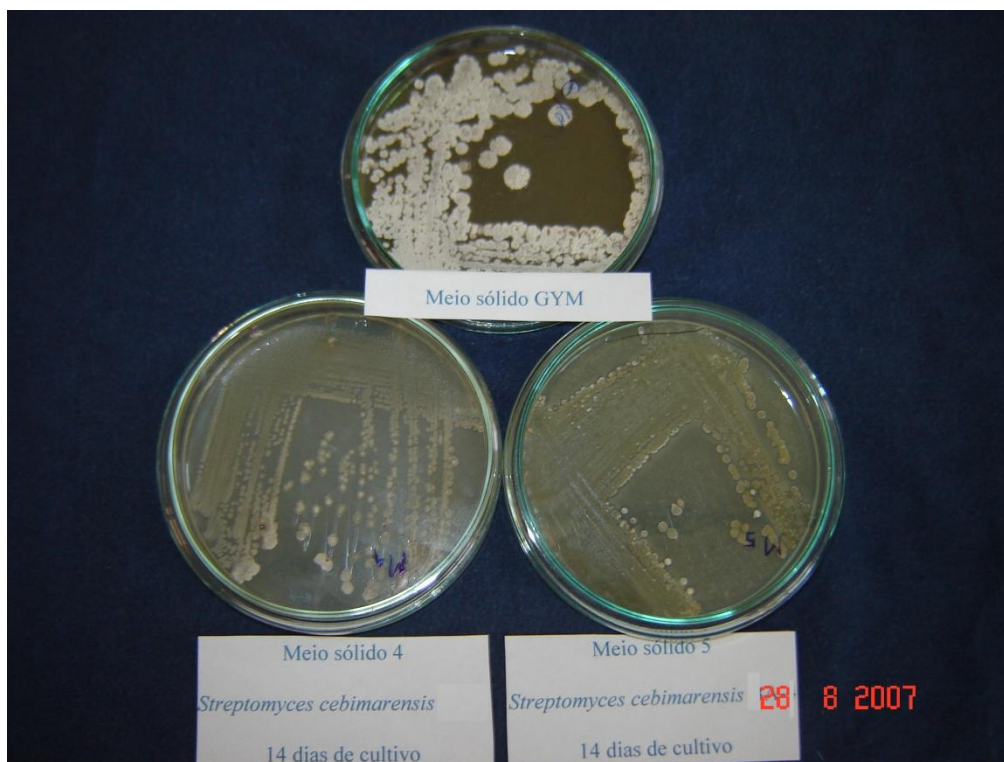


Figura 9: *Streptomyces cebimarensis* em meio sólido

### 5.3 Cultivo Submerso

#### 5.3.1 Cultivos em Mesa Incubadora Rotativa

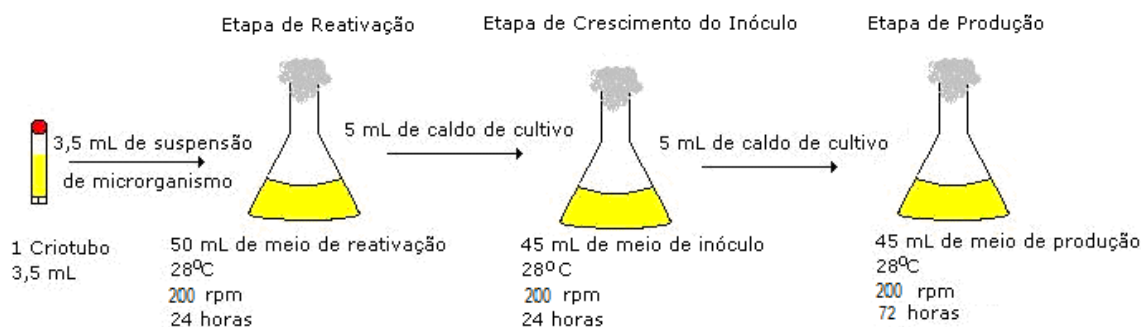
Foram realizados cultivos em meio líquido utilizando frascos Erlenmeyers com capacidade de 500 ml.

A reativação para todos os experimentos com as três linhagens de microrganismos foi realizada em meio Gym, porque as três espécies de *Streptomyces* do trabalho demonstraram melhor crescimento nesse meio, comparativamente aos outros meios testados. Isso ocorreu provavelmente pela facilidade com que os microrganismos assimilam glicose como fonte de carbono, fato que pode ser melhor observado nos cultivos em biorreator e comprovado nos cultivos em meio mínimo.

Para o procedimento de reativação dos microrganismos foram inoculados a partir de microrganismos preservados em criotubos de 3,5ml 2 frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume contendo 50 mL de meio de cultivo para cada linhagem. Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa a agitação de 200 rpm e temperatura 28 °C.

Após 24 horas de cultivo observou-se visualmente o crescimento das culturas devido à turvação e mudança de coloração do caldo de cultivo além da formação de biofilme nas paredes dos frascos. Em seguida um dos frascos Erlenmeyer foi selecionado, observando-se aquele em que os microrganismos tivessem melhor crescimento, comparando-se quantidade de biofilme formado e a turvação do meio visto a olho nú. O caldo do frasco escolhido foi utilizado como inóculo para dois frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume, contendo 40 mL de meio de cultivo cada um.

A seguir foram inoculados com 10 mL (20%) do caldo de cultivo proveniente do frasco de inóculo após 24h. O conteúdo dos dois frascos Erlenmeyers (aprox. 20% de volume final) foi vertido em um balão volumétrico de 3 litros contendo 400 mL de meio de cultura. Com auxílio de bomba peristáltica, foram distribuídos 50 mL em frascos Erlenmeyers de 500 mL (Figura 6). Foi utilizado 1 frasco Erlenmeyer para cada amostra retirada.



**Figura 10:** Fases de Inóculo para Cultivo em Mesa Incubadora Agitada

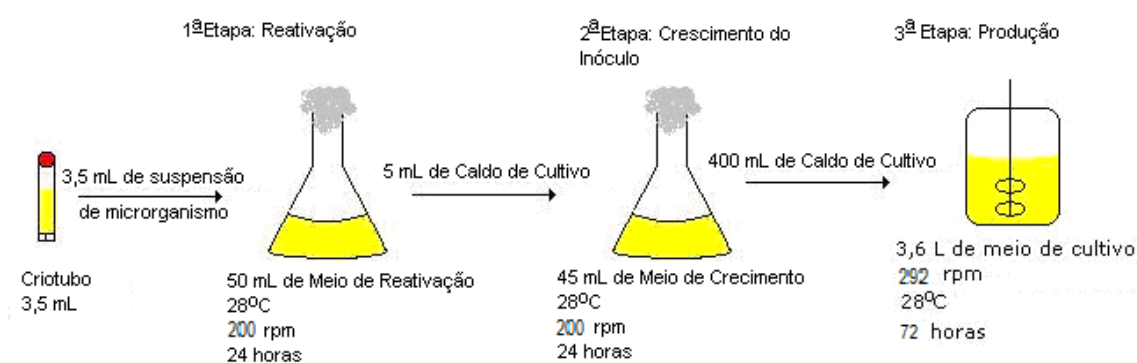
Em todos os cultivos, foram retiradas alíquotas de 20 mL (e removendo o frasco Erlenmeyers do shaker) em intervalos inicialmente de 6 horas (para que a fase de crescimento logarítmica pudesse ser melhor acompanhada), e após 30 horas de cultivo, de 12 em 12 horas das quais foi determinada inicialmente a concentração total de células através do método de medida de massa seca. Após análise inicial dos meios, a quantificação dos substratos do meio escolhido, utilizando para isso a análise em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC). Os cultivos tiveram duração de 72h.

Após a escolha do meio de cultura, que apresentou os melhores resultados quanto ao aumento da concentração de biomassa celular, foram elaborados experimentos para verificar a influência da concentração osmótica sobre o crescimento das linhagens. Nesses experimentos avaliaram-se 3 concentrações de sais que simulam a água do mar: água destilada sem adição de sais, 50% da quantidade de sais na água destilada e 100% da quantidade de sais na água destilada. Nas mesmas condições de cultivo supracitadas.

Por fim, ensaios foram realizados com um conjunto de dezesseis experimentos utilizando-se como base o meio mínimo e combinando as quatro fontes de Carbono (glicose, sacarose, extrato de malte e amido), e quatro de Nitrogênio (extrato de levedura, peptona, fosfato de amônia, sulfato de amônia), nas mesmas condições de cultivos supracitadas.

### 5.3.2 Cultivos em Biorreator

Os cultivos realizados em biorreatores iniciaram-se da mesma forma que os cultivos realizados em mesa incubadora rotativa, (Shaker). Conforme ilustrado na Figura 7, os pré inóculos e os inóculos foram preparados em mesa incubadora agitada a 200 rpm, à 28°C por 24h utilizando 2 Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL de meio Gym. Foram inoculados 5ml de caldo de cultivo retirados do pré inoculo em 10 frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio Gym.



**Figura 11:** Fases de Inóculo para Cultivo em Biorreator

Os microrganismos *Streptomyces carpaticus*, *Streptomyces cebimarensis* e *Streptomyces acrymicini* foram inoculados nos biorreatores contendo 3,6 litros de meio de cultura com frequência do impelidor a 292 rpm e aerados a 0,5 vvm e para simular aproximadamente as condições de troca de  $O_2$  ar e meio de cultivo observadas nos experimentos realizados em shaker (200 rpm em frascos Erlenmayer de 500 mL com 50 ml de meio), com temperatura de 28°C por 72h. A velocidade de 292 rpm foi determinada com base no trabalho de Rosa (2002). Rosa estudou o  $k_{La}$  (Coeficiente de transferência oxigênio do ar para o meio) e determinou para diferentes condições de agitação e aeração em fermentador e em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 50 mL em mesa incubadora rotativa utilizando água ( $k_{La}$  shaker =  $k_{La}$  biorreator).

Foi escolhido o meio de melhor crescimento para as 3 linhagens (Gym),



neste cultivo não foi adicionado o sal Read Sea Coral, usado para simular a água do mar. Foi adicionada ao meio a solução de sais utilizada para os cultivos em meio mínimo nas mesmas proporções que as descritas para esse meio.

Nos 3 cultivos em biorreator não foram controlados o pH e o oxigênio dissolvido, sendo estes apenas monitorados. O objetivo desses cultivos foi simular em biorreator as condições de cultivo encontradas em mesa incubadora rotativa, para coleta de dados mais precisos, com menor margem de erro e monitoramento das condições de Oxigênio dissolvido durante o processo para verificar possíveis limitações.

## 6. Resultados e Discussão

Foram obtidos resultados de reativação quanto a viabilidade celular utilizando a preservação em criotubos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As linhagens preservadas assim foram utilizadas em todo o trabalho devido a facilidade de reativação permitida por esse método de preservação. Também há relatos na literatura (Pamboukian e Facciotti, 2005) de *Streptomyces* preservados em criotubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esses autores estudaram *Streptomyces olindensis* ICB20 e da mesma forma que foi utilizada no presente trabalho, fizeram uso do glicerol 20% como crioprotetor.

A forma liofilizada dos três *Streptomyces* marinhos foi utilizada como recurso de preservação das linhagens por longos períodos.

### 6.1 Características Morfológicas e Culturais dos Microrganismos em Meio Sólido.

As características morfológicas das culturas em meio sólido das três espécies de *Streptomyces* investigadas estão dispostas nas Tabelas 5, 6 e 7. A análise morfológica foi realizada avaliando-se o tamanho, formato e a coloração das colônias bem como a produção de pigmentos em meio de cultura.

