



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Otimização do processo fermentativo para produção do antibiótico nigericina por  
*Streptomyces*”**

**André Luiz Scridelli Silva**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:  
**Química.**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Otimização do processo fermentativo para produção do antibiótico nigericina por  
*Streptomyces*”**

**André Luiz Scridelli Silva**

**Orientador:** Luiz Alberto Beraldo de Moraes

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, André Luiz Scridelli Silva

Otimização do processo fermentativo para produção do antibiótico nigericina por *Streptomyces*.

Ribeirão Preto, 2014.

110 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: **Química**.

Orientador: de Moraes, Luiz Alberto Beraldo.

1. Nigericina. 2. Streptomyces. 3. LC-MS.

## Folha de Aprovação

André Luiz Scridelli Silva

“Otimização do processo fermentativo para produção do antibiótico nigericina por *Streptomyces*.”

Aprovado em:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*“Eu quero! Eu posso! E, eu vou conseguir!”  
(autor desconhecido)*

## ***Dedicatória***

À Deus e a Jesus nosso mestre;

A fonte da minha base, da minha estrutura e da minha felicidade: Pai, Mãe e Irmã!

Ao meu orientador e amigo, que sempre me deu bons conselhos, e liberdade para as minhas escolhas

Aos meus amigos Eduardo, Ana P., Ana F., Tahuanna, Fernandinha, Tânia, Geraldo, Izadora, Lais, Osvaldo, Jacqueline, Fernanda, Lucas e Anelize pela amizade e cumplicidade em todos os momentos;

Aos meus padrinhos, tios, primos Kléber, Ataíde e Hilton, e aos demais parentes que sempre me apoiaram e me incentivaram;

Aos meus amigos Willian, Thais, Franco, Haroldo, Jéssica, Anderson, Fernanda, Daniel, Gustavo, André, Bruno, Naidel, Wesley, Wilian, Thiago, Renato, Rafael, Kengo;

## ***Agradecimentos***

Ao meu orientador pelos ensinamentos, conselhos, paciência, amizade, respeito e momentos alegres durante esses mais de 6 anos de convivência;

A Ana Paula que sempre ajudou durante todo este trabalho;

Ao Eduardo pelas análises, e principalmente pela amizade durante esses anos;

A Ana Flavia e a Tânia, que foram como coorientadoras me ajudando desde a iniciação científica;

Aos profs., Dr. Luis Gustavo Dias e a Dra. Carmen Lúcia Cardoso pelas sugestões no exame de qualificação;

Ao Daniel Previdi e o Prof Dr. Paulo Marcos Donate pelas  $\gamma$ -butirolactonas usadas neste trabalho;

Ao técnico Dijalma pelas análises e, pela amizade desde o primeiro ano da graduação;

Ao CNPq

A FAPESP

A CAPS





## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>2</b>
1.1 Metabólitos secundários produzidos de microrganismos com atividade antibiótica.....	2
1.2 Actinobactérias do gênero <i>Streptomyces</i> produtoras de antibióticos.....	4
1.3 Antibióticos poliéteres ionóforos produzidos por <i>Streptomyces</i> .....	7
1.4 O antibiótico nigericina.....	10
1.5 A importância da biotecnologia para produção de antibióticos de origem microbiana .....	13
1.6 Espectrometria de Massas acelerando o isolamento e identificação de compostos ativos .....	13
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>20</b>
2.1 Objetivos gerais .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
<b>3. Parte Experimental</b> .....	<b>22</b>
3.1 Materiais utilizados .....	22
3.1.1 Equipamentos.....	22
3.1.2 Solventes e reagentes .....	23
3.2 Metodologias cromatográficas e espectrométricas .....	23
3.3 Metodologia .....	24
3.3.1 <i>Cultivo das actinobactérias e obtenção dos extratos brutos para monitoramento da produção de nigericina.....</i> <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
3.3.2 <i>Preparo dos meios de cultivo</i> .....	24
3.4 Planejamento fatorial de experimentos .....	26
3.4.1 <i>Otimização das condições de pH do meio e temperatura de fermentação, utilizando planejamento fatorial 3<sup>k</sup></i> .....	26
3.4.2 <i>Superfície de resposta</i> .....	28

3.5 Curva de crescimento para determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção de nigericina .....	28
3.6 Avaliação da influência da adição de $\gamma$ -butirolactonas sintéticas ao meio Czapeck nas condições já otimizadas, na produção de nigericina .....	29
3.7 Fermentação em diferentes volumes .....	32
3.8 Avaliação da influência na variação dos nutrientes do meio de cultivo, para a produção de nigericina .....	32
3.9 Teste de resíduos agroindustriais como meios de cultivo para produção de nigericina .....	32
3.10 Teste de bioensaio da nigericina contra bactérias da mastite .....	32
<b>4 Resultados e Discussão .....</b>	<b>38</b>
4.1 Monitoramento da presença de nigericina nos extratos brutos produzidos pelas actinobactérias EUCAL 26 e 74 em diferentes meios .....	38
4.2 Determinação das melhores condições de pH do meio e temperatura de fermentação para produção de nigericina em meio Czapeck <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
4.3 Determinação do período de fermentação para a máxima produção de nigericina em meio Czapeck em pH 7 e temperatura de 25 °C .....	45
4.4 Avaliação da influência da adição de $\gamma$ -butirolactonas sintéticas ao meio Czapeck nas condições já otimizadas, na produção de nigericina .....	51
4.5 Otimização do aumento de escala ( <i>scale up</i> ) de fermentação .....	58
4.6 Avaliação da influência na variação dos nutrientes do meio de cultivo Czapeck, na produção de nigericina.....	61
4.7 Teste de resíduos agroindustriais como meios de cultivo para produção de nigericina.. .....	64
4.8 Bioensaios antimicrobianos da nigericina contra bactérias da mastite. ...	67
4.9 Outros bioensaios realizados com o extrato bruto produzido pela da EUCAL 26 em meio Czapeck.. .....	71
4.10 Identificação da espécie da actinobactéria EUCAL 26.. .....	75
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>77</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>80</b>

## Resumo

SILVA, A. L. S. Otimização do Processo Fermentativo para Produção do Antibiótico Nigericina por *Streptomyces*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* com atividade antibiótica apresentam relevante importância biotecnológica para as indústrias farmacêuticas e agroquímicas. Dentre estes metabólitos, podemos destacar a nigericina, um antibiótico poliéter usado como aditivo em ração animal atuando como promotor de crescimento e no tratamento de algumas doenças, como a malária, em carcinoma nasofaríngeo, a vaccínia, entre outras. Neste trabalho foram avaliadas duas cepas de actinobactérias potenciais produtoras de nigericina, a EUCAL 26 e a EUCAL 74. As duas actinobactérias foram fermentadas em cinco meios de cultivo diferentes (BD, Czapek, ISP2, M29 e TSB). A cepa EUCAL 26 foi a mais promissora na produção de nigericina em meio Czapek. A partir da EUCAL 26, foi feito um estudo da máxima produção de nigericina em meio Czapek variando o pH do meio, temperatura de fermentação, e período de fermentação. As melhores condições encontradas foram em pH 7,0 a 25 °C por 27 dias. Foi realizado também um estudo de otimização de aumento de escala de fermentação, de um volume de meio Czapek de 50 mL, para um volume de 4 L. Também foram avaliados dois resíduos agroindustriais (Farmal e Melaço de Soja) para a produção de nigericina. O meio de Melaço de Soja aumentou a produção em aproximadamente 300x quando comparado com o meio Czapek padrão. Os efeitos dos nutrientes do meio Czapek também foram avaliados. A retirada do  $K_2HPO_4$  do meio produziu um aumento de 50x na produção de nigericina, quando comparado com o meio Czapek controle. Também foi avaliado o efeito da adição de  $\gamma$ -butirolactonas sintéticas, moléculas de sinalização hormonal, para a produção de nigericina. Das 15  $\gamma$ -butirolactonas testadas, a DP21A foi a mais eficiente, pois além de aumentar a produção de nigericina em 23x, também diminuiu o período máximo de sua produção. Todas as análises realizadas neste trabalho para o monitoramento da produção de nigericina, foram feitas empregando a espectrometria de massas sequencial acoplada à cromatografia líquida de ultra eficiência.

## Abstract

SILVA, A. L. S. Optimization of the Production of Antibiotic Nigericin by *Streptomyces*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Secondary metabolites produced by *Streptomyces* with antibiotic activity have significant biotechnological importance for the pharmaceutical and agrochemical industries. Among them, nigericin stands out as an antibiotic polyether used as growth promoter in animal feed and for treatment of some diseases such as malaria, nasopharyngeal carcinoma, and vaccinia. In this study, two actinobacteria strains considered potential producers of nigericin named EUCAL 26 and 74 were tested. The two actinobacteria were fermented in five different culture media (BD, Czapek, ISP2, M29 and TSB). EUCAL 26 strain was the most promising in producing nigericin in amid Czapeck media. For EUCAL 26, a study of maximum production of nigericin in Czapek medium at varying the pH, fermentation temperature and fermentation period have been performed. As a result, the best conditions were pH 7.0, at 25 °C for 27 days. In addition, an optimization study for scale-up fermentation have been done, where a volume of 50 mL Czapeck medium have been expanded to 4 L, in order to obtain the highest production of nigericin. Two agroindustrial residues (FARMAL and Honey Soy) have also been evaluated for nigericin production. The honey soy medium increased nigericin production in the rate of 300 when compared with standard Czapeck medium. The effects of nutrients from Czapeck medium have also been evaluated. Removal of  $K_2HPO_4$  from culture medium resulted in an increase of 50 times when compared with the control Czapeck medium. The effect of adding synthetics  $\gamma$ -butyrolactones (hormone signaling molecules) for the production of nigericin have also been evaluated. From 15 tested  $\gamma$ -butyrolactones, DP21A was the most efficient. In addition to increase nigericin yield in 23x it also reduced the period for its maximum production. All analyzes performed in this study to monitor the nigericin production were performed using tandem mass spectrometry coupled to ultra high performance liquid chromatography.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura química dos primeiros antibióticos descobertos produzidos por *Streptomyces*, Estreptotricina F (1942) e Estreptomicina (1944)..... 5
- Figura 2.** Os principais antibióticos produzidos de origem microbiana, desde a década de 1940, destacando o gênero *Streptomyces* como a principal fonte de antibióticos nos últimos anos.. ..... 6
- Figura 3.** Estruturas químicas de seis poliéteres ionóforos, monensina, lasalocida, isolasalocida, ionomicina, eteromicina e cationomicina.. ..... 8
- Figura 4.** Estrutura química da nigericina sódica..... 11
- Figura 5.** Representação da biossíntese do poliéter Monensina A. .... 13
- Figura 6.** Representação de como os discos de papel de filtro são distribuídos na placa de Petri, cada numero representa a concentração da solução a ser testada, onde o 1 é a de 1mg/mL, o 2 a de 500 µg/mL, o 3 a de 250 µg/mL, o 4 a de 125 µg/mL e o 5 a de 62,5 µg/mL. .... 35
- Figura 7.** Estrutura química da nigericina sodiada  $[C_{40}H_{68}O_{11}+Na]^+$ . .... 38
- Figura 8.** Espectros de ID-MS dos extratos brutos obtidos da actinobactéria EUCAL 26 fermentada nos meios (a) M29, (b) TSB, (c) Czapeck, (d) ISP 2 e (e) BD..... 38
- Figura 9.** (a) LC-MS do padrão de nigericina (m/z 747) e (b) LC-MS do extrato bruto da fermentação em pH 7 a temperatura de 25 °C. .... 42
- Figura 10.** (a) Superfície de resposta e (b) curva de nível dos dados da Tabela 05. .... 43
- Figura 11.** Espectro de MS/MS padrão de nigericina (valor de energia 25 eV). .... 45
- Figura 12.** Proposta de fragmentação para a formação do íon produto m/z 657.. ..... 46
- Figura 13.** Cromatogramas de UPLC-MS em modo MRM, dos extratos brutos das fermentações retiradas após (a) um dia, (b) três dias, (c) seis dias e (d) oito dias de fermentação, as áreas do sinal de nigericina estão marcadas nos cromatogramas. .... 48
- Figura 14.** Curva de produção de nigericina: área por tempo de fermentação.49
- Figura 15.** Estrutura química de  $\gamma$ -butirolactonas isoladas de *Streptomyces*: Fator-A, IM-2, Fator-I e VB-C..... 51
- Figura 16.** Curvas de produção de nigericina de área por tempo de fermentação: (a) primeira etapa de  $\gamma$ -butirolactonas testadas e (b) segunda etapa de  $\gamma$ -butirolactonas testadas (cada número representa uma  $\gamma$ -butirolactona, como mostra a Tabela 06)..... 52
- Figura 17.** Estruturas químicas das  $\gamma$ -butirolactonas DPM84B e Fator-A. ..**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 18.** Curvas de produção de nigericina de área por tempo de fermentação: (a) primeira etapa de aumento de escala em Erlenmeyer de 125

