



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

JUANIZE MATIAS DA SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE
VETERINÁRIO POR *Streptomyces* spp.**

**Recife - PE
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JUANIZE MATIAS DA SILVA

PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE
VETERINÁRIO POR *Streptomyces* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito necessário para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr.^a Camila Souza Porto - Programa Nacional de Pós-Doutorado/UFRPE

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Figueiredo Porto - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Recife - PE
2013

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de
mestrado de

JUANIZE MATIAS DA SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS DE INTERESSE
VETERINÁRIO POR *Streptomyces* spp.**

Área de concentração: Biotecnologia

Recife, 29 de julho de 2013

Comissão examinadora, composta pelos seguintes professores:

Prof.^a Dr^a Camila Souza Porto
PNPD/Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE
(Presidente)

Prof^a. Dr^a. Raquel Pedrosa Bezerra
DCR/Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE
(1^o membro externo)

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
PNPD/Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE
(2^o membro interno)

Prof^a. Dr^a Tatiana Souza Porto
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE
(3^o membro interno)

Dedico
À Deus e aos meus Pais, Aldenize
Matias do Nascimento e Juarez
Severino da Silva

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por me iluminar, dar sabedoria e confortar em todos os momentos, principalmente nas situações difíceis.

A Prof^a. Ana Porto, pela confiança, pelos conselhos valiosos e oportunidade a que me foi concedida.

A minha grande orientadora Prof^a. Camila Porto pela paciência, orientação, dedicação e sensibilidade. Minha eterna gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e à Fundação de Amparo da Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro e as bolsas de estudos para a realização desta pesquisa.

A Prof^a. Tatiana Porto pela parceria e sugestões valiosíssimas. Obrigada por tudo!

As minhas fofas e fofo do coração, Amadinha, Ellenzinha, Kessinha, Marcinha e Pajeú, sem vocês eu e está dissertação seríamos nada.

A família LABTECBIO: Prof^a. Cynthia Nascimento, Prof.^a Daniela Viana, Prof^a. Polyanna Herculano, Prof^a. Raquel Pedrosa, Prof^a. Maria Taciana, Ana Paula, Dayana Sefarim, Meire Falcão, Michelly Éllen, Mitaliene de Deus, Vanessa Régia, Patrícia Cunha, Patyenne Correia, Paulo Gusmão, Fabiana América, Júlio Nascimento, Catarina Michelle, Iêda Cabral obrigada gente, pela atenção, amizade e apoio nos momentos tensos desta pesquisa, como também os felizes.

A Prof.^a Janete Magali de Araújo por ter dado a oportunidade de iniciar na pesquisa científica, muito obrigada por me apresentar à microbiologia, em especial as actinobactérias.

Aos meus pais Aldenize Matias do Nascimento e Juarez Severino da Silva que me incentivaram, apoiaram e compreenderam para eu realizasse este trabalho. Aos meus padrinhos Josefa Andrade e Manoel Simão pelo amor, carinho e atenção. Aos meus irmãos Juarez Junior e Maria Emmanuella, podem ter certeza que vocês contribuíram muito para este trabalho.

A toda a minha família, principalmente minha avó. Desculpem por muitos momentos de ausência.

Aos meus amigos da graduação que estão até hoje próximos, Anderson, Marcelo e Pablo, amigos obrigada pelo incentivo!

A uma grande amiga Janaína Melo, pelos conselhos preciosos, sinceridade e amizade acima de tudo.

As minhas amigas-irmãs (Cleo, Carol e Gabi) que não entendem muito que eu faço, mas sempre estão na escuta, me desculpem por muitos períodos de ausência.

As irmãs de Fé (Alcione e Raquel) pelas orações incansáveis para mim e para o término desta pesquisa.

Ao meu namorado (Luís Gustavo Machado Dias de Brito) pela paciência, carinho, amizade, amor e compreensão em todos os momentos. Como também sua família por todo apoio e conforto que me foi dado.

Meu muito obrigada por todos que me ajudaram de alguma forma nesta pesquisa.

Levantarei os meus olhos para os montes, de onde vem o meu socorro.
O meu socorro vem do SENHOR que fez o céu e a terra.
Não deixará vacilar o teu pé; aquele que te guarda não tosquenejará.
Eis que não tosquenejará nem dormirá o guarda de Israel.
O SENHOR é quem te guarda; o SENHOR é a tua sombra à tua direita.
O sol não te molestará de dia nem a lua de noite.
O SENHOR te guardará de todo o mal; guardará a tua alma.
O SENHOR guardará a tua entrada e a tua saída, desde agora e para sempre.

Salmos 121:1-8

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELA	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
OBJETIVO	V
Objetivo Geral	V
Objetivos Específicos	V
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I	3
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. O GÊNERO <i>Streptomyces</i>	3
1.1 Antibióticos e a resistência bacteriana	5
1.1.2 Ácido clavulânico.....	8
1.1.3 Mastite.....	10
1.2 Proteases fibrinolíticas	11
1.2.2 Purificação de proteases e sistema de duas fases aquosas	13
1.2.2.1 Fatores que influenciam no sistema de duas fases aquosas	14
1.2.3 Fibrinólise	15
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO II	24
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 FRENTE À <i>Staphylococcus</i> spp. MULTIRRESISTENTES DE MASTITE BUBALINA	24
ABSTRACT	25
RESUMO	26
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
Micro-organismos.....	27
Screening de <i>Streptomyces</i> spp. produtoras de antimicrobiano	27
Meio de produção de biocompostos com atividade antimicrobiana	28
Produção de biocompostos substâncias antimicrobianas e ácido clavulânico utilizando planejamento fatorial 2 ⁴	28
Determinação da concentração celular	28
Atividade antimicrobiana	28
Determinação do ácido clavulânico	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO	30
AGRADECIMENTOS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO III	36

PRODUÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICA POR <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 E EXTRAÇÃO EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS.....	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
Reagentes.....	40
Micro-organismo.....	40
Meios de Cultura	40
Planejamento fatorial para produção de protease fibrinolítica.....	41
Determinação da concentração celular	42
Determinação da atividade fibrinolítica.....	42
Determinação da atividade proteolítica utilizando substrato específico	42
Preparação do sistema de duas fases aquosas	42
Determinação da proteína total	43
Planejamento fatorial para sistema de suas fases aquosas PEG/MgSO ₄	43
Determinação do coeficiente de partição e recuperação.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	46
AGRADECIMENTOS.....	47
REFERÊNCIAS.....	47
CONCLUSÕES GERAIS	57
ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – Revisão de literatura

- Figura 1. Ciclo de vida do gênero *Streptomyces*. (Fonte: Flärdh; Buttner, 2009).....4
- Figura 2. Imagem representativa dos mecanismos de resistência bacteriana (Fonte: Tortora, 2012).8
- Figura 3. Imagem representativa das estruturas de (1) ácido clavulânico, (2) penicilinas e (3) cefalosporinas. (Fonte: Saudagar et al., 2008).9
- Figura 4. Representação esquemática do sistema fibrinolítico. Pdf: produtos de degradação da fibrina.17

Capítulo 2 – Atividade antimicrobiana de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina

- Figura 1. A curva de crescimento e produção de ácido clavulânico do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 cultivado no meio MS-2 nas condições do ensaio 14 em agitador orbital por 120 horas. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- Figura 2. Gráfico de Pareto demonstrando a influência das variáveis independentes e suas interações sob a variável resposta crescimento celular no tempo de 72 horas de fermentação do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

Capítulo 3 - Produção e extração de proteases fibrinolíticas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

- Figura 1. Demonstração do efeito simultâneo das variáveis independentes, farinha de soja e glicose na atividade fibrinolítica em 48 horas de fermentação produzida pela bactéria *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.52
- Figura 2. Gráfico de pareto demonstrando os efeitos das variáveis independentes na produção de protease fibrinolítica pelo micro-organismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.53
- Figura 3. Gráfico cubo representando o efeito da interação das três variáveis independentes (concentração de glicose, temperatura e agitação) na produção de protease fibrinolítica pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1753.54
- Figura 4. Gráfico demonstrando a curva de crescimento e produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.51

Figura 5. Gráfico de pareto demonstrando os efeitos das variáveis independentes sobre o coeficiente de partição (K) na extração utilizando sistema duas fases PEG/MgSO₄ de protease fibrinolítica.....55

LISTA DE TABELA

Capítulo 1 – Revisão de literatura

Tabela 1. Biocompostos produzidos por linhagens de <i>Streptomyces</i> sp.....	5
Tabela 2. Mecanismo de ação de alguns antibióticos e suas classes.....	6
Tabela 3. Fontes de enzimas fibrinolíticas de origem microbiana.....	12

Capítulo 2 – Atividade antimicrobiana de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina

Tabela 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2 ⁴ de biocompostos com atividade antimicrobiana	34
Tabela 2. Resultados da atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 em 72 horas de fermentação utilizando planejamento fatorial 2 ⁴	34
Tabela 3. Produção do ácido clavulânico por <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 nas condições 37°C em 250 rpm e as concentrações de farinha de soja (1,5% / 0,5%) e de glicose (0 g/L / 1 g/L) até 120 horas de fermentação.	34

Capítulo 3 - Produção e extração de proteases fibrinolíticas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

Tabela 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2 ⁴ na produção de protease fibrinolítica.....	41
Tabela 2. Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial 2 ⁴ PEG/Sulfato de magnésio.....	44
Tabela 3. Resultado da atividade fibrinolítica na matriz do planejamento fatorial 2 ⁴ no tempo de 48 horas de fermentação produzidas pelo <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573.....	50
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2 ⁴ com os resultados da extração de protease fibrinolítica utilizando o sistema de duas fases PEG/ MgSO ₄	556

RESUMO

Actinobactéria é um filo de bactérias capazes de produzir diferentes tipos substâncias bioativas que podem ser aplicadas em diversos setores industriais, dentro deste filo destaca-se o gênero *Streptomyces*. O presente trabalho teve como objetivo produzir biomoléculas com atividades antimicrobiana e fibrinolítica, ácido clavulânico por linhagem de *Streptomyces* spp., assim como extrair protease fibrinolítica por sistema de duas fases aquosas (SDFA). Após selecionar a linhagem produtora de substâncias antimicrobianas por bloco de gelose, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 com quatro variáveis independentes (concentração de farinha de soja e glicose, agitação e temperatura) tendo como variáveis respostas: crescimento microbiano, atividade antimicrobiana e fibrinolítica. Para a extração da protease fibrinolítica também foi utilizado um planejamento fatorial 2^4 variando a concentração e massa molar do PEG, concentração do sal $MgSO_4$ e pH. Em relação ao crescimento celular a análise estatística destacou a interação das variáveis temperatura e agitação e o seu efeito positivo. O micro-organismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 com 72 horas de produção obteve-se 100% de inibição do crescimento das bactérias patógenas. Entretanto, com 96 horas de fermentação foi obtido a maior concentração do ácido clavulânico de 269,84 mg/L no ensaio com maior nível de concentração de farinha de soja e menor nível de glicose em 37°C, com agitação de 250rpm. Para a produção de protease fibrinolítica pela bactéria *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, os resultados mostram que em maiores níveis de concentração de farinha de soja e de glicose, e em menores níveis de agitação e temperatura favoreceram a produção da protease fibrinolítica no tempo de 48 horas de fermentação (835 U/mL). A extração da protease fibrinolítica em SDFA obteve 747% de recuperação em atividade, e a partição foi favorecida para a fase inferior, tendo um coeficiente de partição 0,096. Diante do exposto pode-se concluir que *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi capaz de produzir diferentes biomoléculas com aplicação veterinária como antibiótico, ácido clavulânico e protease fibrinolítica, com valores significativos.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido clavulânico; Atividade antimicrobiana e fibrinolítica; Sistema de duas fases aquosas; *Streptomyces* spp.

ABSTRACT

Actinobacteria is a phylum of bacteria have to capacity of producing different types of bioactive substances that can be applied in diverse industrial sectors within this phylum highlights the *Streptomyces* genus. This work aimed to select the strain *Streptomyces* spp. production of biomolecules with antimicrobial and antithrombotic, and extract by ATPS fibrinolytic protease. After selecting the producer strain biocompounds antimicrobials by agar block, there was a factorial design 2^4 with four independent variables (concentration of soybean flour and glucose, agitation and temperature) as variables responses: microbial growth, antimicrobial activity and fibrinolytic activity. In the extraction of fibrinolytic protease was also realized a factorial design 2^4 varying the concentration and molar mass of PEG, pH and concentration of $MgSO_4$. The statistical analysis was shown that the interaction of the variables temperature and stirring was significant positive effect for cell growth. The microorganism *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 with 72 hours of production gave 100% inhibition of growth of pathogenic bacteria. However, after 96 hours of fermentation was obtained the highest concentration of clavulanic acid 269.84 mg/L in the assay with the highest level of concentration of soybean flour and lower glucose level by 37°C with 250 rpm agitation. For production of the fibrinolytic protease a result show that higher levels of concentration of soybean flour and glucose, with lower levels of temperature and agitation favor the production and in 48 hours was obtained largest value of the fibrinolytic protease (835 U / mL). The extraction of fibrinolytic protease in ATPS obtained 747% recovery in activity, and the partition was favored for the bottom phase, having a partition coefficient of 0.096. Thus, strain *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was able to produce different biomolecules for veterinarian use as antibiotic, clavulanic acid and fibrinolytic protease with significant values.

KEYWORDS: Clavulanic acid, antimicrobial activity and fibrinolytic; biphasic system; *Streptomyces* spp.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Investigar a produção de biomoléculas com atividade antimicrobiana, ácido clavulânico e protease fibrinolítica por *Streptomyces* spp., bem como avaliar a extração da protease fibrinolítica utilizando sistema de duas fases PEG/sulfato de magnésio.

Objetivos Específicos

- Selecionar a espécie de *Streptomyces* spp. produtora de biocompostos com atividade antimicrobiana frente a isolados multirresistentes de mastite bubalina;
- Verificar a atividade fibrinolítica de biomoléculas produzidas por *Streptomyces* spp. selecionada;
- Determinar as melhores condições para produção de substâncias antimicrobianas, ácido clavulânico e enzima fibrinolítica por meio do planejamento fatorial 2⁴;
- Definir a melhor condição para purificação parcial de enzima fibrinolítica utilizando sistema de duas fases aquosas PEG/sulfato de magnésio por planejamento fatorial, analisando a influência das variáveis (pH; concentração do sal; massa molar e concentração do PEG);

INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária uma das grandes questões é o desenvolvimento de drogas mais eficazes no tratamento de patologias. Neste contexto citamos a mastite bubalina, uma inflamação na glândula mamária normalmente causada pela presença de micro-organismos. A mastite traz sérios problemas para a indústria leiteira, devido à diminuição na produção e qualidade do leite, gastos com tratamento e até mesmo descarte do animal (MEDEIROS; BENONE; et al., 2011; KHAYATNOURI; TOPCHI, 2013).

A disseminação e o uso inadequado dos antibióticos acarretou a diminuição da susceptibilidade dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos através do desenvolvimento de mecanismos de defesa às drogas, desencadeando o surgimento de bactérias resistentes (CUNHA et al., 2005). Dentre os mecanismos de resistência das bactérias, destaca-se a capacidade de produzir uma enzima, denominada de β -lactamase que tem a habilidade de inativar o anel β -lactâmico dos antibióticos da classe dos β -lactâmicos tornando-os inaptos para o tratamento de doenças infecciosas (VIANA MARQUES et al., 2011). Como resposta a este mecanismo de resistência surge o ácido clavulânico (AC), que se liga de forma irreversível ao grupo hidroxila de uma serina presente no sítio ativo da enzima β -lactamase inativando-a (BRANDÃO et al., 2013).