**Tabela 5:** Caracterização de *Streptomyces carpaticus* em meio sólido

<b>Características</b>	<b>Meio ISP4</b>	<b>Meio ISP5</b>	<b>Meio GYM</b>
Coloração da colônia na superfície	Branca	Branca acinzentada	Branca acinzentada
<b>Coloração da colônia no verso da placa</b>	<b>Branca</b>	<b>Branca acinzentada</b>	<b>Cinza esverdeada</b>
Produção de pigmentos	—	—	Verde oliva
<b>Forma da colônia</b>	Micro-colônias com 0,1 cm de tamanho com superfície rugosa e bordas onduladas	Micro-colônias com 0,1 cm de tamanho com superfície convexo e bordas irregulares	0,4-0,5 cm de tamanho com superfície convexa, borda lisa (entire), colônias circular

*Streptomyces carpaticus* (Tabela 5) desenvolveu-se de maneira bastante concentrada nas placas de Petri em todos os meios de cultivo aos quais foi submetido. Esta linhagem foi a única que apresentou produção de pigmento, que foi produzido em todos os meios de cultura testados em estado líquido, porém só em meio Gym no estado sólido.

Assim como relatado por Fischer, Kimati e Martins (2003) que cultivaram *Streptomyces spp*, as colônias apresentaram desenvolvimento que mantiveram suas características semelhantes em todos os meios de cultura avaliados, assim como capacidade de formação de esporos.

**Tabela 6:** Caracterização de *Streptomyces acrymicini* em meio sólido

<b>Características</b>	<b>Meio ISP4</b>	<b>Meio ISP5</b>	<b>Meio GYM</b>
Coloração da colônia na superfície	Bege amarelada	Bege amarelada	Branças e Pretas
<b>Coloração da colônia no verso da placa</b>	<b>Bege esbranquiçado</b>	<b>Bege amarelado</b>	<b>Bege e preto</b>
Produção de pigmentos	_____	_____	_____
<b>Forma da colônia</b>	Micro colônias com 0,1cm de tamanho com superfície e bordas lisas.	0,2 a 0,3cm de tamanho com superfície rugosa e bordas onduladas não elevadas	0,4 a 0,5 cm. Brancas: superfície rugosa e bordas onduladas, elevadas. Colônias Pretas: sem rugosidade na superfície, crateriformes acentuadas

*Streptomyces acrymicini* apresentou crescimento com colônias dispersas nos meios ISP4 e ISP5 enquanto que no meio Gym o crescimento foi relativamente maior com colônias maiores presentes em praticamente toda a placa de Petri. Após 8 dias de cultivo apresentou diferenciação da morfologia e coloração de algumas colônias, sendo que algumas colônias se tornaram, sem

rugosidade na superfície e crateriformes de maneira acentuada, sendo que no início do crescimento dessas colônias elas eram brancas de superfície rugosa e bordas onduladas e elevadas. As colônias diferenciadas foram isoladas em outras placas de Petri e apresentaram o mesmo comportamento, novamente com algumas colônias se alterando e outras permanecendo com as características iniciais do crescimento, demonstrando assim a ausência de contaminantes. O *Streptomyces acrymicini* cresceu mais rapidamente (em 8 dias a placa foi totalmente povoada) que as outras duas linhagens que foram observadas até 14 dias para serem então fotografadas.

**Tabela 7:** Caracterização de *Streptomyces cebimarensis* em meio sólido

<b>Características</b>	<b>Meio ISP4</b>	<b>Meio ISP5</b>	<b>Meio GYM</b>
Coloração da colônia na superfície	Bege amarelada	Bege amarelada	Colônias brancas e pretas. Colônias pretas sem rugosidade na superfície e apresentando característica crateriforme bem acentuada
Coloração da colônia no verso da placa	Bege esbranquiçada	Bege amarelada	Amarelo
Produção de pigmentos	_____	_____	_____
<b>Forma da colônia</b>	Micro-colônias 0,1 cm de tamanho com superfície e bordas lisas	0,2-0,3 cm, com superfície rugosa e bordas onduladas não elevadas	0,4-0,5 cm, com superfície rugosa crateriforme, borda ondulada, colônias elevadas

*Streptomyces cebimarensis* desenvolveu-se em meio Gym de maneira concentrada enquanto nos meios ISP4 e ISP5 teve um crescimento

relativamente menor com colônias menores que as apresentadas no meio Gym.

## 6.2 Ensaio em Mesa Incubadora Rotativa

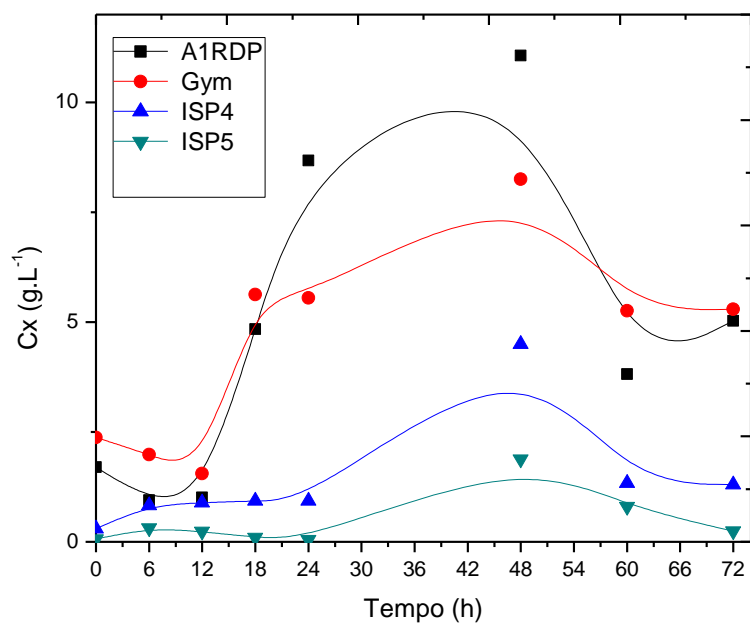
Foram realizados cultivos submersos com os quatro meios descritos na literatura sendo eles: meio A1RDP, Gym, ISP4 e ISP5 (Tabela 1). As três espécies apresentaram crescimentos nos quatro meios de cultivo, porém cresceram relativamente menos nos meios ISP4 e ISP5.

As linhagens apresentaram crescimento acima de  $4\text{g.l}^{-1}$  nos meios A1RDP e Gym, sendo o último selecionado por apresentar bons resultados para os três *Streptomyces* e um bom tempo para a reativação das linhagens, além de possuir fontes de carbono mais solúveis que o amido presente no meio A1RDP e que possibilitaram uma análise mais precisa na cromatografia líquida de alta performance, por não haver necessidade de realizar uma digestão das amostras e favorecendo também a metodologia da massa seca.

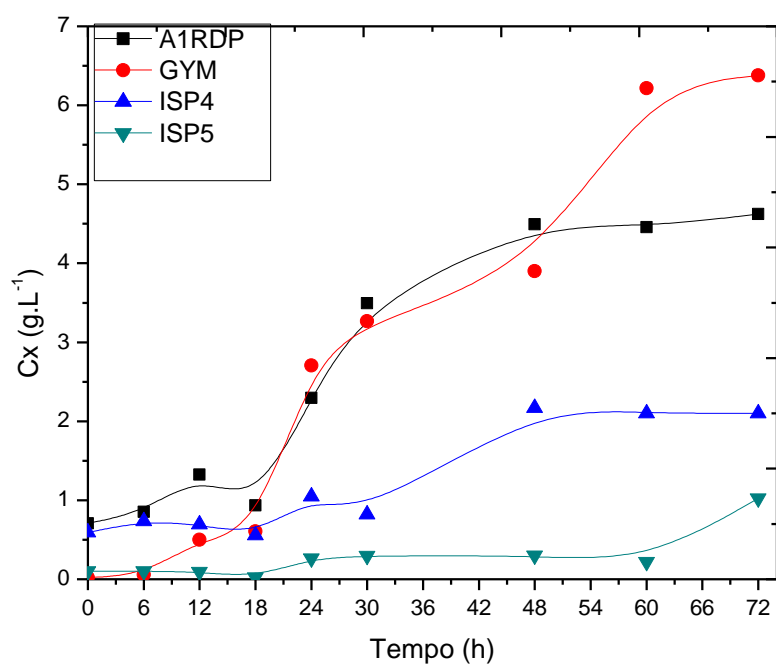
Além disso em ensaios preliminares realizados por Hernandez quando identificou a linhagem *S. cebimarensis* também já foram detectadas em meio Gym substâncias que apresentaram atividade citotóxica, sendo esse meio de cultura sugerido para mais estudos.

O *Streptomyces carpaticus* desenvolveu-se de maneira muito similar em meio Gym e meio A1RDP tanto no aumento de concentração celular como no tempo para o início da fase exponencial de crescimento (Figura 8).

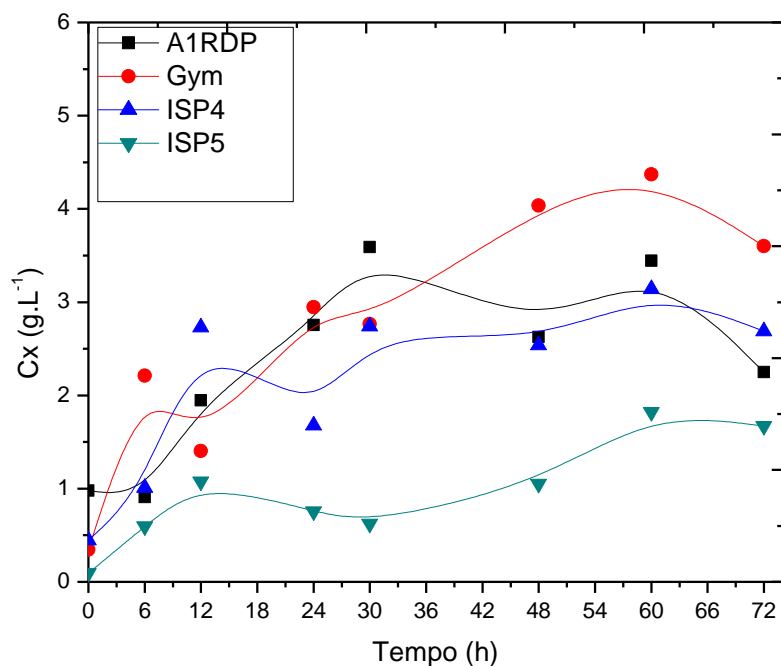
Os perfis de concentração celular das linhagens *Streptomyces acrymicini* e *Streptomyces cebimarensis* estão representados nas Figuras 9 e 10 respectivamente. Ambas linhagens se desenvolveram pouco em meio ISP5, e tiveram seu melhor crescimento em Meio Gym, atingindo aproximadamente  $4\text{g.l}^{-1}$  em 48 horas de cultivo. No caso dos *Streptomyces acrymicini* o crescimento foi maior que  $6\text{g.l}^{-1}$ .



**Figura 12:** Perfil de crescimento de *Streptomyces carpaticus* nos meios A1RDP, Gym, ISP4 e ISP5.

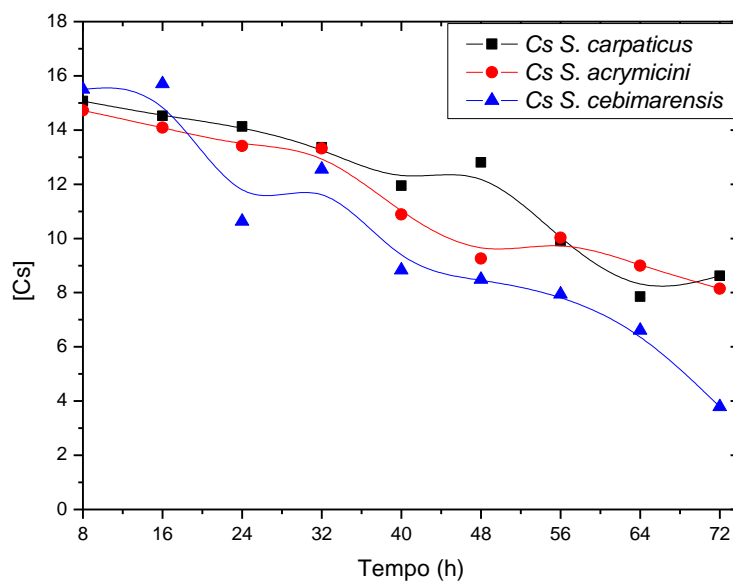


**Figura 13:** Perfil de crescimento de *Streptomyces acrymicini* nos meios A1RDP, Gym, ISP4 e ISP5.



**Figura 14:** Perfil de crescimento de *Streptomyces cebimarensis* nos meios A1RDP, Gym, ISP4 e ISP5.

Através do método DNS para a análise da concentração de açúcares redutores foi observado o consumo das fontes de carbono Figura 11.