mL, (b) segunda etapa de aumento de escala em Erlenmeyer de 1 L e (c) terceira etapa de aumento de escala em Balão de fermentação de 6 L. ....	58
<b>Figura 19.</b> Coparação das áreas de nigericina dos extratos dos 7 meios testados, Controle (Czapeck) e Czapeck sem: Sacarose, $K_2HPO_4$ , $MgSO_4$ , KCl, $FeSO_4$ e $NaNO_3$ . ....	61
<b>Figura 20.</b> Espectro de ID-MS do extrato bruto do meio de cultivo de “Melaço de Soja” .....	65
<b>Figura 21.</b> Bioensaios usando soluções de padrão de nigericina e monensina, extrato bruto e extrato purificado contra 5 tipos de bactérias da mastite: (a) 42, (b) 97, (c) 211, (d) 212 e (e) 213. ....	69

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Composição dos padrões da escala McFarland e respectivas equivalência para contagem de bactérias.....**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 2** - Descrição da composição dos meios de cultivo líquido empregados na análise de perfil metabólico.....**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 3** - Solução de sais inorgânicos utilizado no preparo dos meios de cultivo ISP-3, ISP-4, ISP-5 e ISP7 .....**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 4** - Diâmetro dos halos de inibição observados para diferentes extratos de actinobactérias frente às *M. avium*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis*.....**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 5** - Massas e fórmulas moleculares obtidas através de FT-ICR para os compostos ativos presentes no extrato bruto EUCAL**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 6** - Massas e fórmulas moleculares obtidas através de FT-ICR para os compostos ativos presentes no extrato bruto EUCAL**Erro! Indicador não definido.**

**Tabela 7** - Halos de inibição determinados no ensaio de bioautografia direta para os extratos brutos da actinobactéria CAAT 6-3 provenientes da fermentação de diferentes meios de cultivo .....**Erro! Indicador não definido.**

## Lista de Abreviaturas

- BDA** - Meio de cultivo batata-dextrose agar
- GC-MS** - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
- DMSO** - dimetilsulfóxido
- ESI** - espectrometria de massas com fonte de ionização por *electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*
- HPLC** - cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- ID-MS** - espectrometria de massas por inserção direta
- ISP-2** - meio de cultivo agar malte levedura
- LC-MS** - cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*
- m/z** - razão massa-carga
- MeOH** - Álcool Metílico
- MS** - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
- PCR** - reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- REMA** - do inglês *Resazurin Microtiter Assay*
- rpm** - rotações por minuto
- TSB** - meio de cultivo caldo trípico de soja, do inglês *Tryptic Soy Broth*
- UPLC** - cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*
- ACN** - Acetonitrila
- CID** - Dissociação induzida por colisão
- MRM** - Monitoramento de reações múltiplas



# Introdução

## 1. Introdução

### 1.1 Metabólitos secundários produzidos de microrganismos com atividade antibiótica

Produtos naturais de origem microbiana, em geral metabólitos secundários, vêm sendo uma importante fonte de substâncias, para descoberta de novas drogas, pois possui uma grande diversidade de moléculas.<sup>1</sup> A grande maioria dos medicamentos utilizados atualmente foram isolados a partir de produtos naturais ou de compostos derivados de produtos naturais.<sup>2</sup> A partir da descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1929, produtos naturais de origem microbiana vêm sendo as principais fontes de novos fármacos antibacterianos, os antibióticos.<sup>3</sup>

Em pouco mais de 80 anos, foram descobertas diversas classes de compostos com atividade antimicrobiana, como as tetraciclínas, as cefalosporinas, os glicopeptídeos, os macrolídeos, dentre outros. Muitos produtos naturais e seus derivados desempenham um papel de destaque na medicina, sendo responsável por dois terços das novas terapias antibióticas aprovadas entre 1980 e 2010.<sup>3-5</sup>

As prescrições de antibióticos inadequados ou sem necessidade, o uso excessivo de antibióticos nas indústrias agropecuárias, e a falta de adesão do paciente ao tratamento completo com o antibiótico prescrito, são os principais fatores para a seleção de bactérias com maior resistência a antibióticos. Por causa do aumento da ameaça de agentes patogênicos resistentes a múltiplas drogas, há uma grande necessidade de se desenvolver e descobrir novas drogas para terapias antibacterianas. Apesar do sucesso da descoberta de

novos antibióticos, e os avanços no processo de sua produção, as doenças infecciosas continuam sendo a segunda principal causa de morte no mundo, causando aproximadamente 17 milhões de mortes por ano, afetando principalmente crianças e idosos.<sup>6,7</sup>

Apesar dos produtos naturais serem uma fonte promissora, a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas antibióticas por grandes empresas farmacêuticas, têm diminuído ao longo das últimas duas décadas. As empresas com programas de descoberta de novos antibióticos estão diminuindo gradualmente esses esforços.<sup>8</sup> O baixo interesse no desenvolvimento de novos antibióticos pelas grandes indústrias farmacêuticas está relacionado com a saturação do mercado, pois novos alvos terapêuticos são escassos, e a obtenção da aprovação regulatória é cada vez mais difícil.<sup>9</sup> Curiosamente, este cenário abriu um espaço no mercado de antibióticos, fazendo com que pequenas empresas de biotecnologia pudessem se inovar e competir no mercado de antióticos. Por exemplo, em 1995, as 10 maiores empresas farmacêuticas tinha apenas 3 tipos de antibióticos em desenvolvimento clínico, em comparação com 17 compostos sendo desenvolvidos pelas indústrias de biotecnologia.<sup>10</sup> Contudo, o desenvolvimento da maioria dos novos antibióticos, têm surgido através da alteração sintética de drogas já existentes, para melhorar a eficácia, reduzir a resistência, e minimizar a toxicidade.<sup>9</sup>

Em geral, os metabólitos secundários com atividade antibiótica são produzidos por microrganismos, como os fungos, nos quais o gênero *Penicillium* sp. e *Cephalosporium* spp. são os mais conhecidos.<sup>11</sup> No entanto, as actinobactérias são os microrganismos estudados com maior frequência como fonte produtora de compostos bioativos, o gênero *Streptomyces* é de

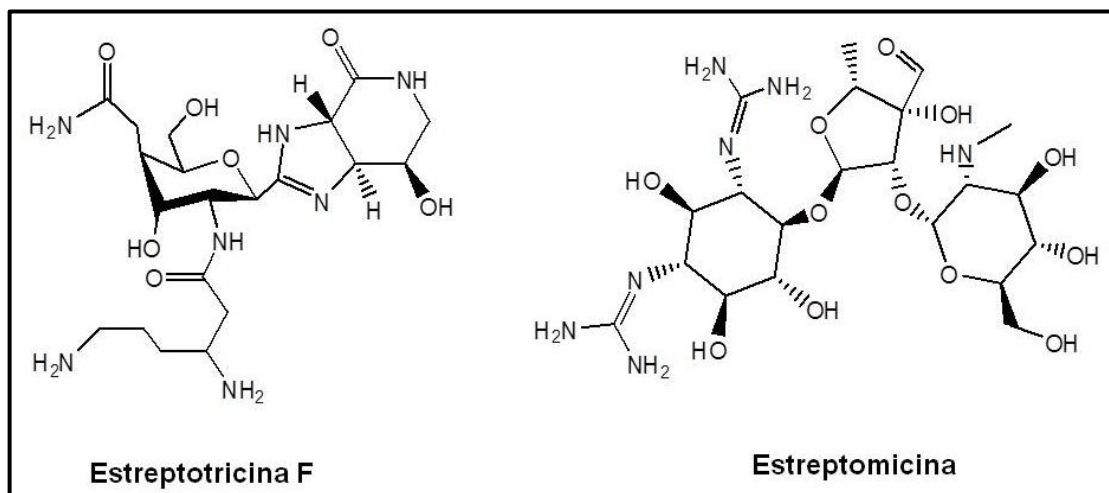
grande valor para a biotecnologia, especialmente devido a sua importância na produção de antibióticos.<sup>3</sup>