Uma outra patologia é a tromboflebite, caracterizada pela formação de trombos devido a sucessivas punções, associadas à falta de antisepsia ou imperícia no procedimento, e nos equinos quando estes trombos se deslocam podem ocasionar abscessos pulmonares e danos cerebrais (HUSSNI et al., 2012). A incidência em equinos é elevada, no entanto é uma doença que apresenta poucas opções no tratamento e em alguns casos necessitam de procedimento cirúrgico (NEGRÃO et al., 2007).

Os micro-organismos na biotecnologia são fontes de produtos naturais utilizados na elaboração de medicamentos manipulados no tratamento de patologias veterinárias. As razões pelas quais se utiliza os micro-organismos na biotecnologia são: baixo custo na produção, facilidade no aumento de escala, curto tempo de

crescimento e não depende da sazonalidade para seu desenvolvimento (MALAJOVICH, 2011; MOSTAFA et al., 2012).

Entre os micro-organismos estudados na biotecnologia destacam-se as actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Esse gênero caracteriza-se pela capacidade de produzir diferentes tipos substâncias bioativas, como exemplo, enzimas, vitaminas, compostos antineoplásicos, imunossupressores e antibióticos (DEEPTHI et al., 2012).

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

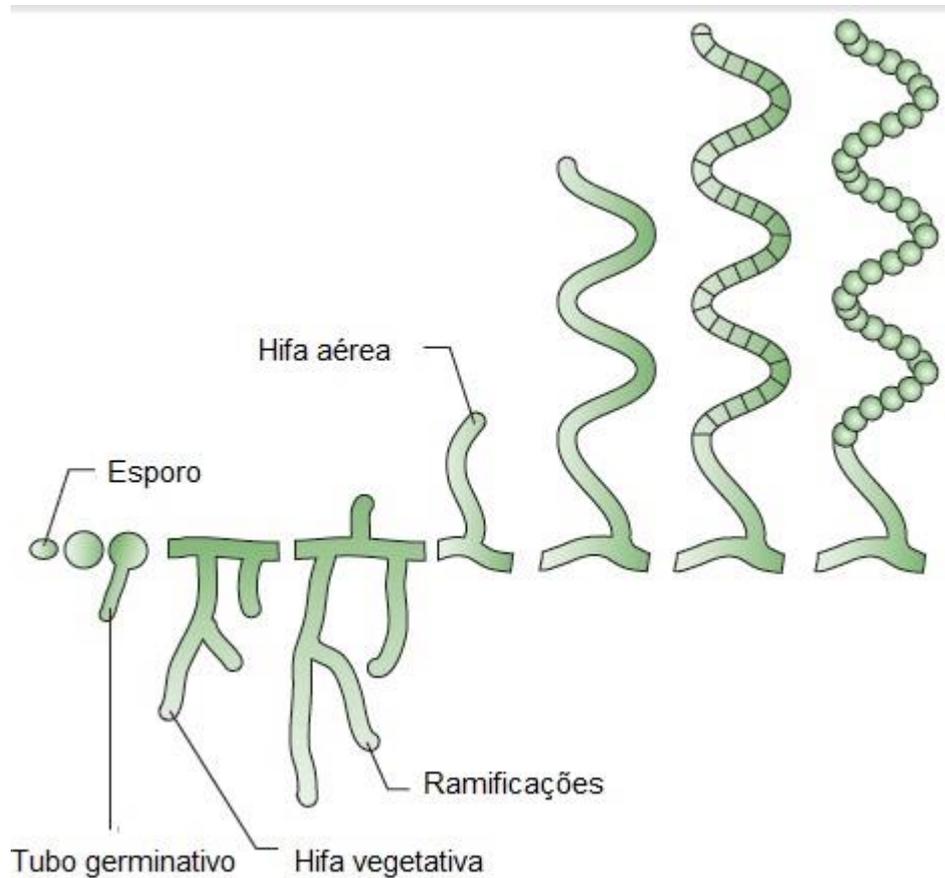
1. O GÊNERO *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* foi descrito inicialmente por Waksman e Henrici (1943) e encontra-se na família Streptomycetaceae e na ordem Actinomycetales e atualmente tem mais de 500 espécies descritas (RAJ e PRABAKARANA, 2011).

Seu habitat geralmente é em solos, segundo Baltz (2007) cada grama de solo fresco contém cerca 10^9 unidades formadoras de colônias de bactérias, sendo aproximadamente 10^7 desta população representada por actinobactérias. Também podem estar presentes em relação simbiótica com plantas e líquens. No meio ambiente desempenham uma função importante na decomposição de matéria orgânica, suas hifas ramificadas penetram no substrato e metabolizam as fontes orgânicas (polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos) pela ação de enzimas extracelulares (GONZÁLEZ et al., 2005; HUANG et al., 2012).

Estas bactérias já foram consideradas como fungos por apresentarem na sua morfologia hifas, toda via, durante o seu ciclo de vida apresentam filamentos ramificados denominados de micélio vegetativo formado por hifas ramificadas (primárias) que formam micélio aéreo (hifas secundárias) com coloração variada, passam por diferenciações morfológicas que incluem septação e formação de esporos originando a colônia (Figura 1). Os esporos é uma forma de reprodução e são produzidos em grande número, contribuindo para a preservação da espécie. Os esporos são sensíveis ao calor e resistem a dessecações, auxiliando na sobrevivência das espécies no período de estiagem (VENTURA et al., 2007; FLÄRDH; BUTTNER, 2009).

Figura 1. Ciclo de vida do gênero *Streptomyces*. (Fonte): (FLÄRDH; BUTTNER, 2009).



Em meados de 1960, *Streptomyces griseus* foi a primeira actinobactéria utilizada industrialmente para produção de antibiótico (estreptomicina) sendo também este o primeiro antibiótico da classe dos aminoglicosídeos. Logo após foram intensificadas pesquisas em busca de espécies de actinobactérias capazes de sintetizar biocompostos com atividade antimicrobiana (OHNISHI et al., 2008; EMERSON et al., 2012).

Ao decorrer dos estudos realizados com este gênero, descobriram sua capacidade de produzir diversos produtos naturais com atividades biológicas, característica esta justificada pelo seu metabolismo diferenciado. Até o momento, já foram descobertas biomoléculas podendo ser utilizadas como, fito-hormônios, compostos antivirais, agentes antitumorais, vitaminas, anti-helmintos, antioxidante,

bioherbicidas, enzimas, inibidores de enzimas e antimicrobianos (Tabela 2) (VICENTE et al., 2003; SALAMONI et al., 2010; KUMARAN et al., 2012).

Segundo Demain e Sanchez (2009) de um total de 22.500 biocompostos biologicamente ativos de origem microbiana descritos, cerca de 45% são produzidos por espécies de actinobactérias, 38% por fungos e 17% por bactérias unicelulares.

Tabela 1. Biocompostos produzidos por *Streptomyces* spp.

Biocompostos	Referências
Celulase	(PRASAD et al., 2013) 2013)
Antifúngico	(GANDOTRA et al., 2012; WANG et al., 2013; KANINI et al., 2013)
Antibiótico, Estaurosporina	(TR et al., 2012) (KIM et al., 2012)
Inibidor β -lactamase	(AWAD, 2013)
Tracolimus imunossupressores	(MURAMATSU; NAGAI, 2013)
α amilase	(SHARMA et al., 2013)
Xilanase	(BRITO-CUNHA et al., 2013)
Enzima fibrinolítica	(JU et al., 2012; BHAVANI et al., 2012; MEDEIROS E SILVA, DE et al., 2013)
Fito-hormônio	(ALAM et al., 2012; NIMAICHAND et al., 2013)
Antibiótico	(ATTA et al., 2012)
Proteases	(MOSTAFA et al., 2012)

1.1 ANTIBIÓTICOS E A RESISTÊNCIA BACTERIANA

Guimarães, et al. (2010), afirma que os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos. Em 1928 Alexander Fleming descobriu a Penicilina, substância antimicrobiana natural produzida por fungo *Penicillium notatum*, foi impulsionado a busca de antibióticos produzidos por micro-organismos, sendo justificado por serem mais eficazes em comparação aos antibióticos sintéticos descobertos anteriormente.

Com o passar dos anos, vários antibióticos foram descobertos como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, peptídeos, como também foram obtidos a partir destas classes de antibióticos naturais, protótipos naturais (semis sintéticos) microbianos como, derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, amicacina) (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com seu (i) mecanismo de ação (Tabela 2): inibidores da síntese de parede celular, da síntese proteica, da síntese de ácidos nucleicos ou danos à membrana plasmática, (ii) estrutura química, (iii) linhagem produtora, (iv) espectro de ação e (v) formas de biossíntese (LIMA 2011; PROCÓPIO et al., 2012). Em relação ao espectro de ação pode ser classificado como bactericida (inativa o micro-organismo alvo) e bacteriostático (que inibe o desenvolvimento do micro-organismo) (TORTORA et al., 2012).

Tabela 2. Mecanismo de ação de alguns antibióticos e suas classes.

Mecanismo de ação	Antibióticos
Inibidores da síntese de parede celular	Penicilina, Cefalosporinas, Vancomicina e Isoniazida
Inibidores de síntese proteica	Tetraciclina, Eritromicina, Estreptomicina, Oxazolidinonas e Estreptograminas
Dano à membrana plasmática	Polimixina B
Inibidores da síntese de ácidos nucleicos	Rifamicinas, Quinolonas e fluoroquinolonas
Outros	Sulfonamidas

(Fonte): (LEVY; MARSHALL, 2004)

Os antibióticos aplicados como agentes terapêuticos, nas infecções causadas por micro-organismos patógenos, como antibióticos antitumorais, agindo clinicamente como agentes citostáticos, na agricultura para o controle de doenças em plantas, na indústria alimentícia como preservantes de alimentos e na veterinária para tratamento de patologias e em rações com intuito de ganho de peso do animal (LIMA, 2011).

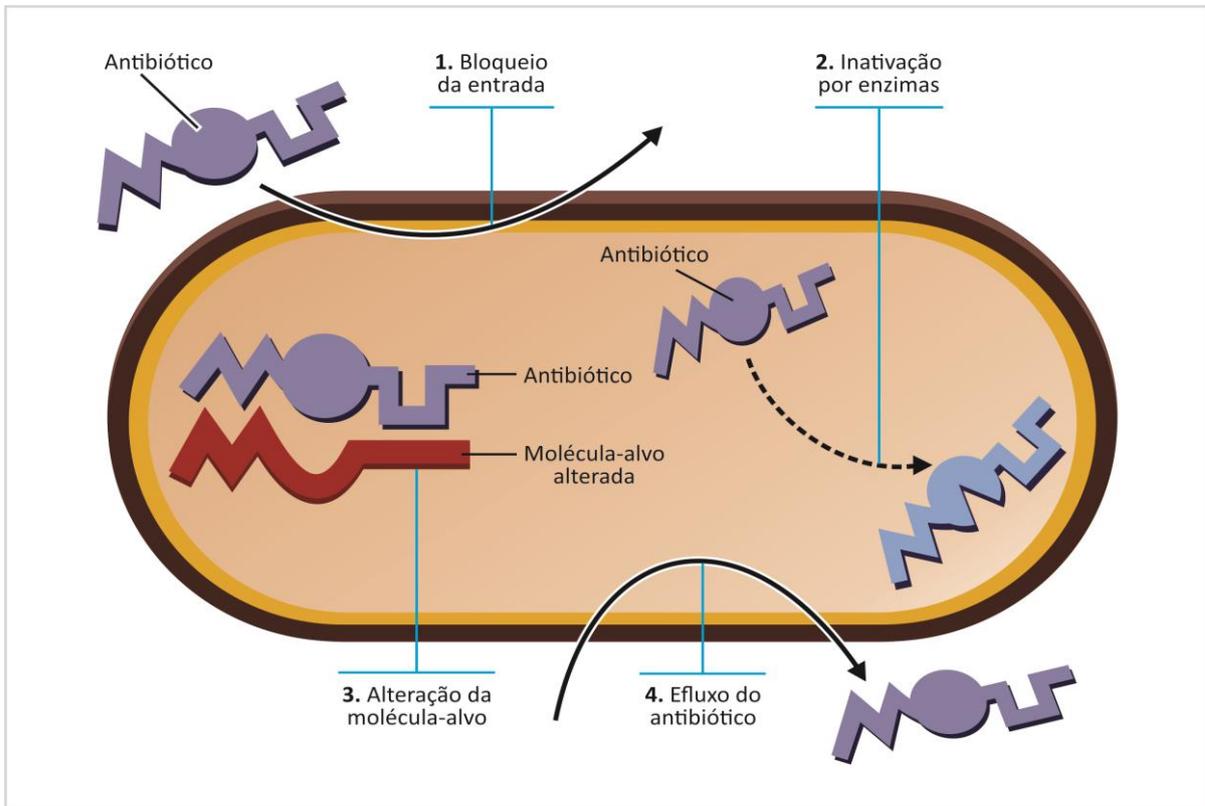
O uso indiscriminado dos antibióticos tem levado ao surgimento de patógenos resistentes as drogas convencionais e aos complexos formados por várias doenças, desenvolvendo o processo de multirresistência. Em 2004, mais de 70% das bactérias patogênicas apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos atualmente disponíveis no mercado (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

O gene que codifica o mecanismo de sobrevivência/resistência das bactérias pode ser adquirido por mutação, como erros na síntese de DNA durante a replicação; por bacteriófagos; plasmídeos; por transmissão de transposons entre bactérias de grupos taxonômicos e ecológicos diferentes; (LEVY; MARSHALL, 2004).

Como descrito por LEVY; MARSHALL (2004), os mecanismos de resistência podem ser classificados em quatro categorias (Figura 2):

- 1- Prevenção da entrada no sítio-alvo dentro da célula bacteriana: modifica a abertura das porinas fazendo com que os antibióticos não penetrem no espaço periplasmático.
- 2- Inativação enzimática: produção de uma enzima capaz que inativar uma estrutura específica do antibiótico, tornando-o inapto.
- 3- Alterações no sítio-alvo da droga: transformam o local no qual o antibiótico se liga à célula, sendo estas transformações no sítio capazes de neutralizar a ação dos antibióticos sem que a célula microbiana sofra grandes alterações.
- 4- Efluxo rápido: proteínas na membrana plasmática das bactérias, geralmente Gram-negativas atuam como bombas que expulsam os antibióticos, assim impedindo-o de penetrar e agir.

Figura 2. Imagem representativa dos mecanismos de resistência bacteriana (Fonte: TORTORA, et al., 2012).



O mecanismo de resistência bacteriana que acomete os antibióticos β -lactâmicos é a produção de enzimas com capacidade de promover alterações estruturais destes antibióticos, sendo assim inativando-os. Portanto por serem antibióticos muito utilizados na clínica, por apresentar amplo espectro de atividade antimicrobiana e toxicidade baixa, pesquisas são intensificadas para a busca de mecanismo para burlar a resistência bacteriana (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

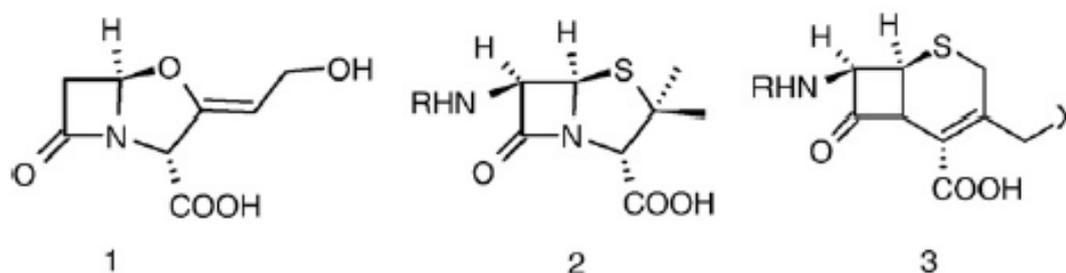
1.1.2 Ácido clavulânico

A produção de enzimas β -lactamases é um mecanismo de resistência produzido por bactérias em resposta a utilização dos antibióticos β -lactâmicos. Esta enzima catalisa irreversivelmente a ligação amida do anel β -lactâmico, causando a inativação desses tipos de antibióticos (ESSACK, 2001; TAHLAN; JENSEN, 2013). Devido ao surgimento deste mecanismo, iniciou a busca por inibidores de β -lactamases. Em 1970 houve a descoberta do ácido olivânico e ácido clavulânico

produzido por *Streptomyces olivaceus* e *Streptomyces clavuligerus* respectivamente (THERRIEN; LEVESQUE, 2000).