**Figura 15:** Perfil do consumo das fontes de carbono durante o cultivo em meio Gym das três linhagens de *Streptomyces*.

Comparando-se os resultados obtidos nos cultivos, as três linhagens demonstraram resultados semelhantes em termos de aumento da concentração celular com os quatro meios descritos na literatura, assimilando glicose e maltose (presentes no mesmo meio, Gym) e amido (A1RDP) como fontes de carbono que resultaram nos melhores resultados de aumento de biomassa. No que tange a adequação da fonte de nitrogênio, as fontes de nitrogênio orgânicas favoreceram o crescimento em contraste com as fontes inorgânicas.

Foram realizados bioensaios com a *Escherichia coli* e com *Klebsiella pneumoniae*, com os caldos dos cultivos das 3 linhagens nos 4 meios de cultura descritos, porém não foi detectada presença de inibidores de  $\beta$ -lactamase, e também não foram encontrados compostos capazes de inibir o crescimento de microrganismos Gram-negativos.

O meio Gym foi o que mais favoreceu, no geral, o crescimento das três espécies. Sendo este de composição simples, o mesmo foi escolhido como meio de cultura para reativação das linhagens para os testes com as diferentes concentrações de sais.

Para verificar o efeito da concentração osmótica no crescimento em meio Gym, foram realizados cultivos em mesa incubadora rotativa com esse meio contendo água destilada, água com 50% de sais que simulam água do mar diluída ( $16,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e água do mar 100% ( $33,3 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Os cultivos foram interrompidos após 48h, pois o objetivo destes ensaios foi constatar se haveria crescimento das linhagens nas diferentes variações de pressões osmóticas aqui descritas e sua influência no tempo para que se iniciasse a fase exponencial de crescimento.

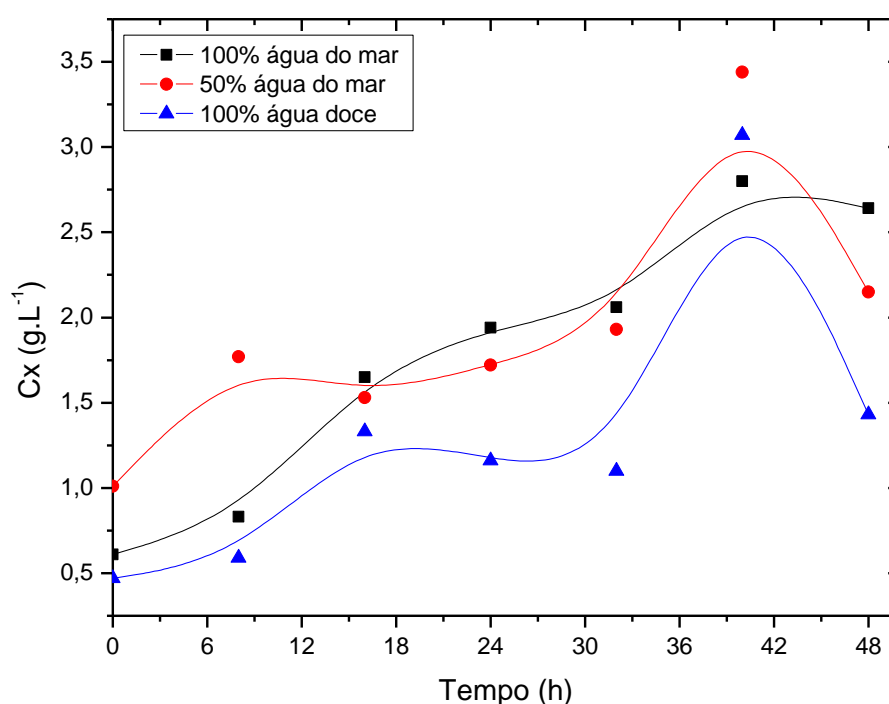
Os resultados obtidos não indicaram uma condição de concentração de sais que sobressaísse de forma considerável como a mais favorável ao crescimento para nenhuma das 3 linhagens, sendo que os *Streptomyces* cresceram nas 3 condições testadas.

Verificou-se porém, que a condição osmótica com  $33,3 \text{ g.L}^{-1}$  para o cultivo de *Streptomyces carpaticus* mostrou-se um pouco inferior as outras condições, apesar das linhagens serem de origem marinha (Figura 12). Já no cultivo de *Streptomyces acrymicini* e *Streptomyces cebimarensis* (Figuras 13 e 14) os cultivos em água doce foram um pouco inferiores quanto à concentração

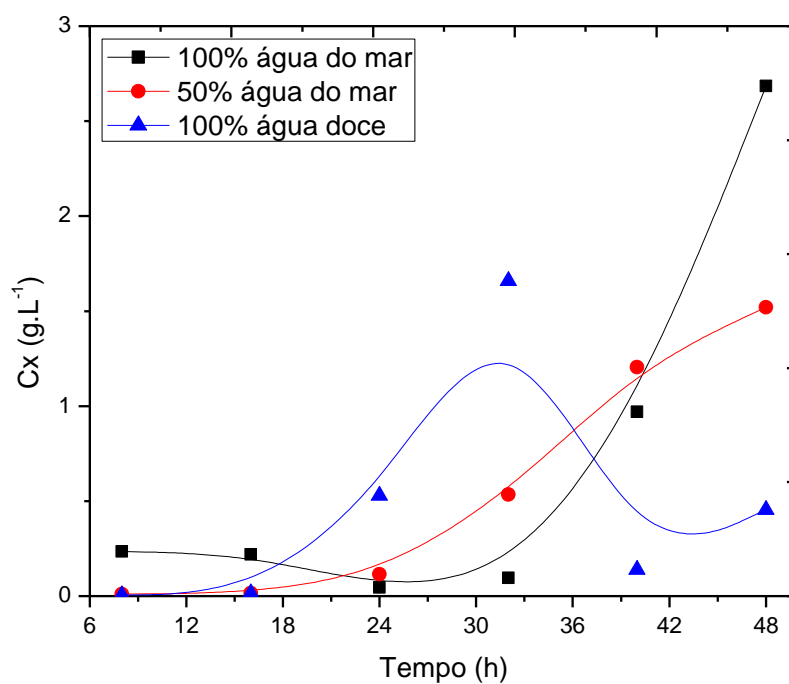


celular das outras duas condições, ressalta-se porém, que não foi adicionada neste cultivo nenhuma solução de sais.

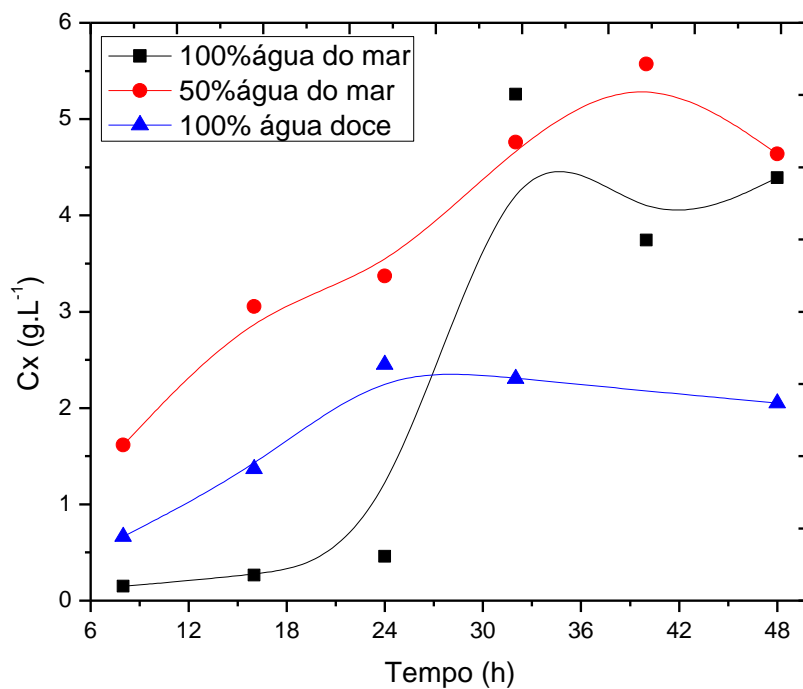
Observou-se que as três linhagens cresceram de forma similar até esta etapa do trabalho, quanto a preferência por um meio de cultura como mostraram os resultados de crescimento nos 4 meios de cultivo descritos na literatura, o meio Gym foi o que mais favorece o crescimento das 3 linhagens.



**Figura 16:** Perfil de crescimento de *Streptomyces carpaticus* no meio Gym em três condições de concentração osmótica.



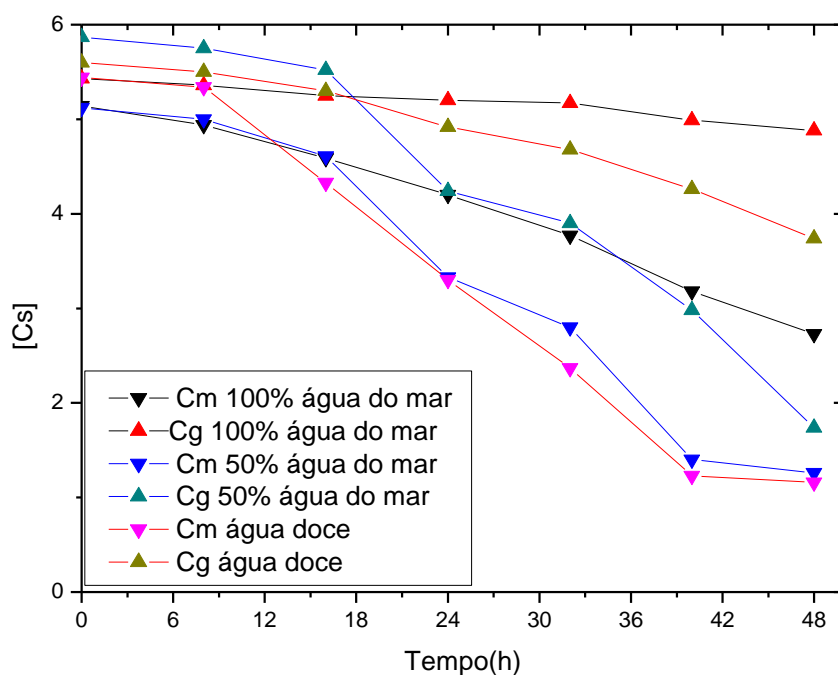
**Figura 17:** Perfil de crescimento de *Streptomyces acrymicini* no meio Gym em três condições de concentração osmótica.



**Figura 18:** Perfil de crescimento de *Streptomyces cebimarensis* no meio Gym em três condições de concentração osmótica.

Foram retiradas amostras dos experimentos realizados com os *Streptomyces carpaticus* que variaram a concentração dos sais que simulam a água do mar para análise. Essas amostras foram submetidas a análise pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 15) com a finalidade de observar a variação das concentrações de substratos com o tempo e conseqüentemente ter uma estimativa do consumo das fontes de carbono pelas linhagens.

Pode-se observar pela queda na concentração de glicose (Cg) que há pouco consumo desta fonte de carbono no cultivo em água do mar 100%, entretanto a concentração de maltose (Cm) cai rapidamente em água doce enquanto a queda da concentração de glicose é mais lenta. Já em 50% água do mar consome quase que simultaneamente.