## 1.2. Actinobactérias do gênero *Streptomyces* produtoras de antibióticos

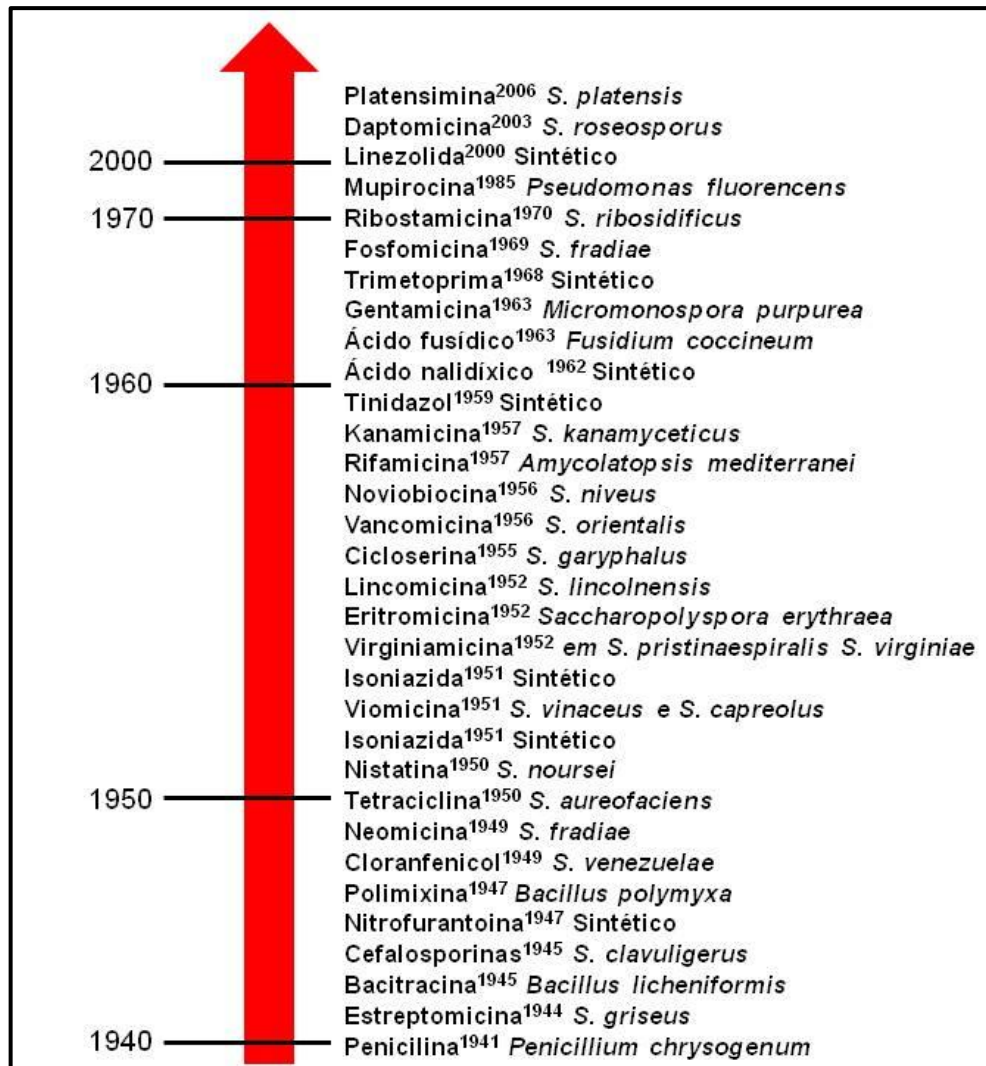
As actinobactérias são microrganismos isolados dos solos, principalmente em solos ricos de matéria orgânica.<sup>12</sup> *Streptomyces* é um gênero de bactérias Gram-positivas, que crescem em diversos ambientes, com uma forma semelhante à de fungos filamentosos. A diferenciação morfológica de *Streptomyces* envolve a formação de uma camada de hifas que podem diferenciar-se em uma cadeia de esporos. Este processo é único entre as bactérias Gram-positivas, pois requer um metabolismo especializado e coordenado. A propriedade mais interessante do gênero *Streptomyces*, está na sua capacidade de produzir metabolitos secundários bioativos, tais como antifúngicos, antivirais, antitumoral, anti-hipertensivos, imunossupressores, e principalmente antibióticos.<sup>13</sup>

A produção da maioria dos antibióticos é específica da espécie, e estes metabolitos secundários são usados pelas *Streptomyces* como mecanismo de defesa contra outros tipos de microrganismos, ou até mesmo do mesmo gênero. Outro processo importante que envolve a produção de antibióticos é a simbiose entre *Streptomyces* e plantas, como o antibiótico protege a planta contra patógenos externos, os nutrientes liberados pelas plantas permite o desenvolvimento das actinobactérias *Streptomyces*.<sup>14</sup> O primeiro antibiótico derivado de *Streptomyces* descoberto foi a estreptotricina em 1942, isolado a partir da actinobactéria *Streptomyces lavendulae*.<sup>7</sup> Dois anos mais tarde, isolou-

se a actinobactéria *S. griseus* produtora do antibiótico estreptomicina (Figura 1). A *S. griseus* foi à primeira espécie de *Streptomyces* a ser usada para a produção industrial de um antibiótico, e é uma espécie bastante estudada até os dias de hoje. Cerca de 80% dos antibióticos produzidos industrialmente são originados a partir do gênero *Streptomyces*, tornando as actinobactérias as mais importantes fontes de antibióticos microbianos.<sup>15</sup>



**Figura 1.** Estrutura química dos primeiros antibióticos descobertos produzidos por *Streptomyces*, Estreptotricina F (1942) e Estreptomicina (1944).

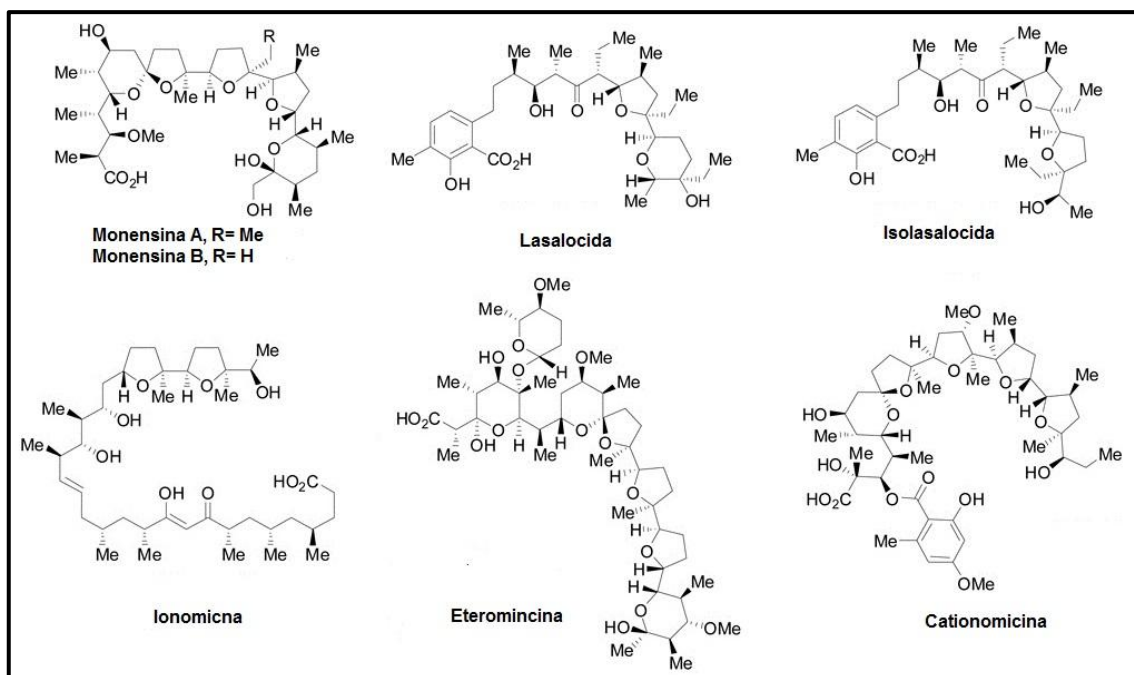


**Figura 2.** Os principais antibióticos produzidos de origem microbiana, desde a década de 1940, destacando o gênero *Streptomyces* como a principal fonte de antibióticos nos últimos anos.<sup>15</sup>

Além das classes apresentadas na Figura 2, outra classe de antibióticos produzidos *Streptomyces*, são os poliéteres ionóforos, comercializados ao redor do mundo, pelas indústrias agropecuárias, empregados como aditivos em rações, servindo como promotores de crescimento para aves e ruminantes.<sup>16</sup>

### 1.3 Antibióticos poliéteres ionóforos produzidos por *Streptomyces*

Historicamente os antibióticos poliéteres tiveram origem em 1951, quando dois compostos foram isolados de diferentes linhagens de *Streptomyces*, a nigericina e a lasalocida, produzidas pelas *S. hygroscopicus* e *S. lasaliensis* respectivamente. Desde então, mais de 50 microrganismos deste gênero produtores de poliéteres ionóforos foram descobertos. Mais de 120 estruturas foram relatadas para esta classe de compostos (Figura 3).<sup>17</sup> O termo ionóforo foi utilizado pela primeira vez em 1967, e se refere à capacidade de moléculas orgânicas em se ligarem a cátions metálicos e formarem complexos lipossolúveis dinamicamente reversíveis, que facilita o transporte de íons através das membranas celulares. Os ionóforos podem se difundir a partir do espaço extracelular para o espaço intracelular, e voltarem para o espaço extracelular, ou podem permanecer na membrana plasmática.<sup>18</sup> A atividade ionófora pode alterar os gradientes normais de concentração, resultando em um desequilíbrio no fluxo eletro-osmótico da célula, alteração do pH, sobrecarga de cálcio, e ruptura das membranas plasmáticas. A alteração no transporte de íons através das membranas é a base para os efeitos funcionais desta classe de compostos.<sup>19</sup>



**Figura 3.** Estruturas químicas de seis poliéteres ionóforos, monensina, lasalocida, isolasalocida, ionomicina, eteromicina e cationomicina.

Do ponto de vista químico, esses poliéteres são moléculas ricas em átomos de oxigênio, que estão presentes em uma variedade de grupos funcionais da estrutura. Eles contêm sempre um grupo carboxílico, anéis tetrahidropirano e tetrahidrofurano, hidroxilas e grupo cetona. Estes grupos desempenham um papel significativo no processo de coordenação de um cátion metálico monovalente, por exemplo, a monensina, ou de um cátion bivalente, no caso da lasalocida.<sup>20</sup> O conhecimento dos diferentes mecanismos de transporte de íons por antibióticos ionóforos são necessários para compreender plenamente o mecanismo de ação destes compostos, devido à capacidade dos ionóforos de transportarem cátions através das membranas celulares.<sup>21</sup>

Desta classe de antibióticos ionóforos, a monensina, lasalocida, salinomicina, narasina, maduramicina, laidlomicina e semduramicina são comercializados ao redor do mundo pelas indústrias agropecuárias, para uso



como medicamentos promotores de crescimento em aves e ruminantes.<sup>22</sup> Estes antibióticos exercem uma atividade significativa na flora microbiana intestinal na maioria das espécies de aves e ruminantes, pois possuem uma potente atividade contra bactérias do tipo Gram-positivas. Essas bactérias estão presentes na flora intestinal, e produzem os ácidos acético e butírico, que causam um baixo rendimento energético na digestão de alimentos, e são causadoras do excesso de gás metano liberado por ruminantes. Além disso, esses ácidos inibem o crescimento de bactérias Gram-negativas que auxiliam na digestão.