O ácido clavulânico (AC) é constituído por um anel β -lactâmico e anel oxazolidina condensados, (Brown et al.,1976). E este ácido apresenta a estrutura de base semelhante a penicilina, com a substituição de átomos oxigênio por enxofre (Figura 3). (SAUDAGAR et al., 2008; CARVALHO et al., 2009).

Figura 3. Imagem representativa das estruturas de (1) ácido clavulânico, (2) penicilinas e (3) cefalosporinas. Fonte: (SAUDAGAR et al., 2008).



Este composto apresenta baixa atividade antimicrobiana, mas é um ótimo inibidor de enzimas β -lactamases mecanismo produzido por bactérias resistentes às penicilinas e cefalosporinas (OLIVEIRA et al., 2009).

No entanto, quando o AC é utilizado juntamente cefalosporinas e penicilinas, ocorre uma ligação irreversível entre o grupo hidroxila da serina da β -lactamase com o AC, produzindo um intermediário estável, inativando a enzima e permitindo assim, que o antibiótico atue no combate à infecção. A combinação do AC com a amoxicilina é o maior exemplo desta associação (SALEM-BEKHIT et al., 2010)

A combinação amoxicilina/AC continua apresentando excelente atividade contra a maioria das espécies de bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, entre outras) e também contra muitas bactérias Gram-negativas (*Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Moxarella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Klebsiella pneumoniae*, entre outras (SAUDAGAR et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009). Toda vida o ácido clavulânico é tipicamente utilizado em hospitais para o tratamento de infecções que afetam o

sangue ou órgãos internos, ossos e articulações, superior ou inferior das vias respiratórias ou de pele e tecidos moles (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

1.1.3 Mastite

A mastite é uma inflamação da glândula mamária que acomete em um ou mais tetos do úbere, podendo ser um processo infeccioso causado por micro-organismos, ou não infeccioso provocado por traumas, processos alérgicos e fisiológicos, como por exemplo, nos primeiros dias da lactação e na interrupção do fluxo na lactação (BONINI PARDO et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Esta doença é caracterizada por alteração no tecido glandular causando distúrbios funcionais no quarto mamário afetado. Tais distúrbios resultam em uma diminuição da produção de leite, alterações em suas características físico-químicas, bacteriológicas, sensoriais e causam uma modificação no metabolismo celular, prejudicando a síntese dos componentes do leite (VIANA et al., 2010).

De acordo com a apresentação da inflamação, a mastite poderá apresentar-se na forma clínica diagnosticada, por alterações no úbere decorrentes da inflamação e por modificações da secreção láctea com presença de grumos, pus ou sangue, e na forma subclínica, assintomática, que é diagnosticada por testes que quantificam as células somáticas do leite secretado, o número alto de células somáticas afetam negativamente a produção de leite e seu valor nutritivo (BARRETO et al., 2010; CUNHA et al., 2006).

Esta inflamação é um dos problemas mais importantes de rebanhos leiteiros em todo o mundo, acomete toda cadeia produtiva, inclusive ao consumidor que poderá ter um produto final de qualidade inferior e mais caro, já a pecuária leiteira terá perdas econômicas associadas com a diminuição na quantidade, qualidade e sofrerá com o aumento dos custos envolvidos em programas de tratamento e de controle (PEIXOTO et al., 2013; VIANA, et al., 2010).

Os principais agentes etiológicos da mastite bacteriana são *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* sp, estafilococos coagulase-negativo e em destaque, *Staphylococcus aureus*, que representam 30-25% do total dos casos e apresentam

vários mecanismos de resistência aos antibióticos (MEDEIROS; FREITAS; et al., 2011; DAMBRÓS et al., 2013).

1.2 PROTEASES FIBRINOLÍTICAS

As proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, foram identificadas em vários sistemas biológicos e atuam no metabolismo e regulação metabólica e até na degradação de proteínas nos lisossomos para a divisão celular. Elas também são encontradas em diferentes organismos, de vírus até vertebrados, o seu mecanismo envolve a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas, peptídeos menores ou aminoácidos livres (CASTRO et al., 2011).

As proteases fibrinolíticas apresentam a capacidade de degradar a rede de fibrina (ONESMUS et al., 2008). Há diferentes fontes produtoras desses agentes fibrinolíticos como, veneno de cobra (DE SIMONE et al., 2005; CINTRA et al., 2012), cobra do mar (HE et al., 2007), anelídeos (WANG et al., 2011; PARK et al., 2013), plantas (PATEL et al., 2012) e micro-organismos (DUBEY et al., 2011).

Os micro-organismos se destacam por produzirem diferentes enzimas fibrinolíticas, como a estreptoquinase (EC 3.4.99.22) uma serina protease que ativa o plaminogênio tecidual e é produzida por *Streptococcus hemolyticus*, sendo esta a primeira enzima extraída de micro-organismos; a estafiloquinase que também age como ativador de plaminogênio, produzida por *Staphylococcus aureus*, sendo estas duas enzimas mencionadas anteriormente utilizadas na clínica. Por fim a *nattokinase* produzida por *Bacillus natto* que age de forma direta degradando a rede de fibrina e também ativando o plasminogênio tecidual, no entanto ainda não é utilizada no tratamento de trombose (LIJNEN et al., 1992; PENG et al., 2005; WANG et al., 2009).

Nos últimos anos já foram descobertas vários enzimas fibrinolíticas produzidas por micro-organismos (Tabela 3), como no estudo realizado por Wu et al. (2011) que descobriu a produção desta enzima por fungo endofítico identificado como *Fusarium*, na pesquisa de Mander et al. (2011) relatando a produção de protease com atividade fibrinolítica.

Tabela 3. Fontes de enzimas fibrinolíticas de origem microbiana.

Micro-organismos	Referências
Bacillus	
<i>B. subtilis</i> BK-17	Jeong et al. (2001)
<i>B. subtilis</i> A1	Jeong et al. (2004)
<i>B. subtilis</i> 168	Kho et al. (2005)
Actinobactérias	
<i>Actinomyces thermovulgaris</i>	Egorov et al. (1976)
<i>Streptomyces. megasporus</i> SD5	Chitte e Dey (2000), (2002)
<i>Streptomyces. spheroids</i> M8-2	Egorov et al. (1985)
<i>Streptomyces</i> sp Y405	Wang et al. (1999)
Fungos	
<i>Aspergillus ochraceus</i> 513	Batomunkueva e Egorov (2001)
<i>Cochliobolus lunatus</i>	Abdel-Fattah e Ismail (1994)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Tao et al. (1997), (1998)
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	El-Aassar (1995)
<i>Penicillium chrysogenum</i> H9	El-Aassar et al.(1990)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Choi e Shin (1998)
<i>Rhizopus.chinensis</i> 12	Xiao-Lan et al. (2005)

Fonte: PENG et al., 2005.

Segundo Peng et al. (2005) um dos maiores desafios para a aplicação industrial das enzimas fibrinolíticas está no meio de produção, isto é, otimização das condições nutricionais e ambientais, selecionando fontes de nitrogênio e carbono que favoreceram o crescimento celular e a produção da enzima fibrinolítica, podendo essas fontes variar de espécie.

1.2.2 Purificação de proteases e Sistema de duas fases aquosas

Os processos de separação de proteínas são bastante onerosos, devido à necessidade de muitas etapas para que se obtenha a molécula pura, em virtude de essas biomoléculas serem produzidas juntamente com outras de menor interesse e em meios que podem torna-las diluídas. Geralmente são complexas e sensíveis ao pH, temperatura e concentração do substrato ao longo do processo (WETHEARLY, 1994).

Portanto, o desenvolvimento de técnicas e metodologias para separação e purificação de proteínas é um dos pré-requisitos mais importantes para a maioria dos avanços das indústrias biotecnológicas, que anseiam produções em larga escala eficientes, que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da biomolécula principalmente em condições não fisiológicas (COSTA et al., 2000).

Uma alternativa para a extração e purificação que se adequa a critérios é o sistemas de duas fases aquosas, uma tecnologia clássica e versátil, que consiste na mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal que em certas concentrações formarão duas fases imiscíveis, contudo as enzimas irão migrar para uma das duas fases que se assemelham com suas características físico-químicas, e coeficiente de partição informará em que fase a enzima se encontra, no entanto pode ser modificado através de alterações das condições experimentais do sistema (SPELZINI et al., 2008; BASSANI et al., 2010)

As variáveis que influenciam na formação das fases como também na partição das biomoléculas são inúmeras e são classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema (componentes do sistema, tipo, massa molar e concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) e à proteína-alvo (hidrofobicidade, conformação, carga e massa molar) principalmente quanto a partição das biomoléculas (PORTO, 2008).

Segundo RODRIGUEZ-DURÁN et al., 2013, o S DFA ainda é utilizado como primeiro passo da purificação, com a finalidade de retirar quantidades significativas de diferentes contaminantes por uma única operação, apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais de isolamento e purificação de proteínas, pode ser aplicado em escalas maiores, possibilita o funcionamento contínuo, tem

baixos custos, os materiais podem ser reciclados e apresenta grande presença de água (65%-90%), sendo esta característica uma das mais importantes para a partição de biomoléculas e de partículas celulares sem que ocorra a desnaturação.

GAVASANE; GAIKAR (2003), afirma que a partição das proteínas no SDFA pode ser alterada pela composição e concentração de polímeros e sais. Também na pesquisa de Kirsch et al. (2012), os autores relatam que o uso de planejamentos estatísticos é uma ferramenta importante para compreender os efeitos das variáveis envolvidas na partição de proteases, uma vez que permite determinar que variáveis que interferem significativamente o SDFA e indica os efeitos das possíveis interações entre as variáveis.

1.2.2.1 Fatores que influenciam no sistema de duas fases aquosas

A formação das fases e partição das biomoléculas no sistema de duas fases aquosas sofre interferência de fatores como, concentração e massa molar do PEG, o tipo de sal, o pH, como também a temperatura em que será realizada o sistema. No entanto essas variáveis que podem induzir a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificados como variáveis intrínsecas ao próprio sistema (componentes do sistema, massa molar e concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à biomolécula (hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (TUBIO et al., 2004; PORTO, 2008).

Todavia os mecanismos que atuam na partição das biomoléculas ainda não são entendidos por inteiro, sabe-se que o coeficiente de partição pode ser decorrente das forças de Van de Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ; KORKMAZ, 2000).

O efeito da massa molar dos polímeros depende da massa molar da biomolécula a ser separada. Como exemplo, as proteínas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros do que as proteínas com pequena massa molar (ASENJO; ANDREWS, 2011). Em geral, o aumento da massa molar do polímero diminui a partição da biomolécula para a fase rica em polímero, sendo este fenômeno denominado de efeito do volume excluído, todavia quanto maior a massa molar do polímero, menor é o volume de solvente disponível, o que provocaria uma diminuição da solubilização das proteínas

hidrofílicas na fase rica em polímero (ALBERTSSON, 1986). A massa molar também apresenta outro efeito, a participação da mesma na interação hidrofóbica, ou seja, aumentando a massa molar há um aumento na capacidade de interação com proteínas hidrofóbicas (PORTO, 2008).

Com o aumento da concentração do polímero pode ocorrer um aumento na viscosidade da fase do sistema sendo assim influenciando na partição da biomolécula, sabe-se também que o aumento da massa molar do polímero acarreta ao uso de baixas concentrações do polímero. Portanto a concentração do polímero é um dos fatores que influenciam a partição de biomoléculas em sistema de duas fases aquosas, especialmente em sistemas PEG/sal (PORTO, 2008).

A influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Modificações no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Contudo, as proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao ponto isoelétrico) tem maior afinidade pela fase superior que é rica em polímero (PORTO, 2008).

A temperatura pode variar de acordo com o tipo de sistema utilizado. Nos sistemas PEG/sal, temperaturas maiores ou próximas à ambiente ocorre a facilitação da separação das fases do sistema e o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente acarreta uma redução na concentração do polímero da fase inferior (ZASLAVSKY, 1995).

1.2.3 Fibrinólise

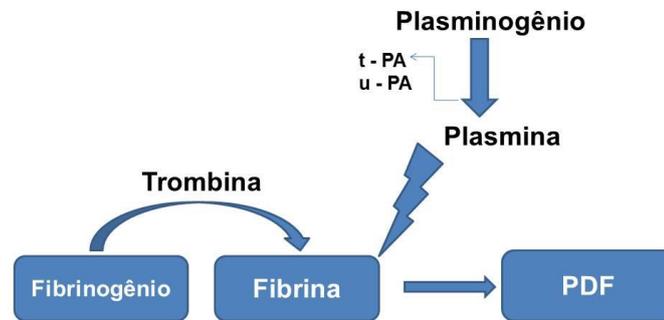
A hemostasia é uma sequência de respostas para o controle da perda sanguínea após uma lesão vascular, sendo este controle um mecanismo fisiológico natural. É composta por hemostasia primária, a formação do tampão plaquetário, hemostasia secundária, formação do coágulo sanguíneo e a hemostasia terciária, reparo da parede vascular lesada e fibrinólise (EYRE; GAMLIN, 2010).

A reação principal para coagulação sanguínea é a conversão da proteína solúvel, o fibrinogênio, em fibrina proteína insolúvel, sob a ação da trombina, formando a rede de fibrina. Logo após esta formação, começa o processo fibrinólise que é iniciado pela ação do ativador plasminogênio que converte o plasminogênio

em plasmina, uma protease que degrada a rede de fibrina, conforme a Figura 4 (FRANCO, 2001).

A regulação do sistema fibrinolítico é realizada de duas maneiras, α_2 – antiplasmina que atua diretamente no bloqueio da plasmina e pelo zimogênio presente no plasma denominada de TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) ou carboxipeptidase B, ativado pela trombina (FRANCO, 2001).

Figura 4. Representação esquemática do sistema fibrinolítico. PDF: produtos de degradação da fibrina.