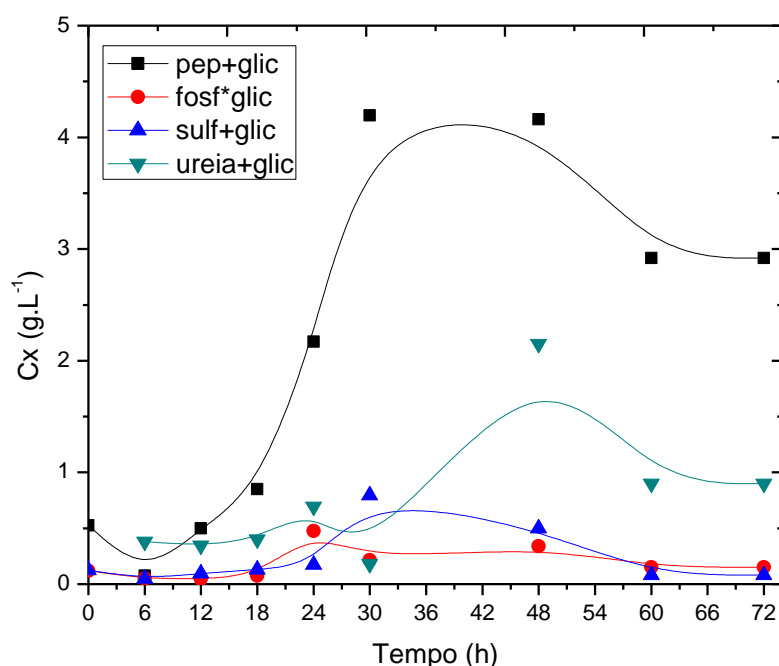


**Figura 19:** Perfil da concentração dos substratos glicose (Cg) e maltose (Cm) durante os cultivos de *Streptomyces carpaticus* em meio Gym nas três condições osmóticas

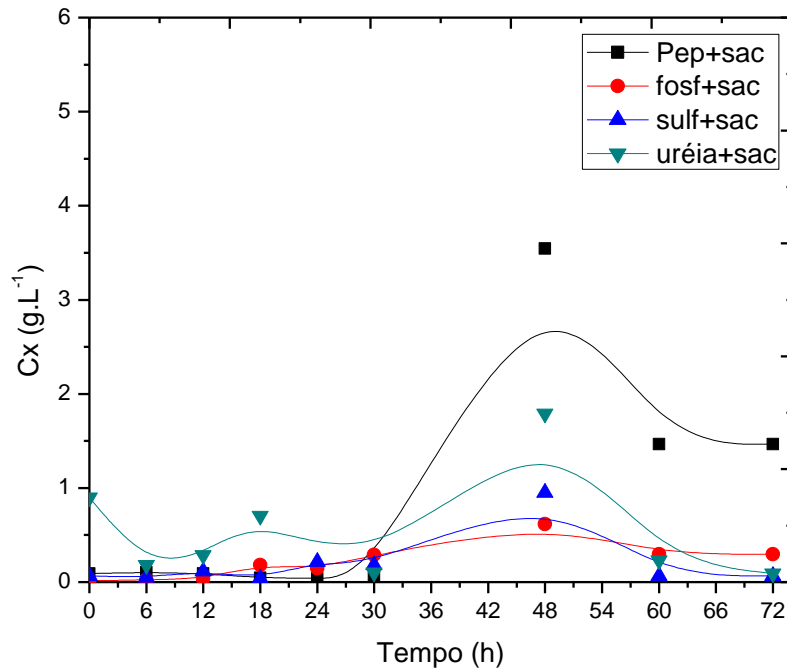
Após essa etapa de experimentos foram realizados cultivos que variaram as fontes de Carbono e Nitrogênio. Foi preparado um conjunto de

dezesesseis experimentos, combinando quatro diferentes fontes de carbono e quatro fontes de nitrogênio dispostas em um meio de cultivo “mínimo” contendo 50% da concentração de sais sintéticos para simular a água do mar, pois sendo microrganismos marinhos e o meio utilizado era o descrito como “mínimo”, sua composição já limitante e a falta de algum sal poderiam influenciar no crescimento da linhagem.

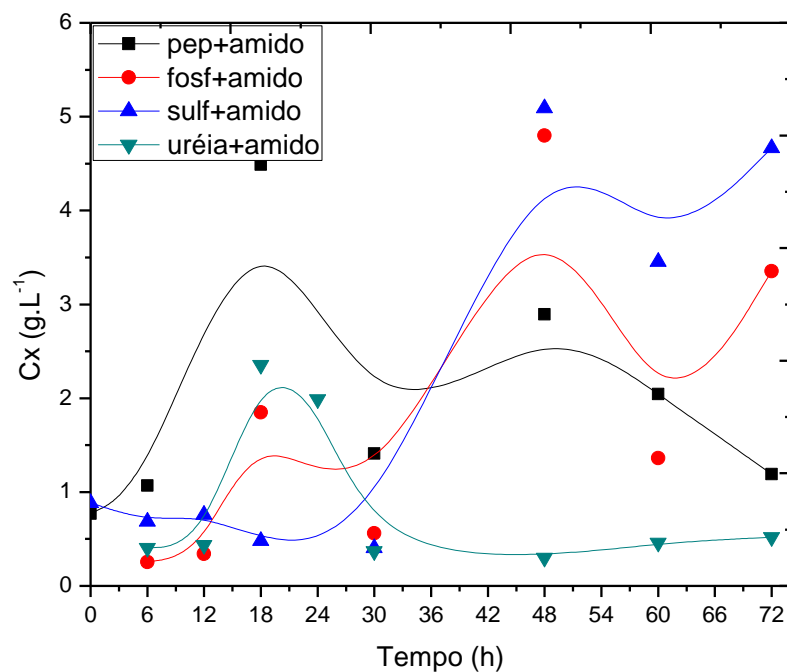
Os experimentos realizados com o *Streptomyces carpaticus* (Figura 16) mostraram a glicose e a peptona como as melhores fontes de carbono (concentração de 10 g.L<sup>-1</sup>) e nitrogênio (concentração de 5 g.L<sup>-1</sup>) respectivamente. Porém nenhum dos resultados obtidos nesses cultivos (Figuras 16, 17, 18 e 19) resultou valores de concentração celular maiores que os obtidos em meio Gym (Figura 8), mas os resultados alcançados com a glicose sugerem que está é a fonte de carbono melhor assimilada, sendo que o meio Gym também conta com glicose em sua composição (4 g.L<sup>-1</sup>)



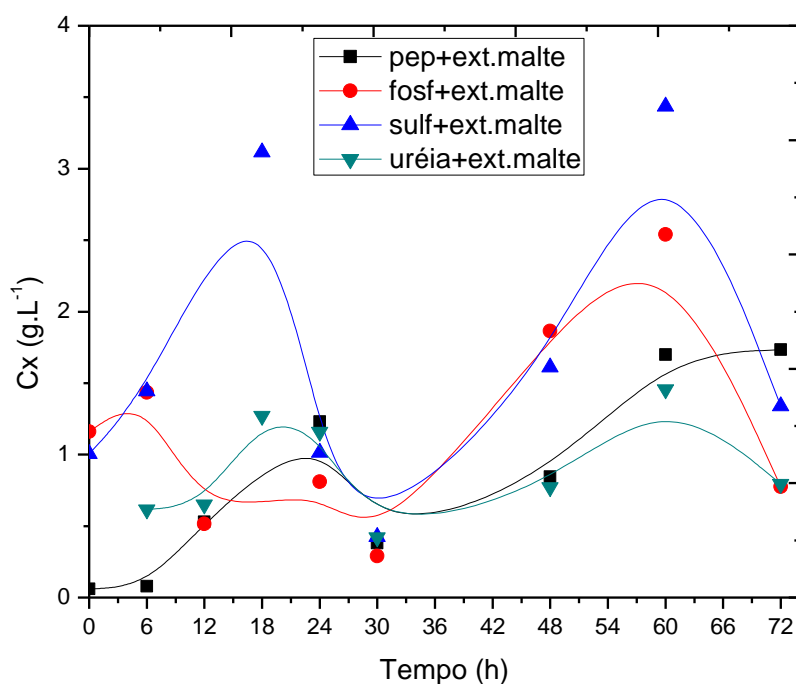
**Figura 20:** Perfil de crescimento do *Streptomyces carpaticus* em meio mínimo com glicose como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.



**Figura 21:** Perfil de crescimento do *Streptomyces carpaticus* em meio mínimo com sacarose como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.



**Figura 22:** Perfil de crescimento do *Streptomyces carpaticus* em meio mínimo com amido como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.



**Figura 23:** Perfil de crescimento do *Streptomyces carpaticus* em meio mínimo com extrato de malte como fonte de carbono e quatro fontes de nitrogênio.

Para todos os ensaios realizados em meio mínimo foram realizados bioensaios com a *Escherichia coli* e com a *Klebsiella pneumoniae*, porém não foi detectada presença de inibidores de  $\beta$ -lactamase, e também não foram encontrados compostos capazes de inibir o crescimento de microrganismos Gram-negativos.

### 6.3 Ensaios em Biorreatores

Foi escolhido o meio Gym para os cultivos em biorreatores. Os três microrganismos se desenvolveram nas diferentes concentrações osmóticas apesar de terem sido isolados em ambiente marinho. Dessa maneira, como verificou-se no capítulo 6 (Figuras 11, 12 e 13) a adição aos cultivos de água do mar ou de sais que simulem sua composição não é necessária para o crescimento das três linhagens de *Streptomyces*. Mediante isso optou-se por utilizar esse meio de cultivo com água doce para os cultivos em biorreatores,

sendo o meio composto por água doce mais prático e barato sem a adição dos sais que simulam a água do mar. O cultivo em água doce também favorece a determinação da massa celular, tendo menos concentração de solutos no caldo.

Adicionou-se ao meio 1ml/L da solução de traços de sais (descrita na tabela 2) também usada nos cultivos em meio mínimo.

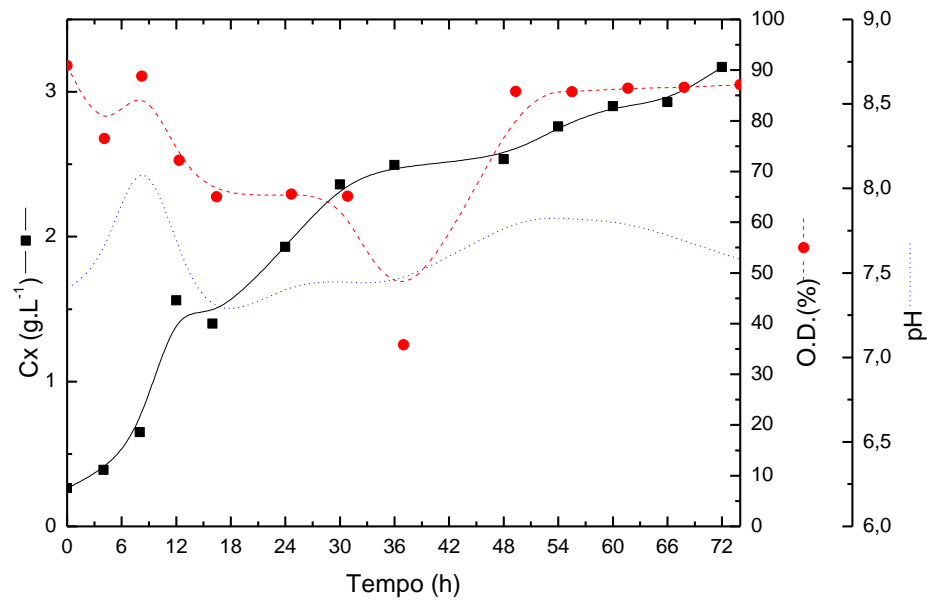
Observaram-se resultados de crescimento nos cultivos em biorreatores para as 3 espécies de *Streptomyces* com concentrações celulares de aproximadamente 4g/L com o *S. carpaticus* (Figura 20),e superando 4g/L com o *S. acrimycini* (Figura 21) Ivest e Bushell (1997) relataram o cultivo de *S. clavuligerus* em meio mínimo de crescimento no qual glicerol foi utilizado como fonte de carbono e NH.Cl (N-) como fonte de Nitrogênio, atingindo concentrações de aproximadamente 5g/L de células em cultivo em biorreator com agitação de 700rpm. No presente trabalho utilizando *S. cebimarensis* foram obtidas concentrações celulares comparativamente superiores na ordem de quase 6g/L (Figura 22). Está concentração mais elevada obtida pode ser explicada, provavelmente, devido a composição do meio de cultura onde foi cultivada a espécie, outro fator a ser considerado é o uso de uma agitação mais branda (292rpm) para evitar o cisalhamento.