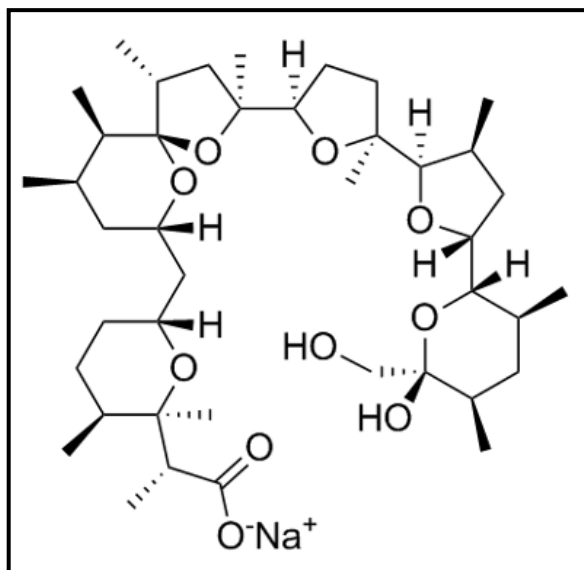
Assim, com a ação desses antibióticos, há uma inibição no crescimento dessas bactérias Gram-positivas, gerando um aumento na população de bactérias Gram-negativas, que produzem o ácido propiônico, que melhora bastante o rendimento energético da digestão, e diminui a produção de gás metano durante a digestão em ruminantes.<sup>23,24</sup>

Esta atividade antibiótica resulta na melhoria do metabolismo digestivo, gerando um aumento na absorção de uma série de nutrientes essenciais, incluindo carboidratos, aminoácidos, proteínas, sais minerais e vitaminas, e como resultado, os animais necessitam de uma quantidade menor de alimentos suplementados, mostrando a grande importância desses antibióticos na agropecuária como promotores de crescimento.<sup>23</sup> Países como os Estados Unidos e Austrália permitem o uso desses antibióticos apenas na agropecuária como aditivos promotores de crescimentos, já a União Europeia permite que os ionóforos sejam usados em tratamentos médicos, e não somente como promotores de crescimento animal.<sup>16</sup>

Além das propriedades antibióticas, os ionóforos também são aplicados como antiparasitários tornando-se úteis contra coccidiose em aves e ruminantes. Esta é uma doença parasitária, que causa diarreia, perda de peso e, por vezes, até a morte devido a uma inflamação no intestino delgado, um grande problema que atinge as granjas aviárias e a pecuária intensiva. Eles também apresentam outras atividades interessantes como antifúngicos, antiparasitários, antimaláricos, antivirais, anti-inflamatória e atividade citotóxica em células cancerosas.<sup>25</sup>

#### 1.4 O antibiótico nigericina

A nigericina (também conhecida como antibiótico K-178, helexina C, azalomicina M, antibiótico X-464 e polieterina A) foi um dos primeiros poliéteres ionóforos a serem isolados no ano de 1951, a partir da actinobactéria *Streptomyces hygrosopicus*.<sup>26</sup> A nigericina é um ionóforo carboxílico que exerce diversos efeitos potentes sobre as células por meio de sua capacidade de quelar seletivamente íons metálicos e transportá-los através das membranas celulares, por esse motivo a nigericina pode interromper o potencial de membrana e estimular a atividade ATPase em mitocôndrias, desacoplando a fosforilação oxidativa e impedindo a acumulo de  $K^+$  e fosfato inorgânico, sendo este o principal mecanismo de ação contra bactérias Gram-positivas, micobactérias e algumas espécies de fungos.<sup>25,27,28</sup>

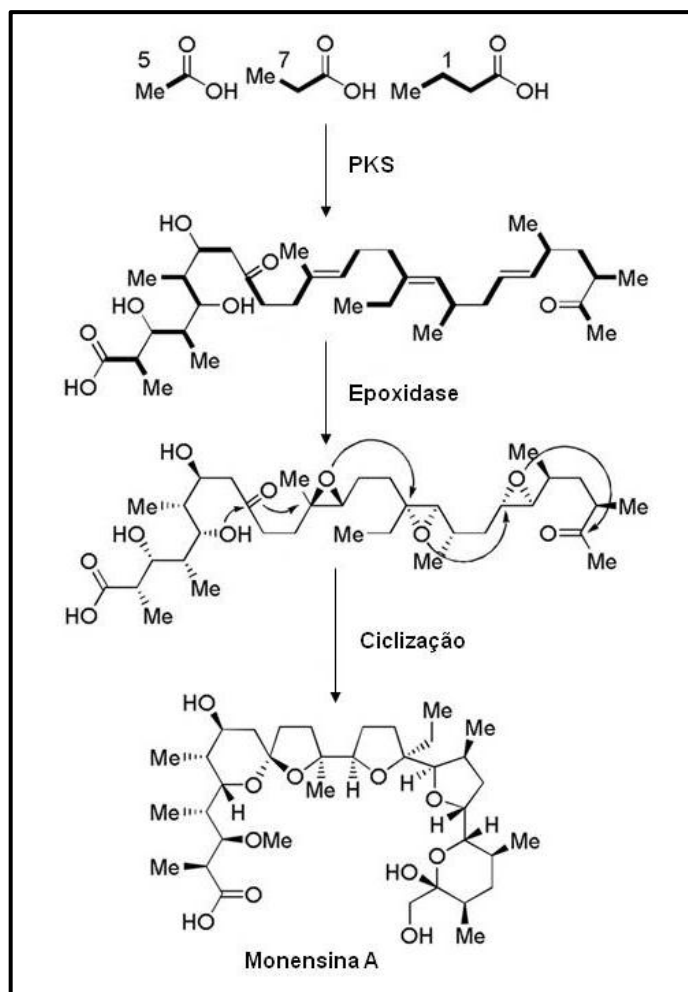


**Figura 4.** Estrutura química da nigericina sódica.

Estudos mostram que além de atividade antibiótica, a nigericina apresenta outros tipos de atividades, como por exemplo, antimalária, apresentando uma potente atividade contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, em relação à cloroquina, fármaco bastante usado no tratamento de malária.<sup>29</sup> A nigericina também apresenta uma potente atividade antiviral, contra o vírus vaccinia, também conhecido como varíola da vaca, vírus este de DNA complexo que apresenta atividade patogênica em humanos e animais, o mecanismo de ação da nigericina contra esse vírus ocorre inibindo sua transcrição precoce do gene e na replicação do DNA. Assim, a expressão de proteínas do vírus vaccinia é comprometida na presença de nigericina.<sup>30</sup> Pesquisas mostram que a nigericina apresenta uma importante atividade contra células-tronco cancerosas em carcinoma de nasofaringeo, que é um dos piores tipos de tumores de cabeça e pescoço, a nigericina age como um inibidor seletivo nas chamadas células estaminais cancerosas (CECs), que são células que possuem a capacidade de autorrenovação e conduz à produção de linhagens heterogêneas de células cancerosas que compõem o tumor, essas

células são resistentes a muitos tratamentos atuais contra o câncer, incluindo quimioterapia e radioterapia, com a inibição causada pela nigericina essas células não conseguem se autorrenovarem, e acabam morrendo, assim a nigericina se mostra bastante promissora como uma nova droga quimioterápica.<sup>31</sup>

Até a alguns anos atrás pouco se sabia sobre a biossíntese de antibióticos poliéteres como a nigericina, porém houve muitas publicações sobre o assunto. Em 1983 Cane e Westley propuseram que os poliéteres são derivados de um polieno precursor, produzida num tipo clássico de via de policetídeo sintase do tipo I (PKS-I), a partir de cinco acetatos, sete propionatos, e uma unidade de butirato, esse polieno é oxidado para um poliepóxido correspondente. Este poliepóxido sofre uma adição nucleofílica da hidroxila do C5 para a cetona em C9 formando um hemicetal que desencadeia uma cascata de abertura sequencial dos anéis de epóxido para formar o poliéter final, como apresentado na Figura 5.<sup>32,33</sup>



**Figura 5.** Representação da biossíntese do poliéter Monensina A.

### 1.5 A importância da biotecnologia para produção de antibióticos de origem microbiana

Com necessidade de novas terapias antibacterianas e a grande importância dos microrganismos para produção de antibióticos, a biotecnologia se mostra uma área da ciência promissora para descoberta de novas fontes de antibióticos, no melhoramento da produção e nos mecanismos de ação das classes de antibióticos já existentes, pois mesmo através vias metabólicas

complexas, é possível diminuir o número de etapas necessárias para a obtenção do antibiótico alvo, tornando a sua produção mais rápida.<sup>34</sup>

Pesquisas nas áreas de síntese orgânica e biotecnologia vêm sendo intensas, para a produção de produtos naturais e seus análogos de forma barata e eficiente, e compreender os detalhes das vias biossintéticas de produtos naturais é a chave para alcançar esse objetivo. Aproximadamente 700 agrupamentos de genes de biossíntese de produtos naturais de bactérias e fungos, muitos dos quais codificam compostos antibióticos, estão sendo clonados e sequenciados e esta situação levou à elucidação funcional de muitas das etapas biossintéticas comuns da biossíntese de produtos naturais exemplo, a via biossintética das policetídeos sintase do tipo I e do tipo II (PKS-I e PKS-II, respectivamente), e as polipeptídeos sintetase não ribossômica (NRPS).<sup>35,36</sup>

A biossíntese de produtos naturais combinada com bioengenharia permite abordagens químicas para a construção de análogos de produtos naturais. Já a biossíntese dirigida por precursor, onde um organismo produtor é alimentado por compostos sintéticos que mimetizam um intermediário biossintético, continua sendo uma estratégia eficaz para a geração de análogos de produtos naturais.<sup>37,38</sup> Actinobactérias do gênero *Streptomyces*, produtoras de antibióticos, possui uma característica bastante interessante que é a capacidade de produzir moléculas de sinalização hormonal. Esta classe de moléculas de sinalização para produção de antibióticos são chamadas de  $\gamma$ -butirolactonas autoreguladoras.<sup>39</sup> Estudos da adição de  $\gamma$ -butirolactonas sintéticas ao meio de cultivo mostrou um aumento na produção do antibiótico virginamicina, produzidos por *Streptomyces virginiae*.<sup>40</sup>