No entanto quando ocorre uma disfunção na hemostasia terciária resulta em um distúrbio fisiopatológico chamado de trombose (DEEPAK et al., 2010; SIMKHADA et al., 2009;). Os tipos de medicamentos disponíveis no mercado ainda têm grandes desvantagens como, alto custo de tratamento, elevados efeitos colaterais, risco de hemorragias e reações alérgicas (JU et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ALAM, M.; DHARNI, S.; ABDUL-KHALIQ; et al. A promising strain of *Streptomyces* sp. with agricultural traits for growth promotion and disease management. **Indian journal of experimental biology**, v. 50, n. 8, p. 559–68, 2012.
- ATTA, H. M.; EL-SAYED, A. S.; EL-DESOUKEY, M. A.; HASSAN, M.; EL-GAZAR, M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2012.
- AWAD, H. M. & El-Shahed, K.Y.I. A novel *Actinomycete* sp. isolated from Egyptian Soil has β -Lactamase inhibitor activity and belongs to the *Streptomyces rochei* phylogenetic cluster. **World Applied Sciences Journal**, v. 21, n. 3, p. 360–370, 2013.
- BHAVANI, B.; NAVEENA, B.; PARTHA, N. Strain Improvement of *Streptomyces venezuelae* for enhanced fibrinolytic enzyme Production. **Advanced Materials Research**, v. 584, p. 440–444, 2012.
- BONINI PARDO, R.; MENDOZA-SÁNCHEZ, G.; NADER FILHO, A.; et al. Distribution of contagious and environmental mastitis agents isolated from milk samples collected from clinically health buffalo cows between brazilian dry and rainy seasons of the year. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2s, p. 896–899, 2010.
- BRANDÃO, R.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; SIQUEIRA, M. DE; et al. Clavulanic acid partitioning in charged aqueous two-phase micellar systems. **Separation and Purification Technology**, v. 103, p. 273–278, 2013.
- BRITO-CUNHA, C. C. D. Q.; CAMPOS, I. T. N. DE; FARIA, F. P. DE; BATAUS, L. A. M. Screening and xylanase production by *Streptomyces* sp. grown on lignocellulosic wastes. **Applied biochemistry and biotechnology**, DOI 10.1007/s12010-013-0193-3, 2013.
- CARVALHO, V.; BRANDÃO, J. F.; BRANDÃO, R.; et al. Stability of clavulanic acid under variable pH , ionic strength and temperature conditions . A new kinetic approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 89–93, 2009.
- CASTRO, H. C.; ABREU, P. A; GERALDO, R. B.; et al. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of molecular recognition** , v. 24, n. 2, p. 165–81, 2011.
- CUNHA, A.P; DA SILVA, L.B.G; PINHEIRO-JÚNIOR, J.W.; et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.17-21, 2006.

- DAMBRÓS, D.; BASSANI, J.; PORTES, V. M.; et al. Prevalência de *Corynebacterium* sp. no leite de vacas , sua relação com o manejo de ordenha e California Mastitis Test. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 55, p. 1–6, 2013.
- DEEPTHI, M. K.; SUDHAKAR, M. S.; DEVAMMA, M. N. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. from coringa mangrove soils for enzyme production and antimicrobial activity. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 110–116, 2012.
- DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009.
- EMERSON, R.; PROCÓPIO, D. L.; REIS, I.; et al. Review article Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–471, 2012.
- ESSACK, S. Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 10, p. 1391–9, 2001.
- EYRE, L.; GAMLIN, F. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 11, n. 6, p. 244–246, 2010.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.34, p. 229-237, 2001.
- FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 36–49, 2009.
- GANDOTRA, S.; BISHT, G. R. S.; SAHARAN, B. S. Antifungal activity of endophytic actinomycetes (*Streptomyces*) against *Candida* species. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v.1, n. 4, p. 375–378, 2012.
- GONZÁLEZ, I.; AYUSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS microbiology ecology**, v. 54, n. 3, p. 401–15, 2005.
- HUANG, X. L.; ZHUANG, L.; LIN, H. P.; et al. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 41, p. 9855–9864, 2012.
- HUSSNI, C. A.; BARBOSA, R. G.; BORGHESAN, A. C.; et al. Aspectos clínicos , ultra-sonográficos e venográficos da tromblebite jugular experimental em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n. 7, p. :595-600, 2012.
- JU, X.; CAO, X.; SUN, Y.; et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. XZNUM 00004. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2479–86, 2012.

KANINI, G. S.; KATSIFAS, E. A.; SAVVIDES, A. L.; et al. Greek indigenous *Streptomyces* as biocontrol agents against the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1468–79, 2013.

KIM, B.-Y.; ZUCCHI, T. D.; FIEDLER, H.-P.; GOODFELLOW, M. *Streptomyces staurosporininus* sp. nov., a staurosporine-producing actinomycete. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt 4, p. 966–70, 2012.

KUMARAN, S.; DEIVASIGAMANI, B.; VAIRAGKAR, U.; et al. Evaluation of Chitinase producing and antimicrobial properties of *Streptomyces* isolated from shrimp shell disposable area. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S861–S864, 2012.

LEVY, S. B. & MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses REVIEW. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 122–129, 2004.

LIJNEN, H. R.; COCK, F. DE; COLLEN, D. Comparative fibrinolytic and fibrinogenolytic properties of Staphylokinase and Streptokinase in Plasma of Different Species In Vitro. **Fibrinolysis**, v. 6, p. 33–37, 1992.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**, 2011.

MEDEIROS E SILVA, G. M. DE; VIANA MARQUES, D. D. A.; PORTO, T. S.; et al. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 339, p. 52–57, 2013.

MEDEIROS, E. S.; BENONE, S.; BARBOSA, P.; et al. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil 1. **Pesquisa Brasileira Veterinária**, v. 31, n. 3, p. 219–223, 2011.

MEDEIROS, E. S.; FREITAS, MANUELA F LYRA DE; SAUKAS, TOMOE N; et al. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. **Pesquisa Brasileira Veterinária**, v. 31, n. 6, p. 499–504, 2011.

KHAYATNOURI, M. H. & TOPCHI, A. Evaluation of antibacterial effect of monolaurin on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 19, p. 1163–1166, 2013.

MOSTAFA, E.-S. E.; SAAD, M. M.; AWAD, H. M.; et al. Optimization Conditions of Extracellular Proteases Production from a Newly Isolated *Streptomyces pseudogrisiolus* NRC-15. **E-Journal of Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 949–961, 2012.

MURAMATSU, H. & NAGAI, K. *Streptomyces tsukubensis* sp. nov., a producer of the immunosuppressant tacrolimus. **The Journal of Antibiotics**, p. 1–4, 2013.

NEGRÃO, F.; ALBERTO, C.; LOUZADA, N. TROMBOFLEBITE JUGULAR EQUINA (TJE). **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n.8, 2007.

NEVES, M. L. C.; PORTO, T. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; et al. Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG–citrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 318, p. 34–39, 2012.

NIMAICHAND, S.; TAMRIHAO, K.; YANG, L.-L.; et al. *Streptomyces hundungensis* sp. nov., a novel actinomycete with antifungal activity and plant growth promoting traits. **The Journal of antibiotics**, p. 1–5, 2013.

OHNISHI, Y.; ISHIKAWA, J.; HARA, H.; et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 4050–60, 2008.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 126–32, 2005.

PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, K. S.; et al. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 2, p. 165–171, 2011.

PORTO, T. S.; PESSÔA-FILHO, P. A.; NETO, B. B.; et al. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 547–52, 2007.

FARMACÊUTICAS, F. D. E. C.; PORTO, T. S. Cucurbita maxima. ,2008.

PRASAD, P.; SINGH, T.; SHEILA BEDI, M. Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil. **Journal of King Saud University - Science**, 2013.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V; SPELZINI, D.; BOERIS, V.; AGUILAR, C. N.; PICÓ, G. A. partition in aqueous two-phase system: its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 101, p. 392–7, 2013.

SALAMONI, S. P.; MANN, M. B.; CAMPOS, F. S.; et al. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1847–1856, 2010.

SALEM-BEKHIT, M. M.; ALANAZI, F. K.; ALSARRA, I. A. Improvement and enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* using vegetable oils. **African Journal of Biotechnology**, v. 9(40), p. 6806-6812, 2010.

SALES, A. E.; SOUZA, F. A. S. D. DE; TEIXEIRA, J. A.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Integrated Process Production and Extraction of the Fibrinolytic Protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485. **Applied biochemistry and biotechnology**, 2013.

SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 335–351, 2008.

SHARMA, T. K.; BHADANE, V. A.; KUMAR, L. S.; et al. Optimization of the production of a maltooligosaccharides producing amylase from the alkalophilic *Streptomyces lonarensis* strain NCL 716 using SVR Modeling. **Starch**, v.65, 179–185, 2013.

SILVA, C. S. R.; PAES BARRETO, C. L.; PEIXOTO, R. D. M.; et al. Ação antibacteriana da própolis marrom brasileira em diferentes solventes contra *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite caprina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 2, 2012.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. [Beta-lactam antibiotics]. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 27, n. 2, p. 116–29, 2009.

TAHLAN, K. & JENSEN, S. E. Origins of the β -lactam rings in natural products. **The Journal of Antibiotics**, p.1–10, 2013.

THERRIEN, C.; LEVESQUE, R. C. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 251–62, 2000.

PRASHITH KEKUDA, T.R.; SHOBHA, K.S.; ONKARAPPA, R.; GOUTHAM, S.A.; RAGHAVENDRA, H.L. Screening biological activities of a *Streptomyces* species isolated from soil of Agumbe, Karnataka, India. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 4, n. 3, p. 104–114, 2012.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol – dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293–301, 2004.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VIANA MARQUES, D. A.; PESSOA-JÚNIOR, A.; LIMA-FILHO, J. L.; et al. Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, p. 95–103, 2011.

VIANA, R. B.; CARDOSO, E. D. C.; GOUVEIA, I. M. DE; et al. Avaliação da eficiência do Somaticell® para o diagnóstico da contagem indireta de células somáticas no leite de búfalas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 1, n. 53, p. 24–30, 2010.

VICENTE, M. F.; GORROCHATEGUI, J.; CABELLO, A.; et al. Patterns of antimicrobial activities from soil *Actinomycetes* isolated under different conditions of pH and salinity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 814–823, 2003.

WANG, C.; DU, M.; ZHENG, D.; et al. Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis natto* B-12. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9722–9, 2009.

WANG, C.; WANG, Z.; QIAO, X.; et al. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. **FEMS microbiology letters**, 2013.

WETHEARLY, L. R. Engineering processes for bioseparations. Butterworth-Heinemann Ltd; 1994

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* FRENTE À *Staphylococcus* spp. MULTIRRESISTENTES DE MASTITE BUBALINA

Artigo a ser submetido à revista:

Pesquisa Veterinária Brasileira



Qualis – CAPES A2 para Medicina Veterinária

Trabalho.....

Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina¹

Juanize M. Silva², Ellen L. Clementino², Márcia N.C. Cunha², Késsia P. S. Porfírio³, Rinaldo A. Mota², Maria F.S. Teixeira⁴, Tatiana S. Porto⁵, Ana L.F. Porto^{2*}, Camila S. Porto²

ABSTRACT.- Silva, J.M.¹; Clementino, E.L.¹; Cunha, M.N.C.¹; Porfírio, K.P. S¹; Mota, R.A.¹; Teixeira, M.F.S.²; Porto, T.S.³; Porto, A.L.F.^{1*}; Porto, C.S.¹ [**Antimicrobial activity of bioactive molecules produced by *Streptomyces parvulus* against *Staphylococcus* spp. multi-drug resistant isolates from mastitis buffalo.**] Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE 52171-900, Brazil, E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Mastitis is a pathology that affects the mammary gland in different herds, causing the decline of production and quality of milk; consequently the economic losses have significant in dairying committing them. The use of antibiotics is the key to the treatment of this pathology, but ineffective in many cases due to the bacterial resistance is already known to disease. The aim of this study was to select strains of *Streptomyces* spp. producer of biomolecules with antimicrobial activity against multidrug-resistant bacteria isolated from buffalo-cows and determine the best production condition. A selection technique by agar block with 30 species of *Streptomyces* spp was realized, a bacterium selected was *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 in which showed higher antimicrobial activity against multidrug-resistant bacteria. Subsequently, an aerobic bacterium *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was grown in various conditions predetermined by factorial design 2⁴: Soybean concentrations (0.5, 1.0, 1.5%), glucose (0, 0.5, 1 g / L), agitation (150, 200, 250 rpm) and temperature (28, 32, 37°C) and all these followed by 120 hours of production. All independent variables have influenced positively on cell growth. On the other hand, the antimicrobial activity of 100 % growth inhibition was observed only under conditions 37°C in 250 rpm, after 72 hours of production. In the assays that had antimicrobial activity, we evaluated the production of clavulanic acid during the cultivation. The highest concentration of clavulanic acid was 269.84 g/L obtained under the conditions of 1.5 % of soybean meal and 0 g/L glucose in 96 hours. The strain *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was effective against multiresistant strains of *Staphylococcus* spp. of mastitis in buffalo-cows, still presenting concomitantly production of clavulanic acid for use pharmaceutical.

INDEX TERMS: clavulanic acid; antimicrobial; buffalo-cows mastitis; multi-drug resistance; *Streptomyces*.

1 Recebido em

Aceito para publicação em

2 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil. *Autor para correspondência: analuporto@yahoo.com.br

3 Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego, s/n, Recife, PE 50670-420, Brasil.

4 Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, AM 69077-000, Brasil.

5 Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFPE), Av. Bom Pastor, s/n, Garanhuns, PE 55292-270, Brasil.

RESUMO.- A mastite é uma patologia que acomete a glândula mamária de diferentes rebanhos, causando a queda de produção e qualidade do leite, conseqüentemente as perdas econômicas são significativas comprometendo a pecuária leiteira. O tratamento é embasado na utilização de antibióticos, sendo em muitos casos ineficaz devido à resistência bacteriana já conhecida para esta patologia. O objetivo deste estudo foi selecionar linhagens de *Streptomyces* spp. produtora de biomoléculas com atividade antimicrobiana frente às bactérias multirresistentes isoladas de búfalas, bem como determinar a melhor condição de produção. Foi realizada uma seleção pela técnica de bloco de gelose com 30 espécies de *Streptomyces* spp., sendo selecionado *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 no qual apresentou maior espectro atividade antimicrobiana frente às bactérias multirresistentes. Posteriormente, a espécie selecionada *Streptomyces parvulus*. DPUA 1573 foi cultivada em diferentes condições predeterminadas pelo planejamento fatorial 2⁴: concentrações de soja (0,5%; 1,0%; 1,5%), glicose (0; 0,5; 1g/L), a agitação (150 rpm; 200 rpm; 250 rpm) e a temperatura (28°C; 32°C; 37°C) e todos estes ensaios acompanhados até 120 horas de produção. Todas as variáveis independentes influenciaram positivamente no crescimento celular. Por outro lado, atividade antimicrobiana com 100% de inibição foram observados apenas nas condições 37°C em 250 rpm, após 72 horas de produção. Nos experimentos que obtiveram atividade antimicrobiana, foi avaliada a produção de ácido clavulânico ao longo do cultivo. A maior concentração de ácido clavulânico foi de 269,84 g/L obtidas nas condições de 1,5% de farinha de soja e 0 g/L de glicose no tempo de 96 horas. A linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi eficiente contra os isolados multiresistentes de *Staphylococcus* spp. de mastite em búfalas, ainda apresentando concomitantemente produção de ácido clavulânico com o potencial uso farmacêutico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ácido clavulânico; Antimicrobiano; mastite bubalina; multirresistência; *Streptomyces*.

INTRODUÇÃO

Mundialmente consumido, o leite de búfalas possui alta qualidade nutricional, com teores de proteínas, gorduras e minerais superiores ao leite de outros animais e seu aproveitamento industrial é superior em comparação ao leite bovino (Barreto et al., 2010). Dentre os fatores que influenciam na qualidade do leite estão a dieta, a constituição genética, a estação do ano, o estágio de lactação, o manejo da ordenha e a sanidade (Dür et al., 2000).

A criação de bubalinos apresenta problemas sanitários semelhantes à bovinocultura e dentre esses fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, destaca-se a mastite, processo inflamatório geralmente de caráter infeccioso, no qual está envolvida uma série de microorganismos, usualmente de origem bacteriana, e possivelmente de fungos, leveduras, algas e mais raramente os vírus (Langoni et al., 2001). A mastite causa prejuízos relacionados à diminuição e qualidade do leite, redução na capacidade produtora dos rebanhos, custos extras com assistência veterinária e principalmente gastos com medicamentos, que muitas vezes não são eficazes no seu tratamento (Medeiros et al., 2011).

O gênero *Staphylococcus* é considerado como o principal agente etiológico da mastite por apresentar grande incidência e fácil contágio. Também pode ser classificado como um grupo de bactérias multirresistentes, onde cerca 95% dos antibióticos comercializados e utilizados na pecuária são ineficazes (Bezerra et al., 2009; Nader et al., 2007; Oliveira, 2006).