Embora tenham sido utilizadas nos cultivos em biorreator deste trabalho as mesmas condições para todas as linhagens houveram visíveis diferenças da concentração de biomassa, esse fato deve-se, possivelmente, a limitações fisiológicas das linhagens.

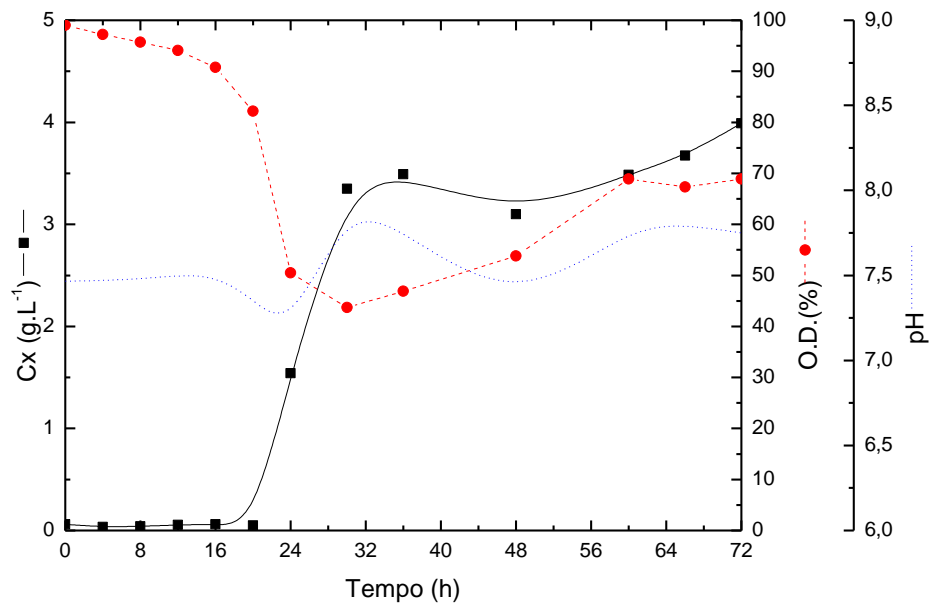
As condições dos cultivos realizados em biorreatores, como já foi relatado, foram mais “brandas” (292 rpm de agitação, ph 7 e 28°C) quanto aeração do biorreator do que a maioria dos parâmetros encontrados na literatura para cultivos de *Streptomyces*. Para *Streptomyces olindensis* por exemplo há relatos de utilização de 500 rpm de agitação para biorreatore de 4 litros (Fischer, Kimati e Martins, 2003) com pH também em 7 e uma temperatura de 30°C.

Pode-se observar que o perfil de concentração do oxigênio dissolvido foi coerente com a curva de crescimento. O pH manteve-se relativamente estável em todos os cultivos. A maior variação observada foi no cultivo de

*Streptomyces cebimarensis* (Figura 22) iniciando em pH 7,1 (0h) e atingindo pH 8,2 ao término do cultivo (72h).

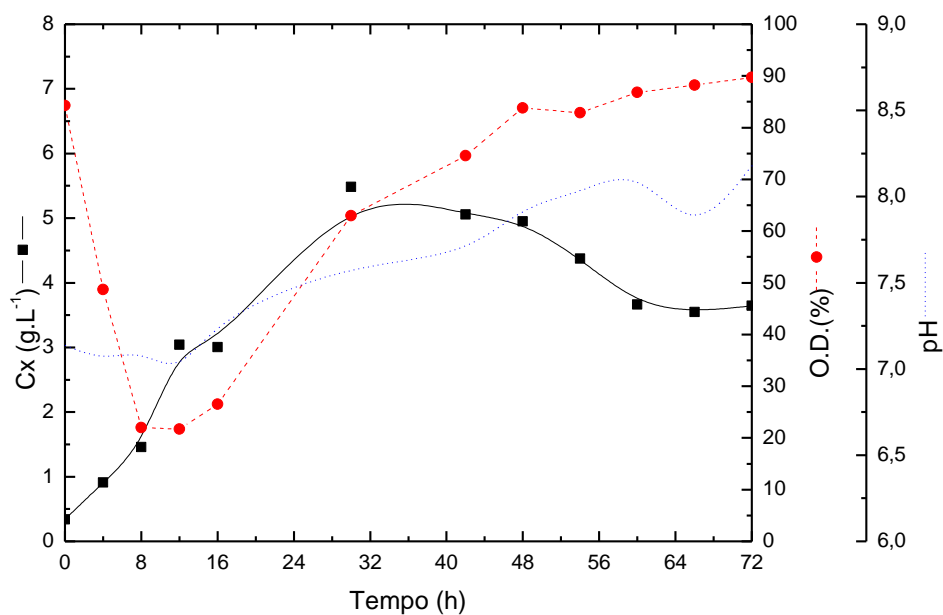


**Figura 24:** Evolução da concentração celular, do pH e do O.D. referente ao cultivo de *Streptomyces carpaticus* em biorreator.



**Figura 25:** Evolução da concentração celular, do pH e do O.D. referente ao cultivo de *Streptomyces acrymicini* em biorreator.





**Figura 26:** Evolução da concentração celular, do pH e do O.D. referente ao cultivo de *Streptomyces cebimarensis* em biorreator.

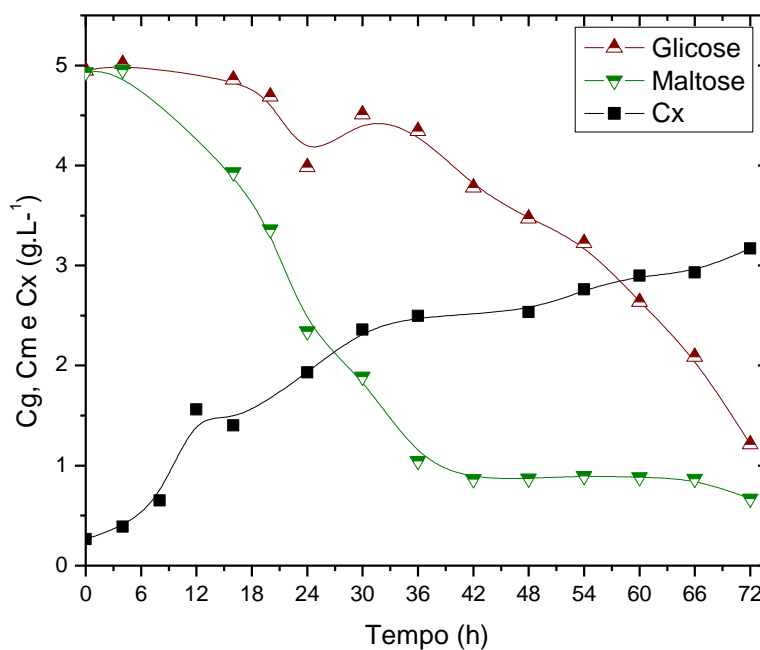
Observando-se o consumo de substrato mostrado nas Figuras 23, 24 e 25 e a evolução do crescimento celular das linhagens, os resultados evidenciam um comportamento diáuxico dos três Streptomycetos.

Verifica-se, porém que *Streptomyces carpaticus*, diferentemente dos *Streptomyces acrymicini* e *Streptomyces cebimarensis*, consome preferencialmente a maltose como fonte de carbono, mesmo com disponibilidade de 4g.L<sup>-1</sup> de glicose no meio de cultivo, confirmando assim o comportamento observado no cultivo em mesa incubadora agitada.

Para as linhagens *S. acrymicini* e *S. cebimarensis*, as análises do consumo das fontes de carbono mostram um comportamento mais típico de uso de substrato, sendo que o consumo preferencial é de glicose enquanto a maltose só começa a ser consumida quando a glicose disponível está próxima de zero.

Os resultados de consumo das fontes de carbono obtidos são coerentes ao aumento de massa celular. Porém pode estar ocorrendo influência de outros carboidratos presentes no extrato de malte, bem como transformação de maltose em glicose ou mesmo em isomaltose. Estudos mais detalhados serão

necessários para verificar o real comportamento das linhagens quanto ao consumo de fonte de Carbono e energia.



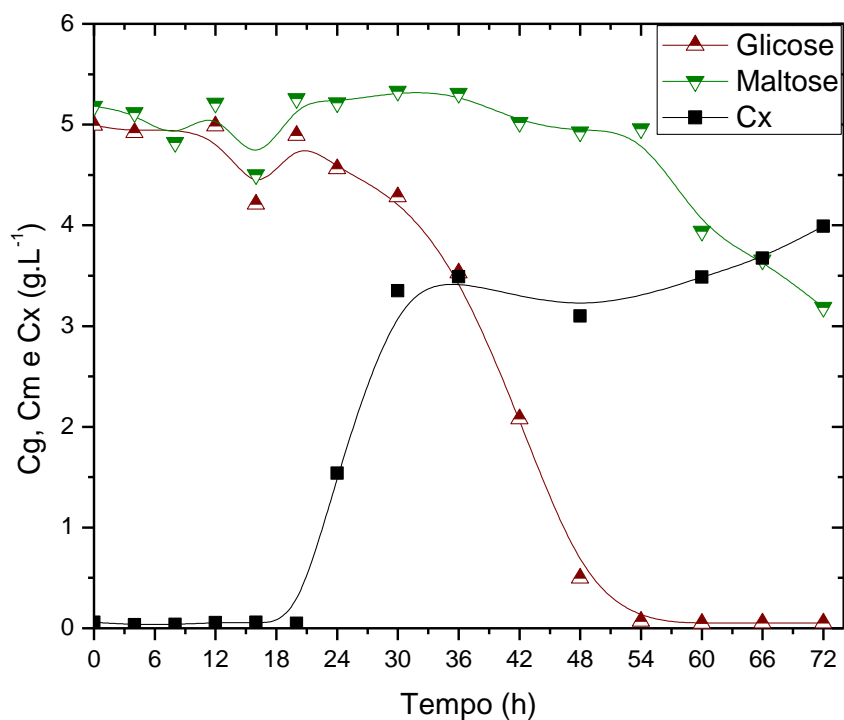
**Figura 27:** Perfil da concentração de substrato (Cg e Cm) e da concentração celular (Cx), no cultivo do *Streptomyces carpaticus* em meio Gym em biorreator.