Os antibióticos de origem microbiana são sintetizados por vários caminhos ou rotas biossintéticas alternativas e também por espécies geneticamente distintas, e sua produção pode ser influenciada por diferentes condições ambientais, bem como por alguns parâmetros de fermentação tais como: temperatura, agitação, pH do meio, período de fermentação, além dos meios de cultivo, onde os nutrientes podem ser modificados visando ampliar a quantidade e a classe do antibiótico produzido, pois o mesmo microrganismo pode produzir diversas classes de compostos variando essas condições de fermentação.<sup>41</sup> Planejamentos experimentais para otimização destes fatores implicam em um melhoramento da produção de um metabolito alvo. Modelos estatísticos como planejamento fatorial e análise de superfície de resposta, podem ser usados para avaliar os efeitos de vários tipos de fatores que influenciam nas respostas do metabolito alvo. Variando simultaneamente esses fatores e minimizando o número de experimentos realizados, obtendo-se assim resultados mais rápidos e uma boa resposta no aumento da produção do composto alvo.<sup>42</sup>

A biotecnologia apresenta uma relevante importância sobre o desenvolvimento de novas ferramentas de pesquisa para a descoberta de novos produtos naturais e para o melhoramento da produção dos mesmos, à medida que novas tecnologias baseadas em biologia estão sendo desenvolvidas e integradas as pesquisas na área de biologia-química.<sup>43</sup> O planejamento fatorial de experimentos é uma técnica bastante utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes. Esta metodologia permite uma combinação com todas as variáveis em todos os níveis (baixo, médio e alto) de um processo, são extremamente úteis para se determinar o número de

experimentos a serem realizados, e para medir a influência de uma ou mais variável na resposta de um processo. Existem alguns tipos de planejamento fatorial como,  $2^k$ ,  $3^k$  e  $2^{k-1}$  (onde  $k$  é o número de fatores, e 2 ou 3 são os números de níveis), cada um é usado para um determinado número de fatores a serem estudados, o resultado desta conta fornece o número de experimentos a serem realizados. Por exemplo, precisa-se avaliar o efeito da variação do pH do meio e da temperatura de fermentação, na produção de um antibiótico por um determinado microrganismo. O número de fatores dos experimentos é igual a 2 (pH e temperatura), o efeito destes fatores será avaliado em dois níveis de valores (baixo e alto). O planejamento fatorial indicado para este estudo é o  $2^k$ , sendo  $k=2$ , tem-se  $2^2 = 4$ , portanto 4 experimentos serão realizados.<sup>44</sup>

### 1.5 A Espectrometria de Massas acelerando o isolamento e identificação de compostos ativos

A química de produtos naturais possui uma grande diversidade de compostos com estruturas desde as mais simples até as mais complexas. Conseqüentemente, o desenvolvimento de produtos naturais para novas aplicações está repleto de desafios, desde a extração até a comercialização. Inicialmente, o processo de obtenção de extratos a partir das respectivas fontes naturais resulta em misturas complexas de diversos compostos. A identificação e quantificação destes compostos apresenta um desafio significativo, pois é essencial, tanto para a caracterização inicial do produto natural, quanto para o controle de qualidade de extrações subsequentes.<sup>45</sup>



Desta forma, é importante a busca por métodos rápidos, diretos e aplicáveis, para a elucidação estrutural de misturas complexas como os de extratos brutos de processos de fermentação.<sup>46</sup> Neste contexto, existem inúmeras abordagens de desreplicação analíticas, em cada qual tendo sua própria vantagem em termos de escala, sensibilidade e resolução. A abordagem mais comum utiliza sistemas de banco de dados metabolômicos adaptadas para encontrar novos ou conhecidos compostos, quer utilizando perfis de absorvância de UV, os tempos de retenção de cromatografias líquidas de alto desempenho (HPLC), ou através da inclusão de dados de espectrometria de massas (MS) e espectrometria de massas sequencial (MS/MS, MS<sup>n</sup>) usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de (LC-MS).<sup>47</sup>

As técnicas de LC-MS e LC-MS/MS com fontes de ionização por *eletrospray* (ESI) são importantes no processo de desreplicação, pois misturas complexas de metabolitos secundários necessitam muitas vezes de separação cromatográfica, devido a diversos compostos que provocam supressão iônica nas análises por MS, moléculas que se ionizam mais facilmente acabam suprimindo sinais de compostos que possuem um potencial de ionização menor. Assim, essas análises de MS fornecem dados importantes como a massa molecular dos analitos e características estruturais dos mesmos através dos estudos de MS/MS, mesmo em baixas concentrações na amostra.<sup>48,49</sup>

As análises de LC-MS detectam uma ampla variedade de analitos, devido a sua técnica de ionização branda (ESI), e a separação e detecção de macromoléculas, moléculas neutras e polares, é possível através do LC, utilizando diversas colunas de fase estacionária como a HILIC, C8 e C18.<sup>50</sup>

Quando já se tem um analito alvo, a técnica de LC-MS/MS se mostra poderosa ferramenta para as análises quantitativas e de monitoramento, pois oferece várias vantagens como melhorias consideráveis na sensibilidade e seletividade analítica, devido às análises de espectrometria de massas sequencial (MS/MS), que permite a detecção específica de uma substância utilizando tanto um íon precursor que gera íons produtos, através da dissociação induzida por colisão, o que diminui o nível de ruído, elimina possíveis interferentes, e melhora o limite de detecção da análise, este modo de análise é chamado de monitoramento de reações múltiplas (MRM).<sup>51,52</sup> Com o desenvolvimento crescente de materiais particulados para colunas cromatográficas, permitiu o desenvolvimento de uma nova tecnologia de separação cromatográfica, a cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC), que permite a separação satisfatória, boa resolução, sensibilidade, e grande rapidez de detecção em amostras biológicas complexas. O UPLC juntamente com a MS (UPLC-MS), tornou-se uma ferramenta de primeira escolha para identificar e quantificar simultaneamente misturas complexas presentes em extratos brutos de origem microbiana ou de plantas.<sup>53,54</sup>

# Objetivos

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar as melhores condições do processo fermentativo para produção do antibiótico nigericina, produzido pela actinobactéria EUCAL 26, isoladas da rizosfera de eucalipto. Essa otimização foi realizada, variando os meios de cultivo, o pH do meio, a temperatura e período de fermentação. Foram aplicadas técnicas modernas em espectrometria de massas no processo de monitoramento da nigericina presente nos extratos brutos produzidos pelas actinobactérias em cada etapa do desenvolvimento deste trabalho.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos meios de cultivo (BD, Czapek, ISP2, M29 e TSB) na produção de nigericina pelas actinobactérias EUCAL 26 e EUCAL 74;
- Desenvolver um planejamento fatorial, variando pH do meio e temperatura de fermentação, para otimizar as melhores condições dos mesmos para a produção de nigericina;
- Determinar o período da máxima produção de nigericina, nas condições já otimizadas, de meio de cultivo, pH do meio e temperatura de fermentação;
- Avaliar a influência da adição de  $\gamma$ -butirolactonas ao meio de cultivo nas condições já otimizadas, na produção de nigericina;
- Avaliar a influência na variação dos nutrientes do meio de cultivo Czapeck, na produção de nigericina;
- Testar resíduos agroindustriais como meios de cultivo, para a produção de nigericina;

# Parte Experimental

### 3. Parte Experimental

#### 3.1 Materiais utilizados

##### 3.1.1 Equipamentos

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Capela de Fluxo Laminar;
- Incubadora refrigerada Marconi modelo MA 830.
- Evaporador rotativo Waterbath B-840 Buchi;
- Evaporador centrífugo Speed-Vac 100 ECH Univapo.
- Balança analítica FA2104N;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas LC-MS 1200 L Triplo Quadrupolo (Varian) equipado com fonte de ionização por *electrospray* operado em modo positivo. Os parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de massa foram: voltagem do capilar 3,2 kV, voltagem do cone 40 V, temperatura da fonte 40 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C e varredura para análise em modo *full scan* na faixa de massas de  $m/z$  450 a 1200.
- Cromatógrafo líquido Acquity-UPLC™ acoplado a espectrômetro de massas Xevo TQ-S (Waters) equipado com fonte de ionização por *electrospray* operada em modo positivo para as análises de ID-MS e UPLC-MS. Os parâmetros operacionais utilizados foram: voltagem do capilar 3,5 kV, voltagem do cone 45 V, energia de colisão de 35 eV, temperatura da fonte 50 °C, temperatura de dessolvatação 300 °C e

varredura para análise em modo *full scan* na faixa de massas de  $m/z$  50 a 800.

### 3.1.2 Solventes e reagentes

Foram utilizados os solventes acetato de etila, grau analítico (Synth) para extração dos meios de cultivo; metanol e acetonitrila grau HPLC adquirido da J. T. Baker e água ultrapura obtida de sistema Milli-Q Merck nos experimentos empregando LC e MS, bem como metanol grau LC-MS da Sigma-Aldrich.

### 3.2 Metodologias cromatográficas e espectrométricas

- Cromatografia de permeação em gel foi realizada em coluna aberta de vidro de 40 x 5 cm empregando como fase estacionária Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich e acetonitrila como fase móvel;
- As análises por inserção direta em espectrômetro de massas (ID-MS) foram realizadas através de injeção da amostra, em um sistema HPLC sem coluna cromatográfica, em fluxo de 0,1 mL.min<sup>-1</sup> de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), aditivados com 0,1% de ácido fórmico.
- As condições cromatográficas empregadas nas análises de LC-MS foram: coluna C18 (Phenomenex, 4,6 x 250 mm, 5 μm), gradiente de 80 a 98% MeOH em água ultrapura aditivados de 0,1% de ácido fórmico, por 40 minutos, mantendo-se 98% de MeOH até o final da corrida em 75 minutos, com fluxo de e 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e divisor de fluxo (split) 7:3 antecedente a interface LC-MS e coluna.

- As duas condições cromatográficas empregadas nas análises de UPLC-MS foram: coluna C8 X-Terra (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ), (a) gradiente de 25% de água ultrapura aditivada de 0,1% de acetato de amônio e 75% MeOH, até 2 minutos, 3% de água e 97% MeOH, até 6 minutos, e mantendo-se 75% de MeOH até o final da corrida em 10 minutos, com fluxo de e 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. (b) gradiente de 25% de água ultrapura aditivada de 0,1% de acetato de amônio e 75% ACN, até 2 minutos, 3% de água e 97% ACN, até 5 minutos, e mantendo-se 75% de MeOH até o final da corrida em 9 minutos, com fluxo de e 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. As análises foram feitas em modo MRM, modo positivo, com íon precursor m/z 742 e íon produto m/z 657, voltagem do cone 45 V, e energia de colisão de 25 eV, e argônio como gás de colisão.

### 3.3 Metodologia

#### 3.3.1 Cultivo das actinobactérias e obtenção dos extratos brutos para monitoramento da produção de nigericina

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, isoladas da rizosfera de eucalipto (EUCAL 26 e EUCAL 74), que dentro do screening de identificação de actinobactérias produtoras de antibióticos anti-tuberculose do nosso grupo de pesquisa, se mostraram potenciais produtoras do antibiótico nigericina.