A disseminação do uso inadequado de antibióticos acarretou a seleção e desenvolvimento de defesas das bactérias aos agentes antimicrobianos, desencadeando o surgimento da resistência bacteriana (Silveira et al., 2006). Um dos mecanismos de resistência que as bactérias apresentam é produzir β -lactamases, enzimas que conseguem inativar o anel β -lactâmico dos antibióticos tornando-os inaptos para o tratamento de doenças (Essack, 2001). No entanto sabe-se da existência de inibidores da enzima β -lactamase, como o ácido clavulânico produzido por *Streptomyces clavulagerus*, que podem apresentar pouca atividade antimicrobiana, mas ao ser utilizado em associação com um antibiótico apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana (Costa et al., 2012).

Uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos são as actinobactérias, reconhecidas por serem micro-organismos que sintetizam metabólitos antimicrobianos, agentes antitumorais, inseticidas, vitaminas e enzimas. Dentre este grupo de bactérias, destaca-se o gênero *Streptomyces* sp., onde 80% dos antibióticos produzidos por este gênero são comercializados e utilizados na saúde humana e animal e na agricultura (Panigrahi et al., 2011; Procópio, et al., 2012).

Com o aparecimento da resistência bacteriana nos tratamentos de infecções nas glândulas mamárias em búfalas, existe a necessidade da descoberta de novas biomoléculas eficazes, capazes de inibir bactérias multirresistentes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi buscar novos biocompostos com atividade antimicrobiana frente às bactérias multirresistentes isoladas de mastite em búfalas.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

Utilizado 30 espécies de *Streptomyces* spp. isoladas de líquens da Região Amazônica obtidas da coleção de culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA).

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a espécies de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bubalina da raça Murrah e classificados como multirresistentes por método molecular e antibiograma (Medeiros et al., 2011).

As espécies de *Streptomyces* spp. e *Staphylococcus* spp. foram reativadas em meio de cultura ISP-2 (Pridham et al., 1957) e Ágar nutriente, respectivamente. E preservadas em cultura estoque em criotubos contendo glicerol a 20% a -20°C.

Screening de *Streptomyces* spp. produtoras de antimicrobiano

Foram inoculados 30 espécies de *Streptomyces* spp. em meio sólido ISP-2 modificado pela retirada da glicose a 28°C por 168 horas em estufa microbiológica. Após este período, foram retirados blocos de 6mm de diâmetro e inseridos na superfície de placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton, já com

Staphylococcus spp. inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL. As placas foram incubadas em estufa microbiológica na temperatura de 37°C por 24 horas.

Meio de produção de biocompostos com atividade antimicrobiana

O meio de produção utilizado foi MS-2 (Porto et al., 1996) composto por diferentes concentrações de farinha de soja (0,5, 1,0 e 1,5%), e ainda com a presença de sais: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% (p/v) de NH_4Cl , 0,435% (p/v) de K_2HPO_4 e 0,1 mL de solução mineral (100mg de $FeSO_4$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4$, $CaCl_2 \cdot H_2O$ em 100 mL de água destilada), com pH inicial 7,2, esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 minutos a 121°C.

Produção de biocompostos substâncias antimicrobianas e ácido clavulânico utilizando planejamento fatorial 2^4

Streptomyces parvulus DPUA 1573 foi cultivada em frascos cônicos no meio de cultivo ISP-2, modificado pela retirada da glicose em 28°C a 200 rpm por 48 horas. Posteriormente inoculado no meio de produção (MS-2) em uma concentração celular de 10^8 UFC/mL em condições predeterminadas pelo planejamento fatorial 2^4 com quatro pontos centrais (Quadro 1) por 120 horas.

Os efeitos e as possíveis interações das condições estudadas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95%. A análise estatística do planejamento fatorial, incluindo os diagramas foram realizados utilizando o Software *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc, 2008).

Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada a cada 24 horas até 120 horas de fermentação por peso seco. O conteúdo do frasco foi filtrado em de papel filtro seco previamente pesado, em seguida o papel de filtro juntamente com a massa celular foi levado em micro-ondas na potência baixa por 10 minutos (Olsson e Nielsen, 1997).

Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada a cada 24 horas até 120 horas de fermentação em microplacas de 96 poços. Para obter o líquido metabólico livre de células, uma alíquota foi retirada e centrifugada a 12.000 rpm por 20 minutos. Em cada poço foi adicionado 50µl do líquido metabólico, e 5µl da bactéria a concentração de 5×10^4 UFC/mL e 45µl do meio Müller Hinton líquido (CLSI, 2003). O controle negativo foi feito sem a presença do micro-organismo teste adicionado do líquido metabólico e o controle positivo com a presença da bactéria teste, sem o líquido metabólico livres de células. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas, após este período foi determinado às absorbâncias por um leitor de microplacas a 600nm.

Determinação do ácido clavulânico

A metodologia utilizada para determinar a concentração de ácido clavulânico no líquido fermentado foi determinada espectrofotometricamente a 311nm. A absorvância corresponde à liberação do produto [1-(8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-25enol) imidazol-] da reação entre ácido clavulânico e imidazol (Bird et al.,1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 linhagens de *Streptomyces* spp. avaliadas pelo bloco de gelose, 2 (6,6%) demonstraram atividade antibacteriana frente a 7 (100%) das amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bubalina. Portanto as linhagens *Streptomyces* sp. DPUA 1452 e *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 obtiveram halos de inibição de 10mm e 15mm respectivamente.

Para determinar a melhor condição de produção de metabólitos antimicrobianos pela linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi realizado ensaios com diferentes concentrações de farinha de soja e glicose, como também em variadas condições de cultivo segundo o planejamento fatorial 2⁴ (Quadro 1).

Augustine et al. (2004) em seu trabalho de produção de antimicrobianos por *Streptomyces* sp. PU 23 afirma que a produção dos mesmos pode ser influenciada pela composição do meio de produção e também as condições ambientais que muitas vezes varia de organismo para organismo. Segundo Vijayakumar et al. (2011) a temperatura e agitação podem influenciar consideravelmente na fisiologia, morfologia, bioquímica e produção de moléculas bioativas. Nesta pesquisa foi observado que a temperatura e agitação influenciaram drasticamente a produção dos antimicrobianos, obtendo atividade somente na condição de 37°C a 250 rpm.

Portanto, a atividade antimicrobiana foi obtida em todos os ensaios nas condições 37°C em 250rpm, entretanto optou-se por utilizar os níveis inferiores das concentrações de fonte de carbono e nitrogênio, sendo sim mais favorável industrialmente, portanto o ensaio 13 (0,5% de farinha de soja e 0 g/L de glicose), e no tempo de 72 horas, caracterizado como início da fase estacionária, na qual é caracterizada como o início da produção de antimicrobianos.

A síntese de compostos biológicos antimicrobianos pelo gênero *Streptomyces* ocorre geralmente na fase estacionária do seu crescimento, podendo ser classificados como metabólitos secundários (Wohlleben et al., 2012). Reddy et al., 2011 afirma que produção de antimicrobianos foi iniciada na fase estacionária (72 horas) da linhagem *Streptomyces rochei* tendo a o seu declínio em 168 horas de fermentação frente a *Candida albicans* MTCC 183, *Staphylococcus aureus* MTCC 1771, *Escherichia coli* MTCC 443.

Com 72 horas de fermentação ocorreu a maior produção de compostos antimicrobianos, obtendo a inibição de 100% do crescimento dos *Staphylococcus* spp.. Sendo este resultado de acordo com o trabalho de Pajeú Nascimento et al. (2014) no qual a atividade foi constatada no tempo de 72 horas de fermentação pelo *Streptomyces* sp. DPUA 1566 utilizando o meio MS-2 para a produção destes biocompostos frente bactérias isoladas de mastite caprina. Carneiro da Cunha et al. (2010) trabalhando com *Streptomyces* sp. DPUA 1542 e *Nocardia* sp. DPUA 1571 utilizando como substrato farinha de soja,

selecionou o tempo de 96 horas e 72 horas de fermentação respectivamente, nos quais obtiveram atividade frente à *Staphylococcus* sp. resistentes a antibióticos β -lactâmicos isolados de mastite bovina.

Como apresentado na Quadro 3 todos os ensaios nas condições de 37°C a 250 rpm foi verificado a produção do ácido clavulânico. No ensaio 14 apresentou maior concentração de ácido clavulânico de 269,84 mg/L no tempo de 96 horas sendo no maior nível de farinha de soja (1,5%) e 0 g/L de glicose, assim como substâncias antimicrobianas, o ácido clavulânico é caracterizado como metabolito secundário, por está razão sua produção é iniciada na fase estacionária.

Domingues et al. (2010) estudaram a produção do ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* e utilizaram no meio de produção glicerol (15 g/L) como fonte de carbono e proteína isolada de soja (1,55 %) fonte de nitrogênio e obteve sua maior concentração de 350,3 mg/L no tempo de 144 horas de fermentação. Viana Marques et al. (2011) trabalhou com a linhagem *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 isolada de solo utilizando como substrato farinha de soja no seu meio de produção obteve sua maior produção de ácido clavulânico (629 mg/L) na sua maior concentração de soja (4%). Em comparação aos resultados dos autores citados acima, a concentração do ácido clavulânico desta pesquisa foi abaixo dos trabalhos mencionados (269,84 mg/L), no entanto a concentração de farinha de soja e tempo de fermentação dos mesmos é superior em comparação a esta pesquisa, que foi definido 1,5% de farinha de soja e 96 horas de produção.

Todas as variáveis independentes estudadas influenciaram no crescimento celular assim como as suas interações com efeito positivo, podendo ser visualizado no gráfico de Pareto (Figura 2).

Singh et al. (2009) que estudaram que fatores como, diferentes fontes e concentrações de nitrogênio e carbono, concentração do inóculo, salinidade, pH, temperatura poderiam influenciar na cinética do crescimento do *Streptomyces tanashiensis souche* A2D isolado do solo do lago na Índia. Os autores observaram que no meio de cultivo contendo a concentração 1% farelo de soja proporcionaram o crescimento microbiano, no entanto neste trabalho a variável independente concentração de farinha de soja no maior nível (1,5%) utilizado nesta pesquisa proporcionou o desenvolvimento microbiano. Assim quando é disponibilizado maiores concentrações da fonte de nitrogênio, possibilita toda a síntese de compostos nitrogenados (aminoácidos, proteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos) pela maquinaria metabólica do micro-organismo, proporcionando o crescimento.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que as condições de cultivo da linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foram essenciais para o crescimento celular e produção de antimicrobianos frente bactérias *Staphylococcus* spp. multirresistentes isoladas de búfalas com diagnóstico de mastite. O micro-organismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 conseguiu produzir simultaneamente substâncias antimicrobianas e inibidor da enzima β -lactamase em quantidades significativas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do RENORBIO/CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

REFERÊNCIAS

- Awad H.M. & El-Shahed K.Y.I. 2013. A novel *Actinomyces* sp. isolated from egyptian soil has β -lactamase inhibitor activity and belongs to the *Streptomyces rochei* phylogenetic cluster. W. Ap. Sciences J.v. 21 (3) p. 360-370.
- Barreto M. L. J., Rangel A. H. N., Araújo V.M., Bezerra K.C., Medeiros H.R., Oliveira J.P.F., Andrade K.D. 2010. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (ccs), a produção, o teor de gordura, proteína e extrato seco total do leite bubalino, ACSA – Agrop. Cient. no Semi-Árido, v.06, n 02, p.47 – 53.
- Bezerra D. A. C.; Pereira A.V.; Lôbo K.M.S., Rodrigues O.G., Athayder A.C.R., Mota R.A., Medeiros E.S., Rodrigues S.C. 2009. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. Rev. Brasil. Farmacog., v.19, n.4.
- Bird A.E., Bellis J.M. & Gasson, B.C. 1985. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. Analyst. v. 107, pp. 1241-1245.
- Cunha M.N.C., Silva, N.M.V., Teixeira M.F.S., Mota R.A., Lima-Filho J.L., Porto T.S., Porto A.L.F. 2010. Actinomicetos produtores de inibidores de β -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.62, n.6, p.1312-1319.
- Dürr J.W., Fontaneli R.S. & Burchard J.F. 2000. Fatores que afetam a composição do leite. In: curso de sistemas de produção para gado de leite baseado em pastagens sob plantio direto. Passo Fundo. Embrapa – Trigo.
- Essack S.Y. 2001. The development of β -Lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. Pharmace. Resear., v. 18, p. 1391-1399.
- Faden M.S.; Qattan W.T.; Moneib N.A., Yassien M.A. 2011. Isolation of antimicrobially active *Streptomyces* strain from West Area of Saudi Arabia. J. of Pharm. Rese., v. 4, n. 7, p. 2322-2324.
- Kumar V., Bharti A., Negi Y.K., Gusain O.P., Bisht G.S. 2012. Taxonomy and antimicrobial activity of moderately salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces* sp. MN 9(V) isolated from solitary wasp mud nest. Ann Microbiol v. 62:p. 979–985.
- Langoni H., Domingues P.F., Molero J.R., Baldini S. 2001. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*), ARS veterinária, v. 17, n.03, p. 213-217.
- Letícia C.G., Domingues L.C.G., Teodoro J.C., Hokka C.O., Badino A.C. Araújo, M.L.G.C. 2010. Optimisation of the glycerol-to-ornithine molar ratio in the feed medium for the continuous production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. Bioche.l Engine. v. 53 p. 7–11.
- Marques D.A.V., Cunha M.N.C., Araújo J.M., Lima-Filho J.L., Converti A., Pessoa-Junior A., Porto A.L.F. 2011. Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces* sp. DAUFPE 3060 by response surface methodology. Brazi. J. of Micro. v. 42:p. 658-667
- Medeiros E.S., França C.A., Krewer C.C., Peixoto R.M., Souza-Junior A.F., Cavalcante M.B., Costa M.M., Mota R.A. 2011. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. Pesq. Vet. Bras. v 23, n 4, p. 793-796.

- Medeiros E.S., Freitas M. F. L., Saukas T. N., Azevedo S.S., Pinheiro-Junior J.W., Branderpim D.F., Neto O.L.S., Mota R.A. 2011. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. *Pesq. Vet. Bras.* v. 31, n.6, p. 499-504.
- Nascimento T.P., Porto C.S., Teixeira M.F.S., Porto T.S., Porto A.L.F. 2014. Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. ante isolados de mastite caprina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* V.66, n.1, p. 101-108.
- Nader filho A., Ferreira L.A. do Amaral., Junior O.D.R., Oliveira R.P. 2007. Sensibilidade Antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arqu. do Inst. Biol.*, v.74, n.1, p. 1-4.
- NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. 2003. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Oliveira, A.L. 2006. Resistência bacteriana a antibióticos: Uma análise da conduta hospitalar. *Rev. Cesumar-Ciê. Hum. e Soci. aplicadas.* v.11, n.1.
- Panigrahi T., Kumar G., Karthik L., Rao K.V.B. 2011. Screening of antimicrobial activity of novel *Streptomyces* sp. *VITTKGB* isolated from agricultural land of Vellore, TN, India. *J. of pharma. Rese.*, v. 4, n.6. p. 1656-1658.
- Porto A.L.F., Campos-Takaki G. M., Lima Filho J.L.. 1996. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. *App. Biochem. Biotechn.*v.60, p.115-122.
- Pridham T. G., Aderson P., Foley C., Lindenfelser L. A, Hesseltine C.W., Benedict, R. G. A. 1957. Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. *Antibiot. M.* p.947-953.
- Procopio R.E.L., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazi. J. of infec. Disea.* p. 466-471.
- Saudagar P.S., Survase, S.A. & Singhal, R.S. 2008. Clavulanic acid: A review. *Biotechn. Advances*, v. 26, 335-351.
- Silveira G.P., Nome, F., Gesser J.C., Sá M.M., Terenzi, H. 2006. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 844-855.
- Singh L.S., Mazumber, S. & Bora, T.C. 2009. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J. Myco. Médi.* v. 19, p. 225-233.
- Sripreechak P., Tanasupawat S., Matsumoto A., Inahashi Y., Suwanborirux K., Takahashi Y. 2013. Identification and antimicrobial activity of actinobacteria from soils in southern Thai. *Trop. Biomed.* 30(1): 46-55.
- Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N., Mazumdar S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *J. Mycol. Médic.* v. 19, p. 161-167.
- Vijayakumar R., Muthukumar C., Saravanamuthu R., Panneerselvam K., Thajuddin N., Panneerselvam A. 2011. Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J Microbiol* DOI 10.1007/s12088-011-0138-x.
- Zhang N., Qin Z., Duan H., Xie Y., Yu J., Lu C., Liu X., 2012. Optimization of médium composition for production of antifungal active substance from *Streptomyces hygroscopicus* BS-112. *African J. of Microb. Rese.* 6, 71-80.