Com os valores iniciais e finais de crescimento e consumo de substrato obtidos no cultivo em biorreator foi calculado o rendimento celular para os *Streptomyces carpaticus*, neste caso calculado sobre o consumo de maltose:

$$Y_{x/s} = \frac{2,9 - 0,3}{(5 - 0,5) + (5 - 1)} \quad (9)$$

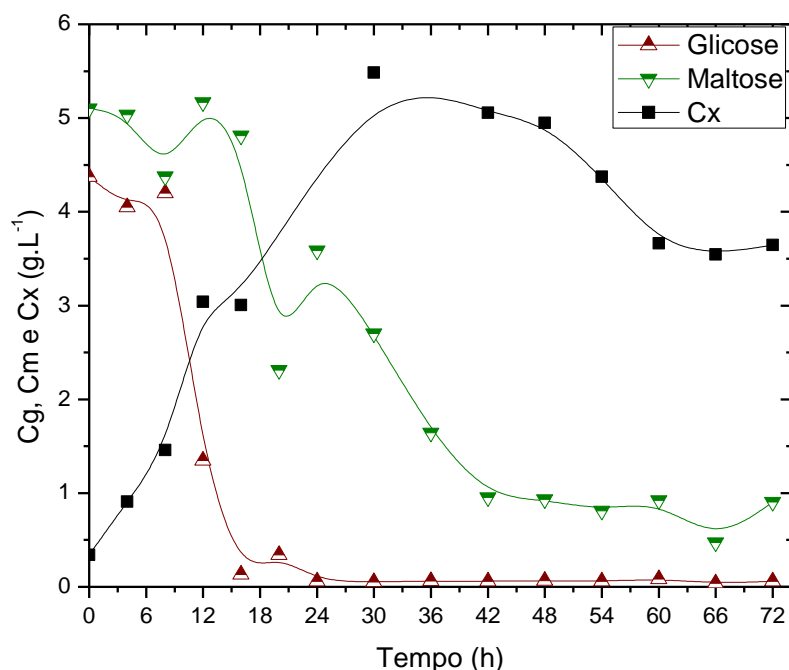
$$Y_{x/s} = 0,305 \frac{g}{g} \quad (10)$$

Quando calculado o rendimento celular sobre a glicose o  $Y_{X/S}$  obtido foi de 0,362g/g, ou seja, menor que o obtido com a maltose.



**Figura 28:** Perfil da concentração de substrato ( $C_g$  e  $C_m$ ) e da concentração celular ( $C_x$ ), variando com o tempo no cultivo do *Streptomyces acrymicini* em meio Gym em biorreator.

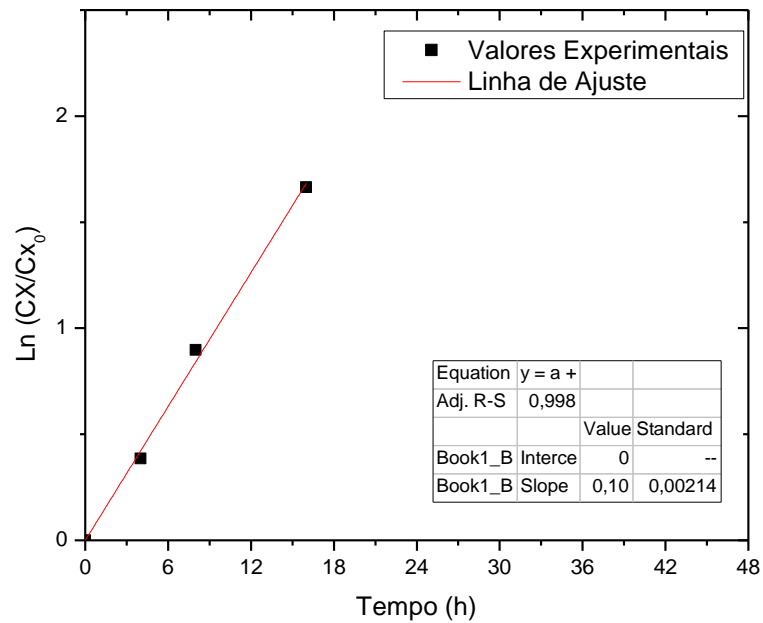
Com os valores de crescimento e consumo de substrato obtidos no cultivo em biorreator não foi possível calcular o rendimento celular para os *Streptomyces acrymicini*, devido a baixa qualidade e a pouca quantidade dos pontos obtidos na fase exponencial de crescimento.



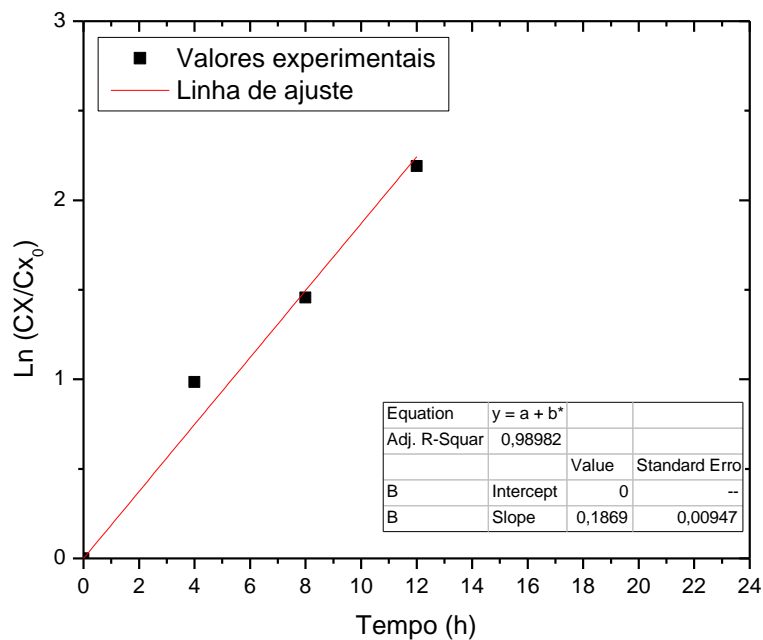
**Figura 29:** Perfil da concentração de substrato ( $C_g$  e  $C_m$ ) e da concentração celular ( $C_x$ ), variando com o tempo no cultivo do *Streptomyces cebimarensis* em meio Gym em biorreator.

Com os valores de crescimento e consumo de substrato obtidos no cultivo em biorreator foi calculado o rendimento celular para os *Streptomyces cebimarensis*, porém por consequência do limitado número de pontos na fase exponencial de crescimento não foi possível obter um bom ajuste da curva aos pontos experimentais, mas o valor de  $Y_{X/S}$  obtido foi de 1,744 g/g sobre a maltose e 0,356 g/g sobre a glicose.

Tentou-se calcular os valores de  $\mu_{max}$  para os três microrganismos. Os resultados obtidos para os *Streptomyces carpaticus* e *cebimarensis* podem ser observados nas Figuras 26 e 27. Porém são ainda resultados preliminares, pois mais pontos experimentais, principalmente na fase exponencial de crescimento, são requeridos para obtenção de valores estatisticamente válidos. Principalmente no caso do *Streptomyces acrymicini* (não representado em figuras) que apresentou um valor de  $R^2$  muito baixo (0,64404 e  $\mu_{max}$  de 0,085).



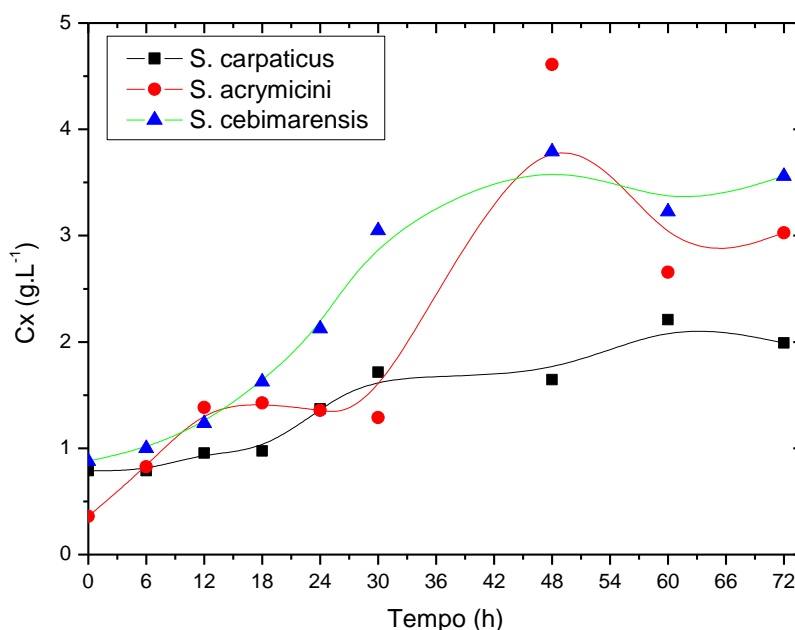
**Figura 30:** Cálculo do  $\mu_{\max}$  no cultivo do *Streptomyces carpaticus* no meio Gym em biorreator.



**Figura 31:** cálculo do  $\mu_{\max}$  no cultivo do *Streptomyces cebimarensis* no meio Gym em biorreator.

Com base nos resultados obtidos, formulou-se um novo meio de cultivo para os *Streptomyces*. O meio descrito na Tabela 3 foi testado em mesa incubadora rotativa os resultados obtidos estão representados na Figura 28.

A composição do meio em termos de fonte de C e N foram estimadas considerando-se um rendimento em massa celular em relação à fonte de C e energia principal consumida de 0,5 e composição celular tal como sugerido para os microrganismos em geral na literatura, supondo que cada microrganismo apresenta a seguinte composição elemental CH 1,81; O 0,52; N 0,21 assumindo esses dados como a fórmula da composição elemental da biomassa (Stephanopoulos et al, 1998).



**Figura 32:** Perfil da concentração celular (Cx) das três linhagens de *Streptomyces* em 72 horas de cultivo em mesa incubadora rotativa com meio proposto.

### Detecção de bioatividade antitumoral

Nos experimentos para detecção de atividade antitumoral realizados com o caldo resultante dos cultivos em biorreatores, obtiveram-se resultados positivos na inibição do crescimento de células (GI%) humanas do Sistema Nervoso Central (SF). Do cólon (HCT-8) e células do Melanoma (MDA). Foi

realizado pela equipe da UFC o teste colorimétrico do MTT. As Células foram incubadas por 72h e o seu percentual de inibição calculado.

Nos extratos obtidos a partir da linhagem *Streptomyces cebimarensis* observou-se a presença de substâncias com potencial inibitório para células SF 295 e HCT-8. A linhagem *Streptomyces acrymicini* apresentou inibição para as células SF 295. Com o caldo resultante do cultivo de *Streptomyces carpaticus* as células MDAMB 435, SF e HCT-8 tiveram seu crescimento inibido. Detalhes da metodologia estão descritos no Anexo.

## 7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 7.1 Conclusões

As linhagens foram caracterizadas em meio sólido, demonstrando desenvolvimento similar ao verificado em meio líquido, apresentando maior desenvolvimento em meio Gym. Os *Streptomyces* demonstraram bom crescimento em meios de cultivo na forma sólida e na forma líquida. Observou-se que apenas o *Streptomyces carpaticus* apresenta produção de pigmento, independente do meio de crescimento e se sólido ou líquido.

Nos experimentos em mesa incubadora rotativa, as três linhagens apresentaram melhor crescimento nos meios Gym e A1RDP. Pode-se concluir então que os *Streptomyces* de trabalho assimilaram bem a glicose junto a maltose (presentes no meio Gym), sugerindo um teste das duas fontes separadas e o amido (meio A1RDP) como fontes de carbono.

Quanto ao consumo das fontes de nitrogênio conclui-se que os três microrganismos assimilaram bem o extrato de levedura (única fonte de nitrogênio presente no meio Gym) e a combinação de extrato de levedura e peptona presente no meio A1RDP.

Ainda pode-se concluir que o glicerol (fonte de C) e a Asparagina (fonte de N) não foram bem aproveitados nas condições presentes no meio ISP5, já que este foi o meio de que propiciou menor crescimento.

Verificou-se então que o meio Gym seria neste caso mais viável para a continuidade do trabalho por apresentar comparativamente bons resultados e

ter componentes mais solúveis que o meio A1RDP que resultou em biomassa próxima da obtida em meio Gym (Figuras 7, 8 e 9).