Estes microrganismos foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa do Meio Ambiente - Jaguariúna, coordenado pelo Prof. Dr. Itamar Soares de Mello, em trabalho de colaboração com nosso grupo de pesquisa.

A esterilização de todos os meios de cultivo foram realizadas em uma autoclave a temperatura de 120°C e a pressão de 1,5 atm durante 20 minutos e inoculados com 500 µL de uma suspensão aquosa do micro-organismo. As actinobactérias foram preservadas em placas de Petri contendo meio sólido BDA (batata-dextrose ágar) e repicadas em intervalos de tempo de aproximadamente 2 meses. As duas cepas EUCAL 26 e 74 foram fermentadas em meios de cultivo líquidos diferentes, BD, Czapek, ISP2, M29 e TSB, durante 7 dias sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 30°C. O volume de meio de cultivo foi de 50 mL em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em duplicata. Após o período de 7 dias, os fermentados foram filtrados a vácuo e submetidos a extrações líquido-líquido (3x o volume) com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, e concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida. Os extratos brutos obtidos foram submetidos a análises de ID-MS.

### 3.3.2 Preparo dos meios de cultivo

O meio líquido BD é composto de uma solução aquosa com 20% (v/v) de caldo de batata e 2% (m/v) de dextrose, sendo o caldo de batata resultante do cozimento de 400 g de batatas picadas em 1,0 L de água destilada durante

30 minutos.<sup>55</sup> Czapek<sup>56</sup>, caldo triptona de soja (TSB)<sup>57</sup>, ISP-2<sup>58</sup>, M29<sup>59</sup>, cujas composições encontram-se descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultivo líquido empregados na análise de produção de nigericina

Nutriente	Czapeck	TSB	M29	ISP-2
Sacarose	3,0	-	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	0,25	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05	-	-	-
KCl	0,05	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001	-	-	-
NaNO <sub>3</sub>	0,3	-	-	-
CaCO <sub>3</sub>	-	-	0,1	-
NaCl	-	0,5	-	-
Extrato de levedura	0,8	-	0,5	0,4
Caseína hidrolisada	-	1,7	-	-
Extrato de malte	-	-	-	1,0
Extrato de Carne	-	-	0,2	-
Dextrose	-	0,25	1,0	0,4
Peptona	-	-	0,3	-
Digestão papaica de soja	-	0,3	-	-

\* quantidades em g/100 mL de água destilada.

### 3.4 Planejamento fatorial de experimentos

3.4.1 Otimização das condições de pH do meio e temperatura de fermentação, utilizando planejamento fatorial 3<sup>k</sup>

Os fatores a serem estudados primeiramente foram, a temperatura de fermentação, e o pH do meio de cultivo. Para saber o número de experimentos a serem realizados, foi feito um planejamento fatorial 3<sup>k</sup>, nesse tipo de planejamento, tem-se k fatores avaliados em três níveis denotados por baixo (-1), médio (0) e alto (+1), neste caso o número de fatores é igual a 2 (pH e

temperatura), sendo usado o valores de pH: 5 (-1), 7 (0) e 9 (+1), e temperatura: 15 °C (-1), 25 °C (0), e 30 °C (+1). Assim,  $3^2 = 9$ , portanto nove experimentos foram realizados. Com o auxílio do programa STASTISCA 9.0, foi possível determinar quais experimentos serão realizados, descritos na Tabela 02.

**Tabela 02.** Planejamento fatorial  $3^k$  com as condições de crescimento da actinobactéria EUCAL 26 em meio Czapeck

Experimento	pH	Temperatura de fermentação (°C)
1	7 (0)	30 (+1)
2	5 (-1)	25 (0)
3	9 (+1)	15 (-1)
4	7 (0)	15 (-1)
5	7 (0)	25 (0)
6	5 (-1)	15 (-1)
7	9 (+1)	25 (0)
8	5 (-1)	30 (+1)
9	9 (+1)	30 (+1)

Com o número de experimentos determinados, fermentou-se a actinobactéria EUCAL 26, em meio Czapeck, o volume de meio de cultivo foi de 50 mL em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em duplicata, durante 10 dias sob agitação controlada de 150 rpm. Em cada uma das condições descritas na Tabela 02 (o pH do meio foi controlado com uma solução tampão fosfato).

Após os períodos de fermentação, os fermentados foram filtrados a vácuo e submetidos a extrações líquido-líquido (3x o volume) com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, e concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida. Os extratos brutos obtidos foram submetidos a análises de LC-MS.

### 3.4.2 Superfície de resposta

A partir das áreas dos sinais de nigericina produzida a partir de cada uma das condições descritas em 3.2.1, junto com o planejamento fatorial  $3^k$  realizado, foram submetidos a um tratamento estatístico com o auxílio do programa STASTISCA 9.0, para construir a superfície de resposta do experimento, determinando-se as melhores condições de pH do meio e temperatura de fermentação.

### 3.5 Curva de crescimento para determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção de nigericina

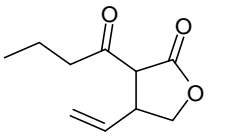
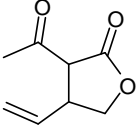
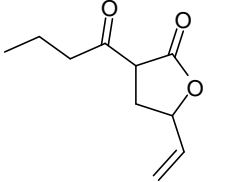
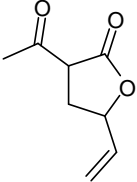
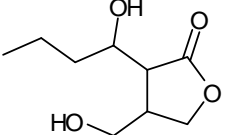
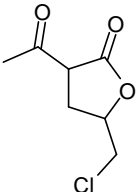
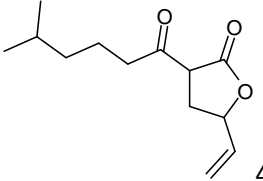
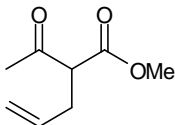
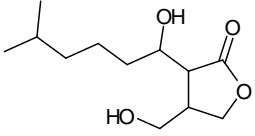
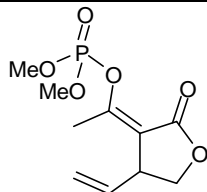
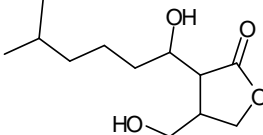
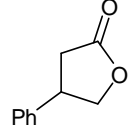
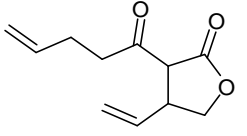
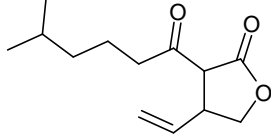
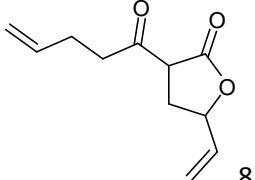
Preparou-se um meio líquido Czapek com tampão fosfato, a pH 7, e dividiu-se esse meio em 14 alíquotas com o volume de 50 mL cada, em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em duplicata. Todos os meios foram inoculados com 1 mL de pré-inóculo da actinobactéria EUCAL 26 crescidas durante 4 dias em meio Czapeck. A fermentação foi monitorada por um período de 31 dias sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 25 °C. Em média a cada 53 horas se retirava uma alíquota. Após o período de fermentação, todos extratos das alíquotas foram filtrados a vácuo e submetidos a extrações líquido-líquido com acetato de etila (3x o volume). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, e concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida. Os extratos brutos obtidos foram submetidos a análises de UPLC-MS.

A partir dos resultados das áreas dos sinais de nigericina, construiu-se uma curva de área por dias de fermentação, para se determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção de nigericina.

### 3.6 Avaliação da influência da adição de $\gamma$ -butirolactonas sintéticas ao meio Czapeck nas condições já otimizadas, na produção de nigericina

Foi realizado um estudo da influência na produção de nigericina a partir da adição de 15 tipos de  $\gamma$ -butirolactonas (sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica, do Departamento de Química da USP – Ribeirão Preto) ao meio Czapeck. A Tabela 3 mostra as 15 formulas estruturais das  $\gamma$ -butirolactonas utilizadas no experimento.

**Tabela 03.** 15 tipos de  $\gamma$ -butirolactonas sintéticas usadas para avaliar suas influências na produção de nigericina, e suas respectivas estruturas

Estrutura	Sigla	Estrutura	Sigla
 1	DP21A	 9	PR11A
 2	DP21B	 10	PR12A
 3	DPM93 C	 11	PR21A
 4	DPM84C	 12	DPM43
 5	DP54A	 13	DPM32C
 6	DP54B	 14	$\gamma$ -fenil-butirrolactona
 7	DPM85B	 15	DPM84B
 8	DPM85C		

\*Os números abaixo das estruturas está relacionado com a Tabela 6.

Os experimentos foram realizados em duas etapas, na primeira foram testadas 8  $\gamma$ -butirolactonas, e na segunda etapa as outras 7, os procedimentos experimentais foram realizados da mesma maneira nas duas etapas. Preparou-se um meio líquido Czapek com tampão fosfato, a pH 7, e dividiu-se esse meio em 9 alíquotas com o volume de 50 mL cada, em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em duplicata. Todas as alíquotas foram inoculadas com 1 mL de pré-inóculo da actinobactéria EUCAL 26 (crescidas durante 4 dias em meio Czapeck), e fermentou-se sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 25 °C. No sexto dia de fermentação adicionou-se ao meio 25  $\mu$ L de 8 soluções de cada  $\gamma$ -butirolactona em DMSO (concentração 10  $\mu$ g/mL) a cada alíquota, para se obter uma concentração final de 5  $\mu$ g/L da  $\gamma$ -butirolactona no meio de cultivo, a outra alíquota foi usada como controle e só foi adicionado 25  $\mu$ L de DMSO puro ao meio. Após a adição das  $\gamma$ -butirolactonas, a cada dois dias se retirava uma alíquota de 1 mL de cada fermentação para o monitoramento da curva de produção da nigericina.

As alíquotas retiradas das fermentações foram extraídas com acetato de etila, misturando 0,5 mL da alíquota com 0,5 mL de acetato de etila, o sobrenadante foi retirado e secado a pressão reduzida em um evaporador centrífugo Speed-Vac. Assim os extratos foram submetidos a análises de UPLC-MS.

### 3.7 Fermentação em diferentes volumes

Inicialmente preparou-se um meio líquido Czapek com tampão fosfato, em pH 7, em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo volume de 50 mL de meio. O meio foi inoculado com 1 mL de pré-inóculo da actinobactéria EUCAL 26 crescidas durante 4 dias em meio Czapeck. O meio foi fermentado durante 7 dias sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 25 °C, a cada um dia foi retirada uma alíquota de 1 mL do meio.