Quadro 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^4 na produção de biocompostos com atividade antimicrobiana

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central	Maior (+1)
Farinha de soja (%)	0,5	1	1,5
Glicose (g/L)	0	0,5	1
Rotação (rpm)	150	200	250
Temperatura (°C)	28	32	37

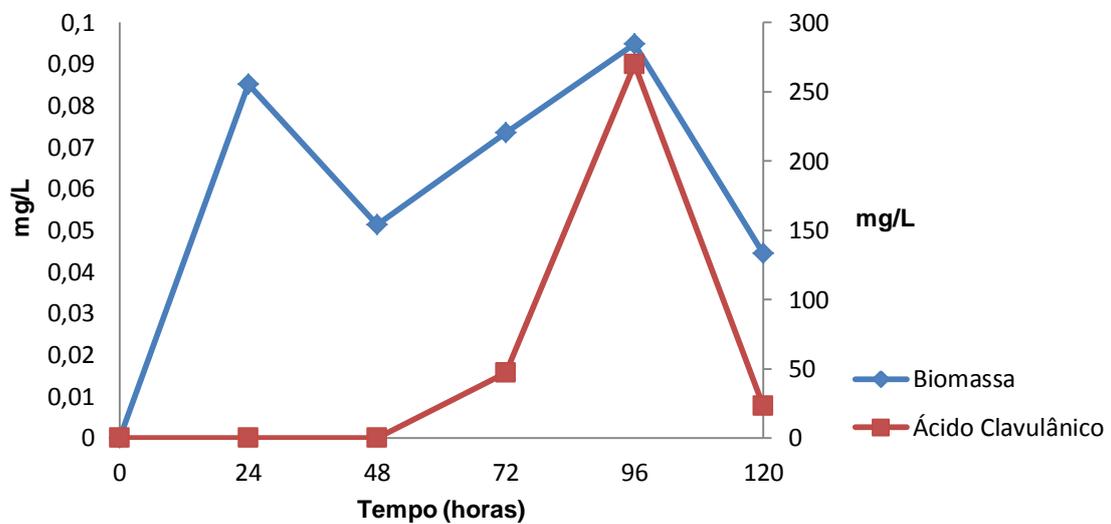


Figura 1. A curva de crescimento e produção de ácido clavulânico do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 cultivados no meio MS-2 nas condições do ensaio 14 em agitador orbital por 120 horas.

Quadro 2. Resultados da atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 em 72 horas de fermentação utilizando planejamento fatorial 2⁴.

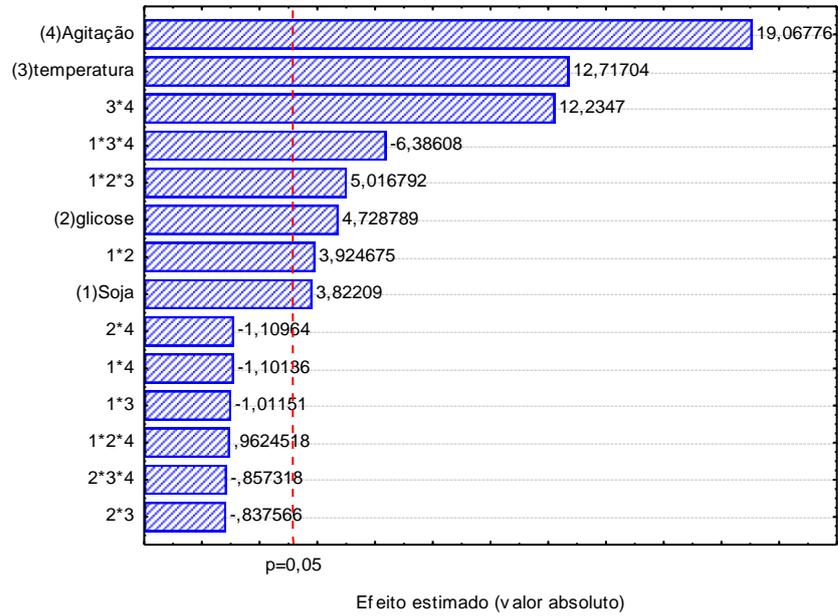
Ensaio	Soja (%)	Glicose (g/L)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Atividade Antimicrobiana*
1	0,5	0	28	150	-
2	1,5	0	28	150	-
3	0,5	1	28	150	-
4	1,5	1	28	150	-
5	0,5	0	37	150	-
6	1,5	0	37	150	-
7	0,5	1	37	150	-
8	1,5	1	37	150	-
9	0,5	0	28	250	-
10	1,5	0	28	250	-
11	0,5	1	28	250	-
12	1,5	1	28	250	-
13	0,5	0	37	250	+
14	1,5	0	37	250	+
15	0,5	1	37	250	+
16	1,5	1	37	250	+
17 C	1	0,5	32	200	-
18 C	1	0,5	32	200	-
19 C	1	0,5	32	200	-
20 C	1	0,5	32	200	-

- não apresentou atividade / + apresentou atividade

Quadro 3. Produção do ácido clavulânico por *Streptomyces parvulus* DPUA 1572 nas condições 37°C em 250 rpm e as concentrações de farinha de soja (1,5 %/ 0,5%) e de glicose (0 g/L / 1 g/L) até 120 horas de fermentação.

Ensaio	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
13	Quadro0	0	34,61	257,92	30,61
14	0	0	47,23	269,84	22,92
15	0	0	32,15	256,38	99,84
16	0	0	40,30	265,61	115,23

Figura 2. Gráfico de Pareto demonstrando a influencia das variáveis independentes e suas interações sob a variável resposta crescimento celular no tempo de 72 horas de fermentação do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.



CAPÍTULO III**PRODUÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICA POR *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 E EXTRAÇÃO EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS**

Artigo a ser submetido à revista:
Brazilian Journal of Microbiology



Qualis – CAPES A2 para Medicina Veterinária

Produção de proteases fibrinolíticas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e extração por sistema de duas fases aquosas

Silva, J.M.¹; Clementino, E.L.¹; Nascimento, T.P.²; Sales, A.E.¹; Teixeira, M.F.S.⁴
Porto, T.S.³; Porto, A.L.F.^{1*}; Porto, C.S.¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE

² Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE

³ Universidade Federal Rural de Garanhuns - UAG, Garanhuns, PE

⁴ Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Resumo

As proteases fibrinolíticas são capazes de degradar a fibrina, principal proteína que compõe os coágulos sanguíneos. Essas proteases apresentam diferentes fontes produtoras, no entanto a que merece destaque são os micro-organismos. O objetivo desta pesquisa foi produzir protease fibrinolítica por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, bem como extrair a protease de interesse por sistema de duas fases aquosas PEG/MgSO₄. Foi realizado um planejamento fatorial 2⁴ avaliando a concentração da fonte de nitrogênio (farinha de soja 0,5, 1,0 e 1,5 %) e da fonte de carbono (glicose 0, 0,5 e 1,0 g/L), temperatura (28, 32 e 37 °C) e agitação (150, 200 e 250 rpm) tendo como variável resposta a atividade fibrinolítica. Para a extração da protease fibrinolítica foi utilizado o sistema PEG/MgSO₄ com as concentrações de PEG e sal, peso molar do PEG e pH previamente determinado por planejamento fatorial 2⁴. Conforme a análise estatística foi verificada que a variável independente glicose, a única que apresentou o efeito significativo e positivo na produção da protease. A condição que melhor favoreceu a produção de protease fibrinolítica pelo micro-organismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 era composta de 1,5 % de farinha de soja, 0 g/L glicose a 150 rpm em 28°C produzindo 835 U/mL com 48 horas de fermentação. Na extração da protease fibrinolítica em SDFA o ensaio 14 obteve 747% de recuperação em atividade fibrinolítica, e a partição foi favorecida para a fase interior, obtendo um coeficiente de partição (K) 0,096. A protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1753 é uma interessante alternativa para tratamentos de casos de trombose.

Palavras-chaves: Fibrinólise; *Streptomyces parvulus*; SDFA; Proteases.

Abstract

Fibrinolytic proteases are able to degrade fibrin, the main protein that makes up blood clots. These proteases have different production sources, however worth mentioning are the micro-organisms. The goal of this work was to produce fibrinolytic protease by strain *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, and extract the protease of interest by aqueous two-phase system PEG/MgSO₄. A factorial design of 2⁴ was realized for determined a concentration of the nitrogen source (soybean meal 0.5, 1.0 and 1.5%) and carbon source (glucose 0, 0.5 and 1.0 g / L) in temperature (28, 32 and 37°C) and agitation (150, 200 and 250 rpm) as the response variable the fibrinolytic activity. Was used PEG/MgSO₄ system for the extraction of the fibrinolytic protease and at the concentrations of PEG and salt, pH and PEG molar weight predetermined by 2⁴ factorial design. As statistical analysis showed that the independent variable glucose, only presented the significant and positive effect on the production of protease. The conditions that favor the best fibrinolytic protease production by microorganism *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was composed of 1.5% soybean meal, 0 g /L glucose and 150 rpm in 28°C yielding 835 U /mL 48 hours fermentation. Thus, the extraction of fibrinolytic protease by ATPS, the experimental run 14 was demonstrated 747% recovery in fibrinolytic activity, and partition was favored for the bottom phase, obtaining a partition coefficient (K) 0.096. The fibrinolytic protease produced by *Streptomyces parvulus* DPUA 1753 is an interesting alternative for cases of thrombosis treatments.

Keywords: ATPS; Fibrinolysis; *Streptomyces* sp.; Proteases.

Introdução

No mercado mundial das enzimas, o interesse na utilização das enzimas microbianas na indústria farmacêutica está em crescimento, podendo ser justificado pela sua facilidade de manipulação, fácil aumento de escala, os micro-organismos não dependem de sazonalidade para seu desenvolvimento, diversidade bioquímica e podem utilizar substratos de baixo custo ou até resíduos agroindustriais (El-Shafei *et al.*, 2010).

As actinobactérias, em destaque o gênero *Streptomyces*, é um grupo de bactérias filamentosas, Gram-positivas e apresentam um papel importante no meio ambiente por decompor matéria-orgânica, contudo tem a capacidade de produzir diferentes compostos bioativos dentre eles enzimas extra-celulares, como quitinase, peptinases, queratinases e proteases (Nagpure *et al.*, 2012; Brzezinska *et al.*, 2013).

As proteases são enzimas hidrolíticas que apresentam a capacidade de hidrolisar proteínas em aminoácidos e peptídeos. Dentro das proteases destaca-se as enzimas fibrinolíticas, que tem a capacidade de hidrolisar a fibrina, proteína responsável pela formação de trombos (Sales *et al.*, 2013).

Essas enzimas fibrinolíticas já foram identificadas em veneno de cobra (De Simone *et al.*, 2005; He *et al.*, 2007; Cintra *et al.*, 2012), anelídeos (Wang *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2013), do látex da planta medicinal *Euphorbia hirta* (Patel *et al.*, 2012) e em micro-organismos, *Bionectria* sp e *Candida guilliermondii* (Rovati *et al.*, 2010; Rashad *et al.*, 2012), *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Lu *et al.*, 2010; Mahajan *et al.*, 2012; Raj *et al.*, 2012) e *Streptomyces* sp. (Mander *et al.*, 2011; Simkhada *et al.*, 2010).

Um dos obstáculos para a inserção de produtos biotecnológicos na indústria farmacêutica é o custo dos processos de purificação que usualmente é realizada por cromatografia ou precipitação. No entanto, são procedimentos relativamente caros, apresentam baixos rendimentos e não é adequado para larga escala (NEVES *et al.*, 2012). Alternativamente, o sistema de duas fases aquosas (SDFA) é utilizado para separação e purificação de diferentes compostos biológicos, como as proteases, a aceitação da utilização do SDFA para este procedimento é devido as suas vantagens como, curto tempo de experimento, de fácil operação e aumento de escala, ambiente favorável para a enzima por conter maior quantidade de água e o

equilíbrio de partição é atingido facilmente (Porto *et al.*, 2007; Rodríguez-Durán *et al.*, 2013; Sales *et al.*, 2013).

O SDFA é formado quando combinações de polímero/polímero ou polímero/sal inorgânico ou orgânico/água apresentam incompatibilidade em solução aquosa acima de certas concentrações críticas e temperatura, resultando no sistema de duas fases aquosas imiscíveis (PORTO *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho foi verificar a melhor condição para produção de protease fibrinolítica pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, assim como a extração da protease de interesse por sistema de duas fases aquosas PEG/MgSO₄.

Material e Métodos

Reagentes

O polietileno glicol (PEG) com massa molar de 4000, 6000 e 8000 (g/mol) e sulfato de magnésio (MgSO₄) foram obtido de Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os reagentes químicos foram de grau analítico.

Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 isolado de líquens da Região Amazônica encontra-se na coleção de cultura do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas-DPUA. A linhagem estudada foi armazenada durante todo este trabalho em criotubos contendo glicerol 10 % (v/v) a -20°C.

Meios de Cultura

Para a produção de protease fibrinolítica foi utilizado o meio MS-2 (Porto *et al.*, 1996) que consiste farinha de soja (concentração determinada pelo planejamento fatorial), MgSO₄.7H₂O, 0,1 % (p/v) NH₄Cl, 0,435 % (p/v) K₂HPO₄ e 0,1 mL de solução mineral (FeSO₄.7H₂O 100 mg, MnCl₂.4H₂O , ZnSO₄.H₂O , 100 mL, água destilada com pH inicial de 7,0) e com pH inicial 7,2 esterilizado em autoclave

a 1 atm por 20 minutos em 121°C. *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi mantido e reativado utilizando meio de cultura ISP-2 (Pridham *et al.*, 1957).

Planejamento fatorial para produção de protease fibrinolítica

Foi utilizado uma matriz de um planejamento fatorial 2^4 com 4 pontos centrais, conforme a Tabela 1, considerando tendo como variáveis independentes, temperatura (28; 32 ; 37°C), agitação (150; 200; 250 rpm), concentração de farinha de soja (0,5; 1,0; 1,5 %) e de glicose (0; 0,5; 1 g/L) e como variável resposta, os valores de atividade fibrinolítica.

Tabela 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^4 na produção de protease fibrinolítica.

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central	Maior (+1)
Farinha de soja (%)	0,5	1	1,5
Glicose (g/L)	0	0,5	1
Rotação (rpm)	150	200	250
Temperatura (°C)	28	32	37

Todos os resultados foram analisados estatisticamente com auxílio do Software *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc, 2008).

Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada a cada 24 horas até 120 horas de fermentação por peso seco. O conteúdo do frasco foi filtrado em de papel filtro seco previamente pesado, em seguida o papel de filtro juntamente com a massa celular foi levado em micro-ondas na potência baixa por 10 minutos (Olsson e Nielsen, 1997).

Determinação da atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica foi analisada de acordo com a metodologia de Wang *et al* (2011), consiste inicialmente por uma solução composta de 0,4 mL de fibrinogênio a 0,72 % juntamente com 0,1 mL de solução trombina a 20 U ml⁻¹. Sendo esta solução incubada a 37°C por 10 minutos. Logo após foi adicionado 0,1 mL de caldo fermentado livre de células e a incubação continuou a 37°C por 60 minutos. A mistura da reação foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi avaliado por espectrofotômetro. A unidade de atividade enzimática (1 U-unidade de degradação da fibrina) é definida como um aumento de 0,01/min na absorbância a 275 nm da solução de reação.

Determinação da atividade proteolítica utilizando substrato específico

A metodologia utilizada foi Alencar *et al.* (2003) no qual utiliza substratos específicos para enzima uroquinase (Gly-Arg-p-nitroanilide dihydrochloride) e quimiotripsina (N-Succiny-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide), todos com uma concentração final de 0,6 mM. Foram inseridos 30µL de substrato específico, 140µL de Tris-HCl 0,1M e 30µL do caldo fermentado em uma microplaca, em seguida foi incubada estufa a 37°C por 15 minutos. Com a mudança da coloração para o tom amarelado confirma-se a liberação do composto nitroanilina.

Preparação do sistema de duas fases aquosas

Primeiramente, foi preparada uma solução concentrada a 30 % (m/m) do sal sulfato de magnésio (MgSO₄) em diferentes pH (6; 7 e 8) e com auxílio do tampão fosfato o pH do S DFA. Uma determinada quantidade utilizada da solução

mencionada anteriormente foi misturada, em tubos graduados cônicos de 15 mL, com PEG a 40 % (m/m) e a água para uma massa final de 10 g, em seguida foram misturados com auxílio do vórtex. Os sistemas após montados foram mantidos em banho-maria por 24 horas na temperatura de 30°C. Posteriormente foi inserido 20 % (m/m) do líquido metabólito livre de células e agitado em vórtex por 1 minuto. Após a separação das fases espontaneamente por 1 hora, os volumes das fases foram medidos e as mesmas foram coletadas com auxílio de um pipetador para posterior determinação da concentração de proteína total e atividade fibrinolítica.

Determinação da proteína total

A concentração da proteína total foi realizada segundo a metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Planejamento fatorial para sistema de suas fases aquosas PEG/MgSO₄

A influência das variáveis independentes concentração do sal (MgSO₄) e PEG (C_{PEG}), massa molar do PEG (M_{PEG}) e pH sobre as variáveis resposta, índice de recuperação (Y) e coeficiente de partição (K) foram analisados pelo planejamento fatorial 2⁴ (Tabela 2), com quatro pontos centrais. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica 8,0.

Tabela 2. Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial 2⁴ PEG/sulfato de magnésio

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central	Maior (+1)
Massa molar PEG (g/mol)	4000	6000	8000
Concentração do PEG (%)	20	24	28
Concentração do sal (%)	10	15	20
pH	6	7	8

Determinação do coeficiente de partição e recuperação

O coeficiente de partição (K) de cada ensaio do sistema de duas fases aquosas foi determinado pela expressão que consiste na atividade fibrinolítica da fase superior pela fase inferior em U/mL.

$$K = \frac{A_s}{A_i}$$

Onde: A_s = atividade da enzima fibrinolítica na fase superior (U/mL); A_i = atividade da enzima fibrinolítica na fase inferior (U/mL)

O índice de recuperação (Y) de cada ensaio foi determinado pela atividade fibrinolítica da fase multiplicada pelo seu volume dividido pela atividade fibrinolítica do caldo fermentado multiplicado pelo seu volume.

$$Y = \frac{(A_{Fs} \cdot V_s)}{(A_{Fi} \cdot V_i)} \times 100$$

Onde: A_{Fs} e A_{Fi} são as atividades da enzima fibrinolítica na fase superior (U/mL) e extrato bruto, respectivamente; V_s e o volume da fase superior e V_i volume do extrato bruto (mL).

Resultados e Discussão

Nos resultados do planejamento fatorial para a seleção da melhor condição de produção pode se observado na Tabela 3 onde as interações das variáveis independentes, concentração da fonte de carbono (glicose) temperatura e agitação apresentaram um efeito positivo (Figura 1), podendo ressaltar que glicose foi a única variável independente que apresentou significância estatística (Figura 2), a interação das variáveis concentração da farinha de soja e temperatura apresentou estatisticamente efeito negativo, no qual ao aumentar a concentração da fonte de nitrogênio (farinha de soja) e diminuir a temperatura oferecerá condições para obter maior produção de proteases fibrinolítica, todavia a fonte de nitrogênio é o precursor de proteínas.

Como demonstrado na Figura 3, os menores valores das variáveis independentes agitação e temperatura e os maiores valores de concentração de farinha de soja e glicose (150 rpm, 28°C, 1,5 %, 1 g/L, respectivamente) foi obtivo maior valor em atividade fibrinolítica (835 U/mL).

Gesheva (2009) estudando a linhagem *Streptomyces rimosus* para produção de protease fibrinolítica, utilizou um meio de produção contendo 1% farinha de soja e 10 g/L glicose e obteve 800 U/mL de protease fibrinolítica, semelhante os valores obtidos neste trabalho obteve-se 835 U/mL, no qual quanto maior a concentração de farinha de soja maior atividade, no entanto a concentração de glicose (1 g/L) utilizada neste trabalho é inferior em comparação ao autor citado acima.

Observando o efeito da temperatura, Naveena *et al.* (2012) que estudaram actinobactérias marinhas avaliando a interferência da temperatura (30; 35; 40°C), na produção da enzima trombinase, obteve-se na temperatura 35°C um maior valor de atividade fibrinolítica (8,34 U/mL). E no estudo realizado por Bhavani *et al.* (2012) com a linhagem mutante *Streptomyces venezuelae* em diferentes temperaturas (20°C – 60°C) sendo 40°C a melhor para a produção de protease fibrinolítica apresentando atividade de 16 U/mL. No entanto, a temperatura selecionada neste trabalho foi 28°C e segundo a análise estatística em menor nível de temperatura ocorrerá maiores valores em atividade fibrinolítica, o oposto observado nos trabalhos citamos acima, tendo temperaturas elevadas e baixa atividade fibrinolítica.

Na Figura 4 pode-se observar que o melhor tempo de produção foi 48 horas obtendo 835 U/mL de protease fibrinolítica, no entanto na pesquisa de Naveena *et al.* (2012) estudando a linhagem *Streptomyces venezuelae* utilizando como substrato para o meio de produção resíduo de lactose e avaliando tempo de produção selecionou o tempo de 99 horas, tendo 10 U/mL de protease fibrinolítica, portanto a linhagem trabalhada nesta pesquisa (*Streptomyces parvulus* DPUA 1573) produziu em menor tempo e obteve oito vezes maior em valor de atividade fibrinolítica em comparação aos autores acima.

Foi verificado que protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 apresenta especificidade semelhante à enzima quimiotripsina. Choi *et al.* (2011) pesquisando enzima fibrinolítica extraída de corpos de frutificação do *Cordyceps militaris* também verificou que ação específica para o substrato N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, que a caracteriza como uma quimiotripsina.

O comportamento de partição da enzima fibrinolítica no sistema de duas fases PEG/MgSO₄ está apresentado na Tabela 4. A Figura 5 mostra o gráfico de pareto representando os efeitos das variáveis independentes e os efeitos das suas combinações, nele pode-se verificar que as variáveis foram significativas, sendo a

interação da massa molar e concentração do PEG e pH a que obteve maior efeito positivo, ou seja, o efeito foi produzido quando ocorreu uma mudança de níveis dos fatores que dependem do nível de outro fator.

O aumento da concentração do PEG teve efeito positivo sobre a purificação da protease fibrinolítica, enquanto a concentração do sulfato de magnésio foi de terceira ordem com efeito negativo. Todavia quando há um aumento na massa molar e concentração do polímero que estão presentes no SDFA pode aumentar a área de contato entre proteína e os componentes do sistema pode modificar o coeficiente de partição da biomolécula.

O fenômeno mencionado acima acontece quando há um aumento no C_{PEG} e diminuição em M_{PEG} ocorrer uma força repulsiva na partição da protease fibrinolítica, levando a uma diminuição do coeficiente de partição. Contudo, de acordo com a Figura 5 pode-se visualizar que as variáveis independentes concentração e massa molar do PEG mostram um efeito positivo e negativo, respectivamente.

A protease fibrinolítica foi particionada tanto para fase inferior como superior, pois em quinze ensaios os valores de coeficiente de partição foram menores que 1 e cinco maiores que 1. Em todos os ensaios do planejamento foi obtida atividade fibrinolítica entre 20 e 207,05 U/ml, conforme a Tabela 2.

O ensaio que apresentou maior atividade fibrinolítica foi com maior concentração de sal e pH 8 tendo o valor de 207,5 U/mL e com índice de recuperação de 747 %. Segundo Karkas; Önal (2012), afirma que sais de sulfato tem uma capacidade de promover interações hidrofóbicas entre as proteínas. Várias enzimas também foram particionada e purificada com sucesso por meio de diferentes concentrações de PEG/MgSO₄.

No trabalho de Pandey et al. (2011) estudando a partição da enzima fibrinolítica produzida por *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 de acordo com o coeficiente de partição selecionou o pH 7,5. O pH elevado (neutro ou ligeiramente alcalino) pode aumentar o valor de particionamento. No caso da protease fibrinolítica deste trabalho o pH 8 foi o mais adequado.

Conclusão

Pode ser concluído que a linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi capaz de produzir protease fibrinolítica em todos os ensaios, no entanto o ensaio

que apresentou maiores concentrações de farinha de soja e glicose e menores níveis de temperatura e agitação obteve maior produção da enzima de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da RENORBIO-CNPq, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Referências

Balielo FN, Silva-Junior CA, Mario NL, Montaldi T, Bariani MH, Filadelpho AL, (2007) Tromboflebite jugular equina (TJE). *Revista Científica de Medicina Veterinária*.

Bhavani B, Naveena B, Partha N, (2012) Strain Improvement of *Streptomyces venezuelae* for Enhanced Fibrinolytic Enzyme Production. *Advanced Materials Research* v. 584 p. 440-444.

Brzezinska MS, Jankiewicz U, Lisiecki K, (2013) Optimization of Cultural Conditions for the Production of Antifungal Chitinase by *Streptomyces Sporovirgulis* 1. *Applied Biochemistry and Microbiology* v. 49, n. 2, p. 154–159.

Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakamib MT, Sampaio SV, (2012) Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* v. 60 p. 70–82.

Cunico MWM, Cunico MM, Miguel OG, Zawadzki SF, Peralta-Zamora P, Volpato N, (2008) Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.9, n.1.

Deepak V, Ilangovan S, Sampathkumar MV, Victoria, MJ, Pasha, SPBS, Pandian SBRK.; Gurunathan S, (2010) Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from *Bacillus cereus* NK1 on PHB nanoparticles. *Enzyme and Microbiology Technology* v. 47 p. 297–304.

De-Simone SG, Correa-Netto C, Antunes OAC, De-Alencastro RB, Silva Jr FP, (2005) Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two p-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. *Journal of Chromatography B*, v. 822 p. 1–9.

El-Shafei HA, Abdel-Aziz MS, Ghaly MF, Abdalla AAH, (2010) Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Streptomyces albidoflavus*. *Proceeding of fifth scientific environmental conference, Zagazig uni.*, p. 125 – 142.

Gesheva, V.,(2009). Production of Fibrinolytic Enzyme by *Streptomyces rimosus* at Conditions of Nitrogen Limitation. Journal of Microbial & Biochemical Technology. v. 1.

He J, Chen S, Gu J, (2007) Identification and characterization of Harobin, a novel fibrino(geno)lytic serine protease from a sea snake (*Lapemis hardwickii*). FEBS Letters v. 581 p. 2965–2973

Hussni CA, dormbusch PT, Yoshida, WB, Alves ALG, Nicoletti JLM, Mamprim MJ, Vulcano IC, (2009) Trombectomia com cateter de Fogarty no tratamento da tromboflebite jugular experimental em equinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. v 29. p. 45-51.

Lee SY, Kim J-S, Kim J-E, Sapkota K, Shen M-H, Kim S, Chun HS, Yoo J-C, Choi H-S, Kim M-K, Kim S-J , (2005) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. Protein Expression and Purification v. 43 p. 10–17.

Lu F, Lu Z, Bie X, Yao Z, Wang Y, Lu Y, Guo Y, (2010) Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. Thrombosis Research v. 126 p. 349–355

Mahajan PM, Nayak S, Lele SS, (2012) Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization. Journal of Bioscience and Bioengineering v 113 (3) p. 307–314.

Mukherjee S, Das P, Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. Trends in Biotechnology v.24 (11).

Naveena B, Gopinath KP, Sakthiselvan P, Partha N, (2012) Enhanced production of thrombinase by *Streptomyces venezuelae*: Kinetic studies on growth and enzyme production of mutant strain. Bioresource Technology v.111 p. 417–424.

Naveena B, Sakthiselvan P, Elaiyaraju P, Partha N, (2012) Ultrasound induced production of thrombinase by marine actinomycetes: Kinetic and optimization studies. Biochemical Engineering Journal v.61 p. 34– 42.

Park JW, Park JE, Choi HK, Jung TW, Yoonb SM, Lee JS, (2013) Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriiformia tentaculata*. Process Biochemistry. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.017>

Patel GK, Kawale AA, Sharma AK, (2012). Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta* .Plant Physiology and Biochemistry v.52 p.104 -111

Porto ALF, Campos-Takaki GM., Lima Filho JL, (1996) Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. Applied Biochemistry Biotechnology, v.60, p.115-122.

Pridham TG, Aderson P, Foley C, Lindenfelser LA, Hesseltine CW, Benedict RGA, (1957). Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. *Antibiot. M.* p.947-953.

Raj A, Khess N, Pujari N, Bhattacharya S, Das J, Rajan SS, (2012) Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* p. 1845-1851.

Rashad MM, Mahmoud AE, Al-Kashef AS, Nooman MU, (2012) Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme by *Candida guilliermondii* Grown on Sunflower Oil Cake. *Journal of Applied Sciences Research*, v. 8(2): p. 635-645.

Rovati JI, Delgado OD, Figueiroa, LIC, Farina JI, (2012) A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria* sp., an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina). *World J Microbiol Biotechnol* (2010) 26:55–62.

Statsoft Inc. STATISTICA (2008) (data analysis software systems) version 8.0.

Wang S, Deng Z, Ge X, Bo Q, Liu J, Cui J, Jiang X, Liu J, Zhang L, Hong M, (2011) A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* v. 159 p. 18–25.

Wang S-L, Wu Y-Y, Liang T-W, (2011) Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnology* v. 28 (2).