Nos cultivos com diferentes concentrações osmóticas não foram obtidos resultados significativos em termos de aumento de massa celular. Nos cultivos com concentração de sais que simulam água do mar a 50% (16,5 g/L) foram obtidos resultados ligeiramente superiores, porém dentro de um possível erro experimental. Quanto a comparação da velocidade de crescimento, o tempo para que a fase exponencial seja iniciada é praticamente o mesmo nas 3 condições.

Também foi observado o consumo das fontes de carbono no meio Gym para *Streptomyces carpaticus*, obtendo características de um possível comportamento diauxico da linhagem. Aparentemente o *Streptomyces carpaticus* consumiu primeiramente a maltose e depois a glicose.

Foi escolhida a concentração de sais 16,5 g/L que simulam água do mar a 50% de sua concentração para os ensaios em meio mínimo, proporcionando ao meio, elementos presentes na água do mar aos quais os microrganismos já estão habituados, para assim não possibilitar uma limitação por falta desses componentes, tendo em vista que o meio mínimo já possui características limitantes para o crescimento.

Das quatro fontes de carbono testadas neste conjunto de experimentos, o *Streptomyces carpaticus* adaptou-se melhor à glicose como fonte de carbono, apresentando bom crescimento também com amido, confirmando dessa maneira o que foi observado nos meios descritos pela literatura (Gym e A1RDP). A peptona foi a mais eficaz fonte de nitrogênio entre as quatro testadas. Pode-se concluir que os meios contendo Sulfato de Amonia e Fosfato de Amonia (fontes inorgânicas testadas) não foram bem aproveitadas pelos microrganismos.

Nos cultivos em biorreator observando os resultados obtidos, verificou-se crescimento comparativamente bom das três linhagens nas condições propostas. Sendo que os cultivos foram realizados em meio Gym sem a adição dos sais que simulam a água do mar, adicionando-se para o fim de suplementação do meio a solução de sais (Tabela 2) utilizada também nos ensaios em meio mínimo, com intuito de confirmar o crescimento dos



*Streptomyces* sem a disponibilidade dos sais marinhos presentes na água do mar e nos sais sintéticos que a simulam.

É possível afirmar que os cultivos em biorreatores possibilitaram a obtenção de dados mais precisos sobre o crescimento e, além de produzir maior quantidade de extrato, fez com que os microrganismos produzissem metabólitos secundários com atividade biológica significativa.

Quanto à utilização de carboidratos do extrato de malte (expressa em termos de consumo de maltose e glicose) e glicose, aparentemente não ocorreram simultaneamente também em biorreator.

Essa forma de consumo das fontes de carbono presentes no meio Gym já havia ocorrido no cultivo deste microrganismo em mesa incubadora agitada, onde foi observado nas 3 condições de concentração osmótica.

As três linhagens demonstram comportamento típico de microrganismos diáuxicos. Tendo os *Streptomyces carpaticus* consumido a maltose preferencialmente à glicose. Observa-se que não há uma grande fase de adaptação ao meio cultura. Observa-se com base nos resultados da Figura 13 e que apesar de não ter sido observada uma grande influência no crescimento com as variações das concentrações osmóticas, o consumo dos substratos é afetada pela concentração de sais do meio.

As outras duas linhagens consumiram primeiramente a glicose e em seguida a maltose. Ressalta-se que em ambos os cultivos de *Streptomyces acrymicini* houve uma longa fase *lag* (de adaptação do microrganismo e preparação para o crescimento), iniciando a fase exponencial em mais de 12 horas de cultivo em mesa incubadora agitada e em aproximadamente 20 horas de cultivo em biorreator, este fato aparentemente não está relacionado com a disponibilidade de fontes de carbono, pois até 54 horas de cultivo em biorreator ainda há glicose e só então a maltose passa a ser visivelmente consumida.

A linhagem *Streptomyces cebimarensis* consome rapidamente toda a glicose 20h durante sua fase logarítmica de crescimento, porém mesmo quando passa a consumir a maltose ainda segue com seu crescimento exponencial, demonstrando que o término da glicose não impediu que essa fase de crescimento prosseguisse até 30h de cultivo.

O processo pode estar sendo influenciado por outros carboidratos presentes no extrato de malte e também pode estar ocorrendo reação de hidrólise de maltose a glicose ou mesmo formação de isomaltose.

Análises mais conclusivas quanto à possível diauxia e consumo preferencial de carboidratos devem ser obtidas com experimentos especificamente desenhados para tal fim.

Observou-se que os valores de  $\mu_{\max}$  e  $Y_{X/S}$  obtidos representam aproximadamente a velocidade específica máxima de crescimento e o rendimento celular, porém esses parâmetros devem ser determinados com maior número de dados experimentais coletados durante a fase exponencial.

Nos bioensaios realizados com os caldos resultantes dos cultivos nos quatro meios descritos pela literatura (Gym, A1RDP, ISP4 e ISP5), com meio Gym em diferentes concentrações osmóticas, nos ensaios com meio mínimo e em biorreatores não foi detectada atividade anti- $\beta$ -lactamásica ou antimicrobiana em nenhuma das amostras provenientes dos ensaios realizados em mesa incubadora agitada, porém não foram testados microrganismos Gram-positivos e o tempo máximo de cultivo do qual foi extraído o caldo analisado foi de 72 horas. Deve-se mencionar também que os caldos testados não foram tratados ou concentrados de nenhuma forma.

Nos cultivos realizados no meio de cultivo proposto pode-se concluir que os microrganismos mantiveram padrões de crescimento semelhantes aos observados em meio Gym, porém os *Streptomyces carpaticus* cresceram relativamente pouco enquanto os *Streptomyces acrymicini* aparentemente cresceram menos que em meio Gym, porém com uma fase lag mais curta. Enquanto os *Streptomyces cebimarensis* apesar de apresentarem crescimento superior ao *Streptomyces carpaticus*, mas ainda foi inferior ao apresentado em meio Gym.

## 7.2 Sugestões

Testes com as linhagens liofilizadas são necessários para verificar os resultados de biomassa que essa metodologia de preservação possibilita.

Deixou-se aqui como sugestão para trabalhos posteriores novas tentativas de otimização de meio quanto às fontes de C, N e sais e também novos cultivos em biorreator com agitação mais elevada, controlando pH e o oxigênio dissolvido e variando a temperatura.

O desenvolvimento de uma metodologia para quantificação das substâncias de interesse detectadas. Ressalta-se também a importância de mais estudos que visem a detecção de novas substâncias bioativas, sintetizadas pelas bactérias de estudo.

Realização de mais experimentos específicos para determinação dos parâmetros cinéticos observando também a variação atividade antitumoral e antimicrobiana além de futuros trabalhos para isolamento e identificação das moléculas responsáveis pelas atividades apresentadas.

O desenvolvimento da metodologia de cultivos em batelada alimentada em biorreator.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo, M.L.G.C. Estudo cinético do processo de produção da cefalosporina C com células livres e imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. Tese (Doutorado em Engenharia Bioquímica)- Universidade Federal de São Carlos.) São Carlos, 189p, 1996.

Asturias, J.A.; Martin, J.F.; Liras, P. Biosynthesis and phosphate control of candicidin by *Streptomyces acrimicryni* J12236- Effect of amplification of the PABAB gene. *Journal Industrial Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 183-189, 1994.

Baptista Neto, A. de; Gouveia, E R.; Badino Júnior, A. C. Hokka, C. O. Influência na Concentração de Glicerol na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* in: XIII Simpósio Nacional de Fermentação, 2000, Teresópolis. Anais do XIII SINAIFERM, 2000.

Baptista-Neto, Á. ; Oliveira, L. M. ; Bellão, C.; Oliveira, J. H. H. L. ; Pasotto, M. B. ; Badino Júnior, A. C. ; Hokka, C. O. Determinação da Cefamicina C por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. (Apresentação de Trabalho/Congresso). Evento: XII Congresso Latino Americano de Cromatografia. Florianópolis-SC. 2008.

Baptista-neto, Á. ; Teodoro, Juliana Conceição ; Badino Júnior, Alberto Colli ; Hokka, Carlos Osamu . Comparisons between continuous and batch processing to produce clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, in press. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Brazil, v. 48, p. 97-104, 2005.

Berlinck, R. G. S.; Hajdu E, Rocha R. M.; Oliveira J. H. H. L.;Hernandez, I. L. C. ; Selegim M. H. R.; Granato, A. C.; Almeida R. V. R.; Nuez C. V.; Muricy G.; Peixinho, S.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; Nascimento, G. G. F.; Thiemann O.; Silva, M.; Souza, A. O.; Silva, C. L.; e Minarini P. R. R. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil *J. Nat. Prod.*, 67 (3), 510-522 • DOI: 10.1021/np0304316, 2004.

Berlinck, R.G.S.. N-Acetyl- $\gamma$ -hydroxyvaline Lactone, an Unusual Amino Acid Derivative from a Marine Streptomycete, *Journal of Natural Products*, 63, 664 -665, 2000.

Bowling, J. J.; Kochanowska, A. J ; Kasanah, N.; Hamann, M. T. Nature's bounty – drug discovery from the sea. *Expert Opinion on Drug Discovery*. Vol. 2, No. 11 : Pages 1505-1522, 2007.

Bradbury, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute, Surry, England. P. 322, 1986.

Bremner, J.M. Total Nitrogen. *Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties*. Inc., Publisher USA, n.9, p. 1149-1178, 1965.

Cadenas, R.F.; Martin, J.F.; Gill, J.A. Construction and characterization of promoter-probe vectors for *Corynebacteria* using the kanamycin-resistance report gene. *Gene*, v. 98, n.1, p. 117-121, 1991.

Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, v.60, p.112, 1997.

Cruz ; A. J. ; Pan, T.; Araujo, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. Cephalosporin C Production by Immobilized Cephalosporium acremonium Cells in a Repeated Batch Tower Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, n. 85, v. 1, p.96-102, 2003.

Dutra, S.V.; Daudt, C.E.; Souza M. Aminoácidos livres e uréia durante a fermentação de mosto de chardonnay com diferentes leveduras. *Ciênc. Tecnol. Aliment.Campinas/SP*. v.19, n.2, p. 179-182, 1999.

English, A. R.; *et al.* CP-45,899, a  $\beta$ -lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of  $\beta$ -lactams: initial bacteriological characterization.

*Biochem. J.* v. 259, p. 255–260, 1978.

Faulkner, D. J. Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Nat. Prod. Rep.* v. 17, p. 1-6, 2000.

Fenical, W. The oceans and human health: marine pharmaceuticals past, present, and future. *Oceanography*, v. 19, n. 2, p. 110-119, 2006.

Fenical, W.; Jensen, P.R. Marine microorganisms: a new biomedical resources, marine biotechnology, v. 1: pharmaceutical and bioactive natural products (D.H. Attaway and O.R.Zaborsky, eds.), plenum press., New York, p.419-458, 1993.

Figueiredo, M.B.. Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*. v. 63, n. 1/2, p. 73-82, 2001.

Fischer, I.H.; Kimati, H. and Martins, M. C.. Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* spp. da batata. *Fitopatol. bras.* [online]. vol.28, n.6, pp. 650-655. 2003.

George Siberry, K.N. Brahmadathan, Rajeswar Pandian, M.K. Lalitha, Mark C. Steinhoff, & T. Jacob John Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull World Health Organ* vol.79 no.1 Genebra. 2001

Gil, J.A.; Kieser, H.M.; Hopwood, D.A. Cloning of chloramphenicol acetyltransferase gene of *Streptomyces acrimycini* and its expression in *Streptomyces* and *Escherichia coli*. *Gene*, v. 38, p. 1-8, 1985.

Gouveia, E. R.; Baptista Neto, A. de; Badino Júnior, A. C.; Hokka, C. O. Influência de Diferentes Combinações de Fontes Complexas de Nitrogênio na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* in: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2002, Águas de São Pedro, anais do XIII COBEQ, 2000.