Em seguida preparou-se um meio líquido Czapek com tampão fosfato, a pH 7, com o volume de 250 mL, em frascos Erlenmeyers de 1 L, em duplicata. O meio foi inoculado adicionando 50 mL do meio fermentado na etapa inicial, e foi fermentado durante mais 10 dias sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 25 °C, a cada um dia se retirava uma alíquota de 1 mL do meio.

Por fim preparou-se um meio líquido Czapek com tampão fosfato, a pH 7, com o volume de 3,7 L, em um balão de fermentação de 6 L. O meio foi inoculado adicionando os 300 mL do meio fermentado na segunda etapa, e foi fermentado durante 27 dias sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 25 °C, a cada um dia se retirava uma alíquota de 1 mL do meio.

As alíquotas retiradas das fermentações foram extraídas com acetato de etila, misturando 0,5 mL da alíquota com 0,5 mL de acetato de etila, o sobrenadante foi retirado e secado a pressão reduzida em um evaporador centrifugo Speed-Vac. Assim os extratos foram submetidos a análises de UPLC-MS.



### 3.8 Avaliação da influência na variação dos nutrientes do meio de cultivo, para a produção de nigericina

Foram preparados 7 meios de cultivos líquido diferentes: Czapeck, Czapeck sem sacarose, Czapeck sem  $K_2HPO_4$ , Czapeck sem  $MgSO_4$ , Czapeck sem KCl, Czapeck sem  $FeSO_4$  e Czapeck sem  $NaNO_3$ , todos com os volumes de 50 mL, em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em duplicata. Os meios foram inoculados com 1 mL de pré-inóculo da actinobactéria EUCAL 26 crescidas durante 4 dias em meio Czapeck, e foram fermentados durante 10 dias sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 25 °C.

Após o período de fermentação, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL de cada meio fermentado, que foram extraídos com acetato de etila, misturando 0,5 mL da alíquota com 0,5 mL de acetato de etila, o sobrenadante foi retirado e secado a pressão reduzida em um evaporador centrífugo Speed-Vac. Os extratos obtidos foram submetidos a análises de UPLC-MS.

### 3.9 Teste de resíduos agroindustriais como meios de cultivo para produção de nigericina

Foram utilizados para este experimento, dois resíduos agroindustriais líquidos, “Farmal” e “Melaço de Soja”. O resíduo agroindustrial “Farmal” é a água residual da lavagem do milho processado industrialmente, e possui um elevado potencial de poluição. A fração orgânica inclui açúcares, polifenóis, poliálcoois e lipídios. Algumas destas substâncias (principalmente açúcares) podem servir como fontes de carbono e de energia para o crescimento de

microrganismos.<sup>60</sup> Já o “Melaço de Soja” é um subproduto da extração dos açúcares da soja obtido após a extração do óleo da soja, através da lavagem do farelo com água e álcool. O resultado de todos esses processos de extração e concentração obtém um xarope marrom escuro, rico em carboidratos. Por ser um subproduto da produção de farelo de soja com um grande volume de geração, o melaço de soja é um material de baixo custo que impõem problemas de descarte ambiental.<sup>61</sup>

Os meios fermentativos foram preparados pela adição de 2% do resíduo agroindustrial em água destilada. Foi preparado um meio Czapeck usado como controle. Todos com os volumes de 100 mL, em frascos Erlenmeyers de 500 mL, em duplicata. Os meios foram inoculados com 2 mL de pré-inóculo da actinobactéria EUCAL 26 crescidas durante 4 dias em meio Czapeck, e foram fermentados durante 15 dias sob agitação e temperatura controladas de 150 rpm e 25 °C.

Após o período de fermentação, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL de cada meio fermentado, que foram extraídos com acetato de etila, misturando 0,5 mL da alíquota com 0,5 mL de acetato de etila, o sobrenadante foi retirado e secado a pressão reduzida em um evaporador centrifugo Speed-Vac. Os extratos obtidos foram submetidos a análises de UPLC-MS.

### 3.10 Teste de bioensaio da nigericina contra bactérias da mastite

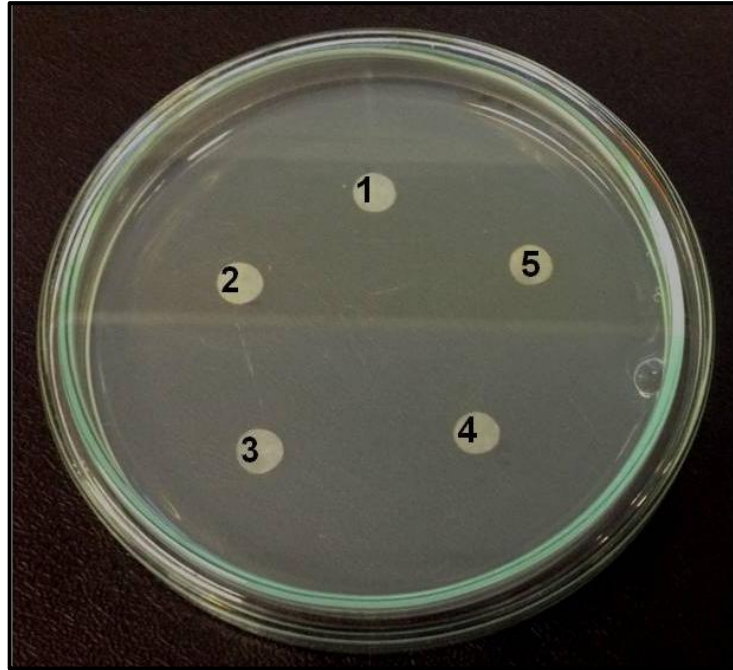
Foram testadas 5 linhagens isoladas do leite de vacas com mastite pré-clínica (fornecidas pelo Laboratório de Nutrição Animal, coordenado pelo professor Marcos Veiga dos Santos), descritas na Tabela 04. Para os

bioensaios foram utilizados, padrão de nigericina, padrão de monensina A, extrato bruto da actinobactéria EUCAL 26 fermentada em meio Czapeck, e nigericina purificada do extrato bruto por cromatografia de permeação em gel. Os extratos foram dissolvidos em etanol em 5 concentrações (1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL).

**Tabela 04.** Bactérias da mastite, seus números e descrição da espécie

<b>Número da bactéria</b>	<b>Descrição da espécie</b>
42	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
97	<i>Streptococcus agalactiae</i>
211	<i>Staphylococcus aureus</i>
212	<i>Staphylococcus aureus</i>
213	<i>Staphylococcus aureus</i>

Em uma placa de Petri de vidro, adicionou 5 discos de papel de filtro, e organizados de forma que cada um fique em uma região da placa. Em seguida adicionou a cada disco 5 µL da solução do composto a ser testado, nas 5 diferentes concentrações. Após a completa evaporação do etanol, foram adicionados 12 mL de meio BDA sobre os discos contendo as amostras testes. Após a solidificação do meio, foram adicionados 200 µL de uma suspensão de cada bactéria (crescida em meio TSB por 24 horas), espalha-se esse inóculo com uma alça de vidro, a placa foi mantida em uma estufa de crescimento por 17 horas. A Figura 6 mostra o esquema de como os discos foram organizados na placa de petri.



**Figura 6.** Representação de como os discos de papel de filtro são distribuídos na placa de Petri, cada numero representa a concentração da solução a ser testada, onde o 1 é a de 1mg/mL, o 2 a de 500  $\mu\text{g/mL}$ , o 3 a de 250  $\mu\text{g/mL}$ , o 4 a de 125  $\mu\text{g/mL}$  e o 5 a de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ .

**Resultados e**

**Discussão**

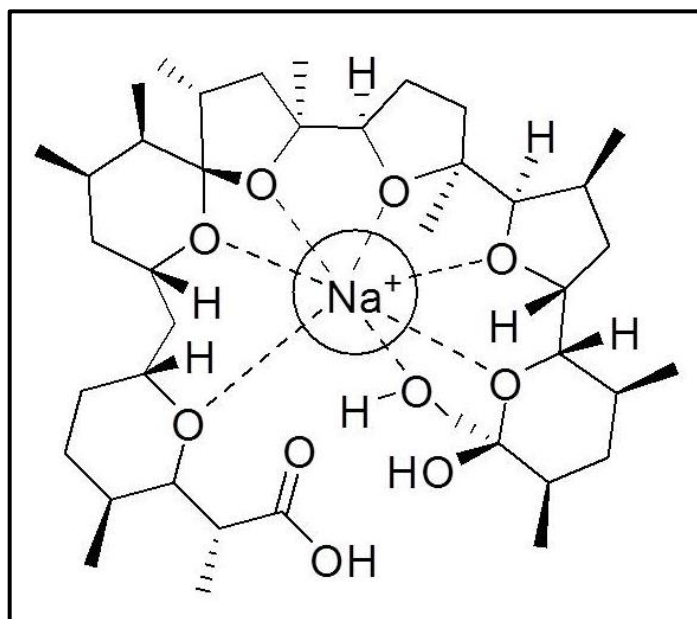
## 4 Resultados e Discussões

### 4.1 Monitoramento da presença de nigericina nos extratos brutos produzidos pelas actinobactérias EUCAL 26 e 74 em diferentes meios