Tabela 3. Resultado da atividade fibrinolítica na matriz do planejamento fatorial 2^4 no tempo de 48 horas de fermentação produzidas pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

Ensaio	Soja (%)	Glicose (g/L)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Fibrinolítica U/mL
1	0,5	0	28	150	632,5
2	1,5	0	28	150	655
3	0,5	1	28	150	752,5
4	1,5	1	28	150	835
5	0,5	0	37	150	822,5
6	1,5	0	37	150	662,5
7	0,5	1	37	150	667,5
8	1,5	1	37	150	702,5
9	0,5	0	28	250	677,5
10	1,5	0	28	250	732,5
11	0,5	1	28	250	625
12	1,5	1	28	250	772,5
13	0,5	0	37	250	692,5
14	1,5	0	37	250	685
15	0,5	1	37	250	727,5
16	1,5	1	37	250	747,5
17 C	1	0,5	32	200	680
18 C	1	0,5	32	200	672,5
19 C	1	0,5	32	200	697,5
20 C	1	0,5	32	200	655

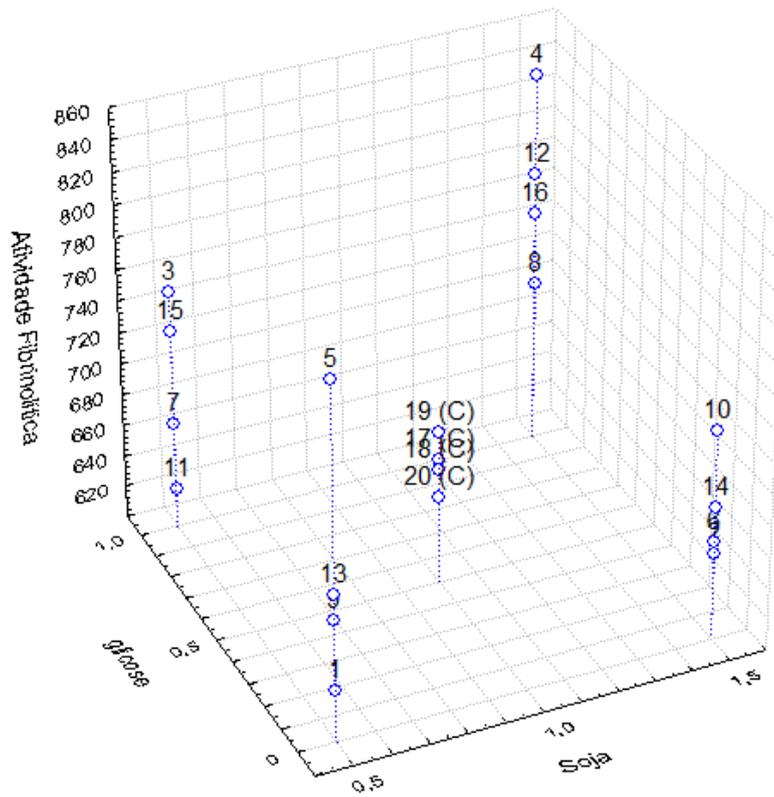


Figura 1. Demonstração do efeito simultâneo das variáveis independentes, farinha de soja e glicose na atividade fibrinolítica em 48 horas de fermentação produzida pela bactéria *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

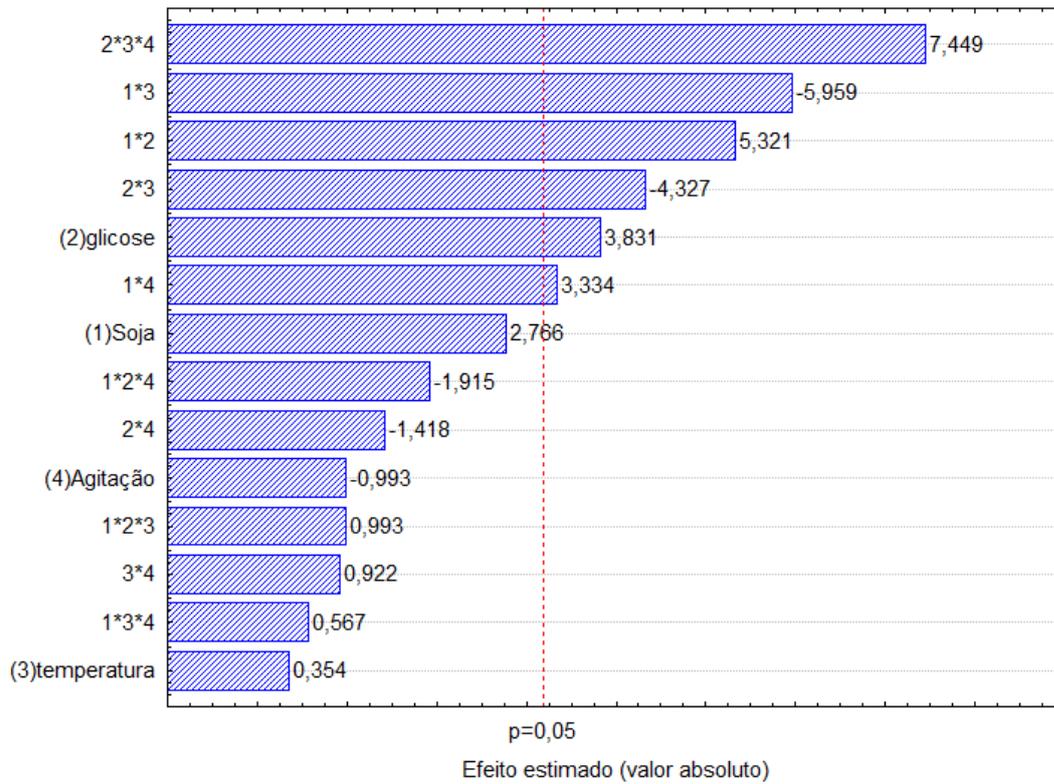


Figura 2. Gráfico de pareto demonstrando os efeitos das variáveis independentes na produção de protease fibrinolítica pelo micro-organismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

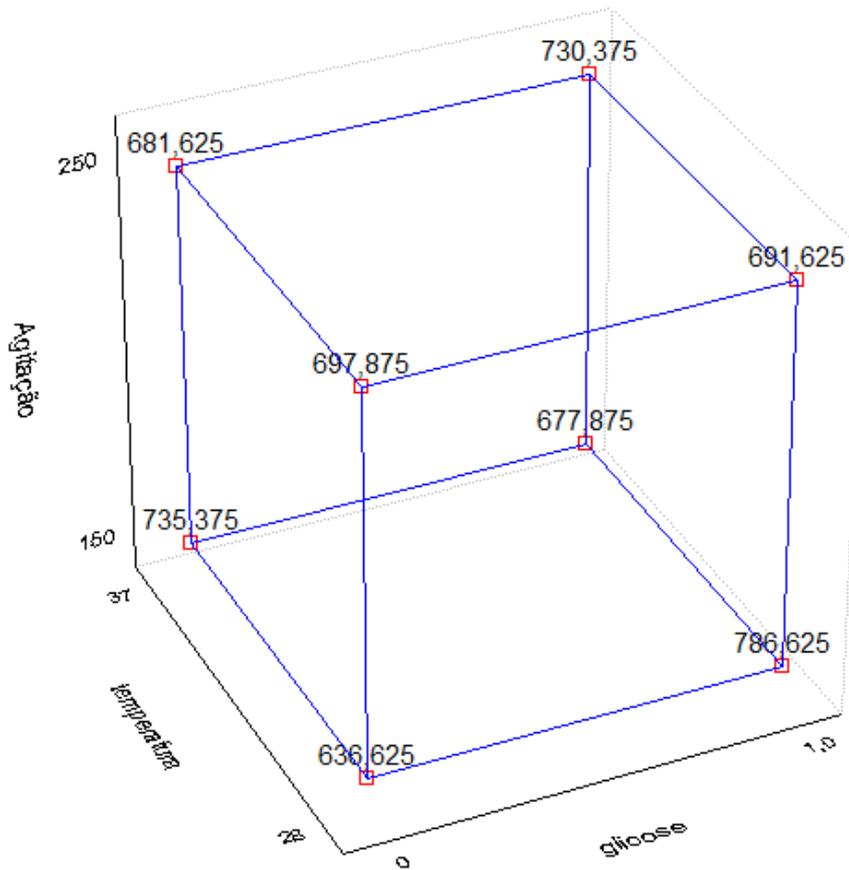


Figura 3. Gráfico cubo representando o efeito da interação das três variáveis independentes (concentração de glicose, temperatura e agitação) na produção de protease fibrinolítica pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

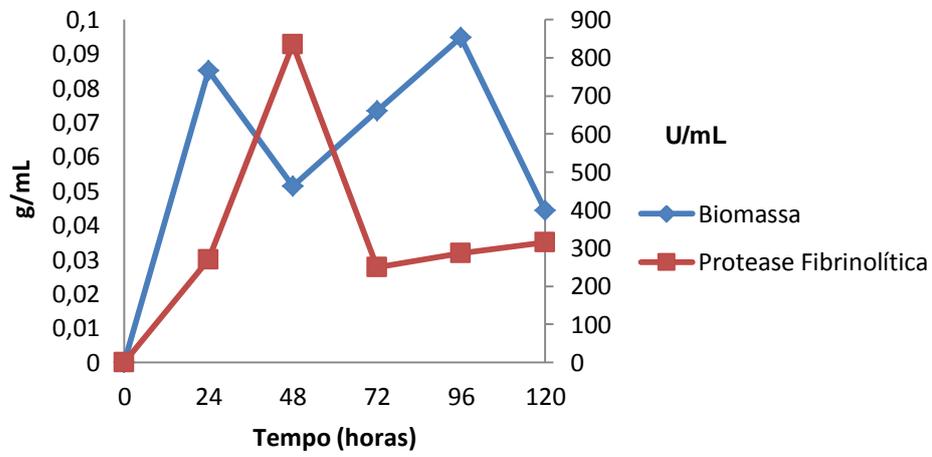


Figura 4. Gráfico demonstrando a curva de crescimento e produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

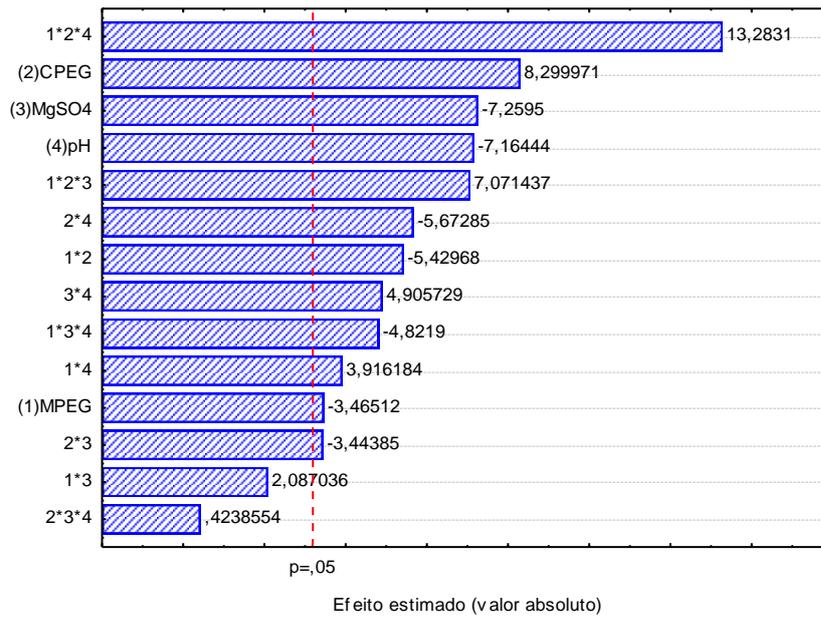


Figura 5. Gráfico de Pareto demonstrando os efeitos das variáveis independentes sobre o coeficiente de partição (K) na extração utilizando sistema duas fases PEG/MgSO₄ de protease fibrinolítica.

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial 2^4 com os resultados da extração de protease fibrinolítica utilizando o sistema de duas fases PEG/ $MgSO_4$

Ensaio	M_{PEG} (g/mol^{-1})	C_{PEG} (%)	$MgSO_4$ (%)	pH	K	Y_P (%)	Y_S (%)	AF_S (U/mL)	AF_I (U/mL)
1	4000	20	10	6	0,288	221	236	42,5	147,5
2	8000	20	10	6	2,500	260	48	50	20
3	4000	28	10	6	6,420	630	35	112,5	17,5
4	8000	28	10	6	0,277	780	288	130	180
5	4000	20	20	6	0,100	27	270	7,5	75
6	8000	20	20	6	0,650	261	396	72,5	110
7	4000	28	20	6	1,950	492	126	102,5	52,5
8	8000	28	20	6	1,270	207	126	57,5	45
9	4000	20	10	8	0,920	299	125	57,5	62,5
10	8000	20	10	8	0,407	143	162	27,5	67,5
11	4000	28	10	8	0,700	476	240	85	120
12	8000	28	10	8	2,000	468	90	90	45
13	4000	20	20	8	1,393	414	297	115	82,5
14	8000	20	20	8	0,096	72	747	20	207,5
15	4000	28	20	8	0,327	209	406	47,5	145
16	8000	28	20	8	1,066	176	105	40	37,5
17 - (C)	6000	24	15	7	0,156	156	498	32,5	207,5
18 - (C)	6000	24	15	7	0,750	231	168	52,5	70
19 - (C)	6000	24	15	7	0,386	204	308	42,5	110
20 - (C)	6000	24	15	7	0,409	216	308	45	110

M_{PEG} - Massa molecular do PEG

C_{PEG} - Concentração do PEG

Y_P - recuperação PEG

Y_S - recuperação do SAL

K - coeficiente de partição

AF_S - Atividade fibrinolítica da fase superior

AF_I - Atividade fibrinolítica da fase inferior

CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ Na determinação da atividade antimicrobiana frente a bactérias multirresistentes pela seleção por bloco de gelose foi selecionado a linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573;
- ❖ A melhor condição para a produção dos metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana pela linhagem *Streptomyces parvulus*. DPUA 1573 foi o cultivo submerso a 37°C em 250 rpm no meio de produção MS-2 em todas as concentrações de farinha de soja e glicose estudadas .
- ❖ O tempo de 72 horas de fermentação apresentou atividade antimicrobiana frente a todas as bactérias multirresistentes;
- ❖ A produção do ácido clavulânico ocorreu a partir de 72 horas de fermentação, no entanto a maior concentração (269,84 mg/L) foi com 96 horas de fermentação em concentrações de farinha de soja e glicose de 1,5% e 1g/L respectivamente;
- ❖ Os resultados em relação à produção de protease fibrinolítica demonstram que ela foi produzida em todos os ensaios, porém a condição que apresenta maior nível de farinha de soja e glicose obteve maior valor em atividade (835 U/mL);
- ❖ Na extração da protease pelo SDFa obteve-se maior valor em atividade fibrinolítica na fase sal de 207,5 U/mL, no ensaio com menor coeficiente de partição ($K=0,096$) e um índice de recuperação em atividade de 747%.

ANEXOS

Normas do periódico: Pesquisa Brasileira Veterinária



Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação. Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final,

ao autor para correspondência. 1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título,

ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando,

sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas: a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas

de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso; e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Normas do periódico Brazilian Journal of Microbiology



Preparation of a manuscript

The manuscript should be submitted as **one single WORD file**. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)
- References

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The lines in each page of the manuscript should be numbered too. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting

journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens.* Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology - an introduction.* ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental.* São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these

cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURES: should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

PHOTOGRAPHS: Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflicts of Interest

It is Brazilian Journal of Microbiology policy that everyone involved in the publication process (authors, reviewers, editorial board members, and editorial staff) must be free from conflicts of interest that could adversely influence their judgment, objectivity or loyalty to the article and assignments. The BJM recognizes that any potential conflict of interest raised must be disclosed promptly to Editor. Conflicts of interest in publishing can be defined as conditions in which an individual holds conflicting or competing interests that could bias editorial decisions. Conflicts of interest may be only potential or perceived, or they may be factual. Personal,

political, financial, academic, or religious considerations can affect objectivity in numerous ways.

AUTHORS' COPYRIGHT

Upon receipt of the galley proofs for approval, authors of approved manuscripts should fax or email the Author's Copyright Statement to the BJM (55-11-3037-7095, bjm@sbmicrobiologia.org.br). The statement (see text below) must be signed by at least one of the authors (who agrees to inform the other authors, if any).