Gouveia, E. R.; Baptista Neto, A. de; Badino Júnior, A. C.; Hokka, C. O. Comparação da Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* Utilizando Meios de Cultura Sintéticos e Complexos in: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2002, Águas de São Pedro, anais do XIII COBEQ, 2000.

Gouveia, E. R.; Baptista Neto, Azevedo, A.G.; Badino Júnior, A. C.; Hokka, C., Improvement of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivative, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.15, n<sup>o</sup>5, p.623-627, 1999.

Guimarães, L.M. Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20. Tese (Doutorado Engenharia Química) USP, 2005.

Hendrik Luesch, Richard E. Moore, Valerie J. Paul, Susan L. Mooberry, and Thomas H. Corbett. Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total Stereochemistry and Biological Evaluation of Its Analogue Symplostatin, Detroit, Michigan 48201 907 *J. Nat. Prod.* 64, 907-910, 2001.

Hernandez, I.L.C. Metabólitos secundários obtidos de bactérias (*streptomyces*) isoladas de sedimento marinho. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química de São Carlos, USP, 147 f, 2002.

Hernandez, I.L.C.; et al. Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 15, n. 3, 2004.

Hernandez, I.L.C; Godinho, M.J.L.; Magalhães, A.; Schefer, A.B., Ferreira, A.G., and Berlinck, R.G.S.. N-Acetyl- $\gamma$ -hydroxyvaline Lactone, an Unusual Amino Acid Derivative from a Marine Streptomycece, *Journal of Natural Products*, 63, 664-665, 2000.

Ivest P. R. and Bushell, M. E.: Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. Printed in Great Britain *Microbiology*, 143,3573-3579, 1997.

J.C. Menezes, T.P. Alves, J.P. Cardoso, "Biotecnologia Microbiana: A Produção de Penicilina", in "Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações", N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL, cap. 12, 15 pp. 2000.

Keeney, D.R.; Bremner, J.M. Use of the Coleman model 29A analyser for total nitrogen analysis of soils. *Soil Science*. 1967. n.104, v. 5, p. 358-363, 1967.

Korn-Wendisch, F.; Kutzner, H. J.. The Family Streptomycetaceae. In: Starr, M. P.; Stolp, H.; Truper, H. G.; Balows, A.; Schlegel, H. G., eds. *The Prokaryotes*. Berlin, Springer-Verlag, v. 1, p. 921-995, 1992.

Kuboyama, R. H. Detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em pacientes assistidos em hospitais

terciários na cidade de Campinas : epidemiologia molecular e fatores de risco. 2009, Tese (doutorado), Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, UNICAMP. Campinas, SP. 2009.

Küster, E. Outline of a comparative study of criteria used in characterisation of the actinomycetes. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* v. 9, p. 97–104, 1959.

Lavarda, S.C.S.; Araujo, M.L.G.C. Avaliação das condições para imobilização de células de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 para a produção de ácido clavulânico em biorreator tipo torre. p.33,34, 2003. v. local de public.

Lee, H.S. et al. Biomedicos.cycle peptides of nocardamine class from a marine-derived bacterium of genus *streptomyces*. *J. Nat. Prod.*, v.68 (4), pg. 623 -625, 2005.

Liras P.; Martín J.F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: Barredo J. L., *Methods in Biotechnology*, vol. 18 (Microbial processes and products), cap. 7, p. 149, Humana Press Inc., Totowa, 2005.

Locci, R. *Streptomyces* and Related Genera, Genus *Streptoverticillium baldacci* 1958 *Systematic Bacteriology*, v. 4, p. 168, 1966.

Lotufo, L. V. C.; Wilke, D. V.; Jimenez, P. C.; Epifanio, R. de A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. *Quím. Nova* vol.32 no.3 São Paulo 2009.

Macedo, J. A.; Sette, L. D.; Sato, H, H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. vol.10 No.4, Issue of October 15, 2007.

Miller, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chem.* New York, v. 31, p. 426- 428, 1959.

Moncheva, P.; S. Tishkov, N. Dimitrova, V. Chipeva, S. A. Nikolova & N. Bogatzevska: Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *J. Cul. Coll.* 3: 3–14, 2002.

Mugnai, L., Bridge, P.D. and Evans, H.C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycol. Res.* 92, 199–209, 1989.

Murray, I.A.; *et al.* Nucleotide séquense of the chloramphenicol acetyltransferase gene of *Streptomyces acrimicyni*. *Gene*, v. 85, n. 2. p. 283-291, 1989.

Newman, D.J; Cragg, G.M. Natural Marine Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials: Natural Products Branch, NCI-Frederick, *J. Nat Prod* v. 67 p.1216–1238, 2004.

Oliveira, E. et al. Gestão da biodiversidade e produção agrícola: O cerrado Goiano. Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília. v. 21, n. 1, pg. 105-142, 2004.

Omura, S; Iwai, Y; Hirano, A; Nakagawa, A; Awaya, J; Tsuchiya, H; Takahashi, Y and Masuma, R: A New Alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* Origin Taxonomy, Fermentation, Isolation and Preliminary. Japan The Journal OF Antibiotics APR., pg 275 a 282, 1977.

Pamboukian, C. R. D. and Facciotti, M. C. R.. Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations. *Braz. J. Chem. Eng.* [online]. 2005, vol.22, n.1, pp. 31-40. ISSN . Penna, T. C. V; do Amaral M. da P. H. and Aquarone, E. Lyophilized *Streptomyces aureofaciens* spores. World Journal of Microbiology & Biotechnology, Vol 14, 1998.

Pereira, A. L.; Pita, J. R.; Revista da Faculdade de Letras Alexander Fleming (1881-1995). História. Porto, III Série, vol. 6, pp. 129-151, 2005.

Pettit GR, Kamano Y, Herald CL, Tuinman AA, Boettner FE, Kizu H, Schmidt JM, Baczynskyj L, Tomer KB and Bontems RJ, J Am Chem Soc 109: 6883-6885, 1987.

Pileggi, S.A.V. Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores rapd e seu potencial farmacológico. Tese (Doutorado em Genética) UFPR p. 141 f, 2006.

Porter, J. R., Antony van Leeuwenhoekl: Tercentenary of His Discovery of Bactéria Bacteriological Reviews. v. 40, n. 2., p. 260-269, 1976.

Prado, H.F.A.; Hilário E.; Silva, E.G.; Seleção de Microrganismos Produtores de Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) e produção e caracterização da enzima. Braz. J. Food Technol., n.98, 2000.

Preobrazhenskaya, T.P.; Blinov, N.O. and Ryabova (I.D.). In: G.F. Gauze, T.P. Preobrazhenskaya, E.S. Kudrina, N.O. Blinov, I.D. Ryabova and M.A. Sveshnikova (eds): Problems of classification of actinomycetes-antagonists. Government Publishing House of Medical Literature, Medgiz, Moscow, USSR, pp. 1-398, 1957.

Pridham, T. G.; Tresner, H. G. Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In: Buchanan, R. E.; Gibbons, N. F., eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed. Baltimore, Williams and Wilkins, p. 748-829, 1974.

Qiu Zhi-Qi, Cao Li-Xiang, Tan Hong-Ming and Zhou Shi-Ning. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* sp. S5 with herbicidal activity from tomato roots. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 3(1); 7–12pg, 2006.



Rachev, R. et al. A new antibiotic, TH818, and its properties: *Biotechnol. Appl. Biochem. Great Britain*. v.37, p. 21–26, 2003.

Rigueira, R. Isolating bioactive compounds from marine organisms. *J. Mar. Biotechnol.* v.5, p.187–193, 1996.

Romero, J.; Liras, P.; Martin, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* n. 20, p. 318-325, 1984.

Rosa, J. C.; Influencia das Condições de Transferência de O<sub>2</sub> na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 97p, 2002.

Siberry, G.; Brahmadathan, K.N.; Rajeswar Pandian, M.K.; Lalitha, M. C.; Steinhoff, T. J. J. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull World Health Organ* vol.79 no.1 Genebra. 2001.

Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Systematic Bacteriol*;16(3):313-40, 1966.

Shirling, E.B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 16 n. 3 p. 313 – 340, 1966.

Stackebrandt (E.), Rainey (F.A.) and Ward-Rainey (N.L.): Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.47, p. 479-491, 1997.

Stephanopoulos, G.N.; Aristidou, A. A.; Nielsen, J. Material Balances and data consistency. In: *Metabolic Engineering Principles and Methods*. Califórnia: Academic Press. p. 115-146, 1998.

Sujatha; P., Bapi, R.K.V.V.S.N.; T. Ramana. Studies on a new marine streptomycete BT-408: producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Summary Microbiological Research* n. 160 p. 119-126, 2004.

Valentinil, W.A.S.; Matioli, G. Validação de Métodos Analíticos na Quantificação de Comprimidos de Captopril. *Rosa. Health Sciences*, v. 26, n. 2, p. 357-364, 2004.

Vining, L. C. Secondary metabolism. In: REHM, H. J. ; REED, G., ed. *Biotechnology*. Wheinheim, VCH, v. 4, p. 21-29, 1986.



Wildermu, H. Morfological surface characteristics of *Streptomyces glaucescens* and *Streptomyces acrimicyni*, 2 streptomycetes with hair spores. *Archiv Fur Mikrobiologie*. v. 81, p. 321, 1972.

Wright,H.M.; Hoopwwod,D.A. Cromosomal gene for chloramphenicol acetyltransferase in *Streptomyces acrimicyni*. Journal of General Microbiology, v. 102, p. 417-421, 1997.

Wu, C.J.; Janssen, G. R. Expression of a atreptomycetes leaderless mRNA ecoding chloramphenicol acetyltransferase in *Eschirichia coli*. Journal of Bacteriology, v.179, p. 6824-6830, 1997.

Yasuhara, T; Nokihara, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. Journal of agricult. and food chemistry, n.49, p.4581-4583, 2001.

## ANEXO

	<b>LAUDO TÉCNICO DO ESTUDO DAS AMOSTRAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ</b>	 <small>Laboratório de Oncologia</small>
<b>AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE AMOSTRAS SOB RESPONSABILIDADE DE DOUGLAS FERREIRA - UFSCAR</b>		
<b>LAUDO Nº: MÊS 12/2008</b>	<b>Versão: 2008</b>	<b>Nº. de Páginas:</b>
<b>Convênio : QUÍMICA-UFSCAR/LOE-UFC</b>		
<p>Instituição: Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará</p> <p><b>Rua Coronel Nunes de Melo, 1127</b></p> <p><b>60.431-970 Fortaleza – Ceará – Brasil</b></p> <p>Email: <a href="mailto:rc_montenegro@yahoo.com.br">rc_montenegro@yahoo.com.br</a></p> <p><a href="mailto:feliperbio@yahoo.com.br">feliperbio@yahoo.com.br</a></p> <p style="text-align: center;"><b>Fone (85) 3366- 8255</b> <span style="float: right;"><b>Fax (85) 3366 8333</b></span></p>		
<b>Pesquisadores Responsáveis:</b> <b>Raquel Carvalho Montenegro MSc, PhD*</b> <b>Manoel Odorico de Moraes, MD, MSc, PhD</b> <b>Cláudia do Ó Pessoa, MSc, PhD</b> <b>Letícia Veras Lotufo, MSc, PhD</b> <b>Felipe Augusto Rocha Rodrigues (IC)</b>		
		<b>17/12/2008</b>

## CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

### OBJETIVO

Verificar a citotoxicidade *in vitro* de substâncias puras, extratos, frações e subfrações em 3 linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

### MATERIAL

**Células:** As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano), e SF-295 (Glioblastoma), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

**Amostras:** As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Amostras foram testadas em concentrações de 25µg/mL.

### MÉTODO

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10<sup>6</sup> cél/mL para a linhagem MDA/MB-435 e SF-295, 0,3 x 10<sup>6</sup> para HL-60 e para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugado e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram

incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

### ***Análise Estatística***

Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

## **REFERÊNCIAS**

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.