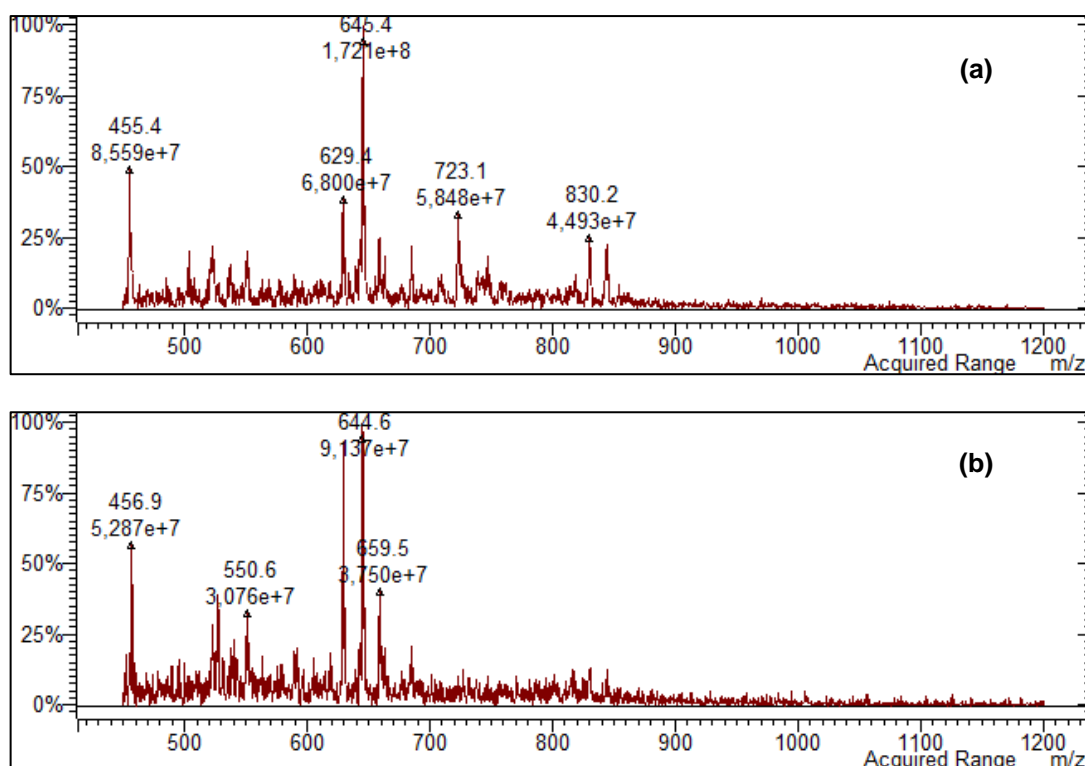
As duas linhagens das actinobactérias EUCAL 26 e 74 foram fermentadas nas condições descritas no item 3.3.1 (página 24). Todos os extratos brutos foram submetidos à análise por espectrometria de massa através de inserção direta (ID-MS) na fonte de ionização por eletrospray operando em modo positivo (ESI+). Este tipo de análise foi realizada para avaliação do perfil químico e a presença de nigericina. A presença de nigericina nos espectros de ID-MS foi caracterizada pela presença do íon de  $m/z$  747. Este íon foi atribuído a molécula de nigericina sodiada  $[M+Na]^+$  (Figura 7).

Para isto foram preparadas soluções em metanol dos extratos brutos e injetados o volume de 20  $\mu$ L de amostra. Uma análise detalhada dos perfis químicos dos espectros de massa por ID-MS mostrou que, o extrato bruto da EUCAL 26 em meio BD, apresentou produção de nigericina, e uma série de outros metabólitos. (Figura 8 e) Já o extrato bruto da EUCAL 26 em meio Czapek apresentou produção de nigericina como o único metabólito, pois aparece basicamente o sinal de nigericina no espectro como apresentado na Figura 8. Este resultado indica que no meio Czapeck a EUCAL 26 produz basicamente a nigericina como único metabólito. Já nos demais meios de cultivo, os extratos brutos produzidos pela EUCAL 26, não apresentaram produção de nigericina. A actinobactéria EUCAL 74 não cresceu no meio ISP 2,

e nos demais meios não foi observada a produção de nigericina em seus extratos brutos por ID-MS.

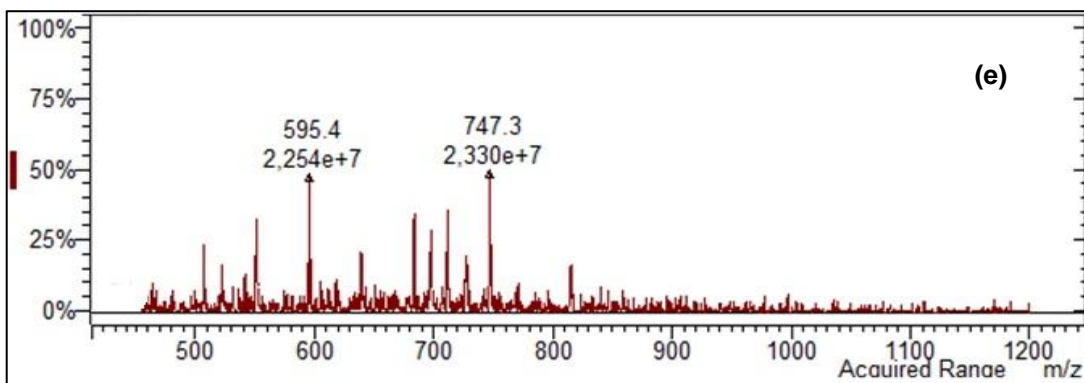
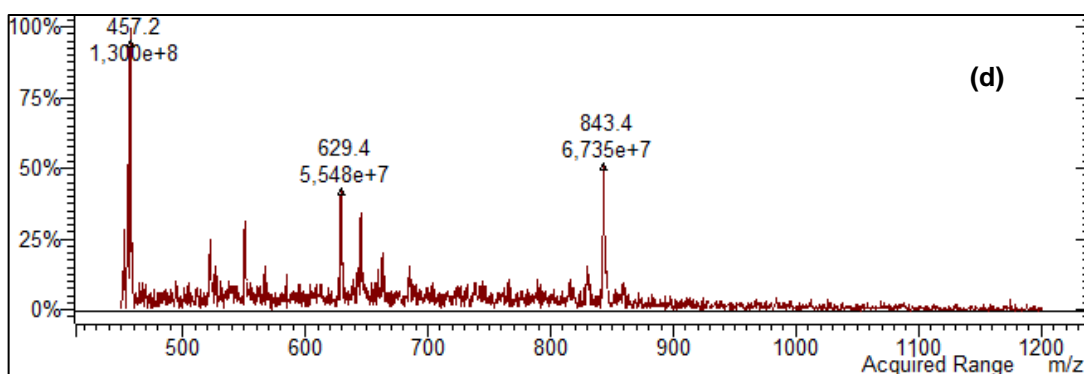
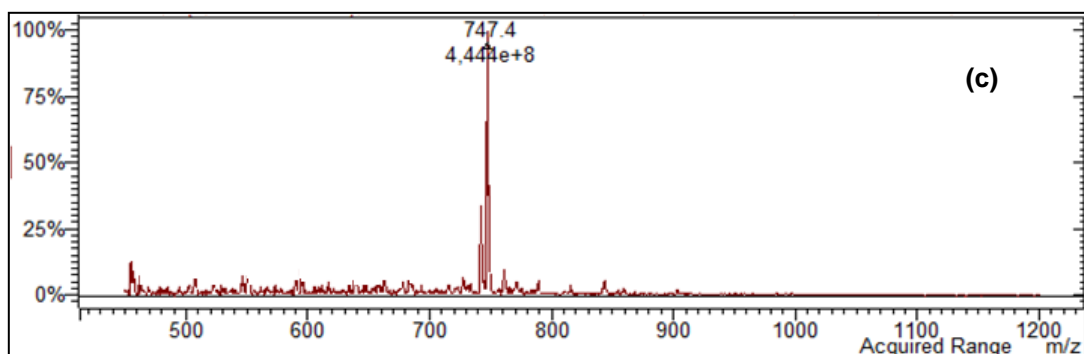


**Figura 7.** Estrutura química do nigericina sodiada  $[C_{40}H_{68}O_{11}+Na]^+$ .



**Figura 8.** Espectros de ID-MS dos extratos brutos obtidos da actinobactéria EUCAL 26 fermentada nos meios (a) M29, (b) TSB, (c) Czapeck, (d) ISP 2 e (e) BD.

## Continuação da Figura 8.





#### 4.2 Determinação das melhores condições de pH do meio e temperatura de fermentação para produção de nigericina em meio Czapeck

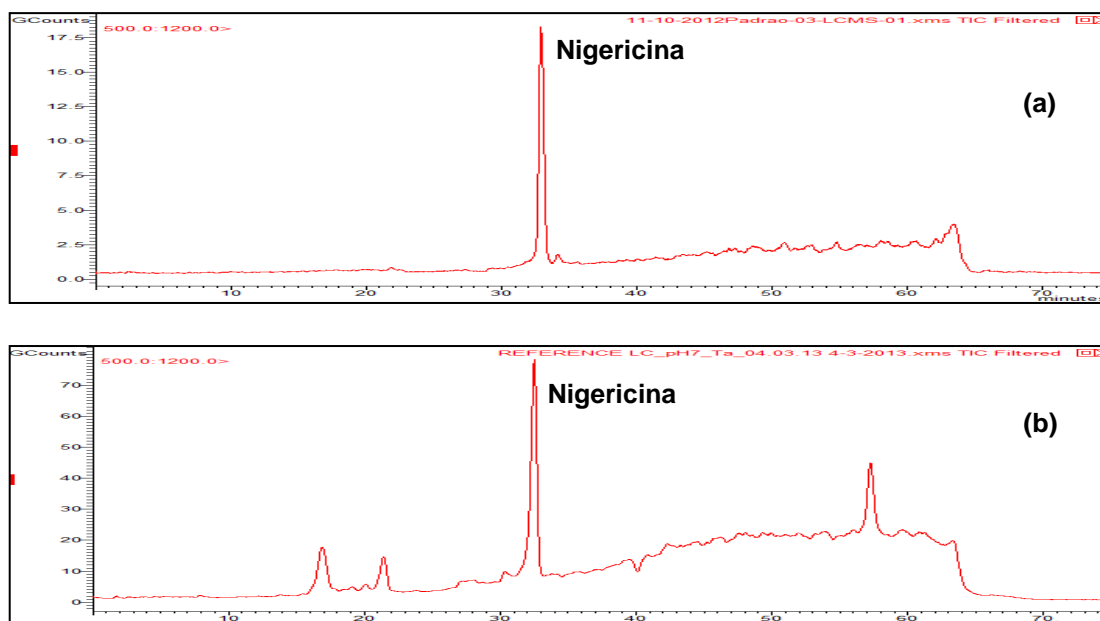
Para maximizar a produção de metabólitos por microrganismos, é necessário determinar as condições ótimas de fermentação (incluindo componentes do meio de cultivo e fatores como pH do meio, temperatura de fermentação e período de fermentação). As condições de fermentação são tradicionalmente otimizadas pela estratégia onde se varia um fator e se mantém todos os outros fatores constantes. Embora essa estratégia seja bastante simples, ela acaba gerando um número relativamente grande de experimentos, em alguns casos a interação entre alguns fatores acabam não sendo observadas. Por outro lado, planejamentos experimentais baseados em cálculos estatísticos, como o planejamento fatorial e o método de superfície de resposta, possuem abordagens mais eficientes, onde é possível se trabalhar com um grande número de variáveis simultaneamente, além disso, pode-se estimar estatisticamente a interação entre as diferentes variáveis.<sup>62,63</sup>

Com base nos resultados obtidos anteriormente, a actinobactéria EUCAL 26 e o meio Czapeck foram selecionados, para aplicar o método de planejamento fatorial para se determinar as melhores condições de produção de nigericina, tendo como variável a temperatura (15, 25 e 30 °C) e pH do meio fermentativo (5, 7 e 9). Deste modo, fermentou-se a actinobactéria EUCAL 26 na condições determinadas através do planejamento fatorial  $3^k$  ( $k=2$ ), como descritas no item 3.4.1 (página 26).

Na temperatura de 15 °C não foi observado o crescimento da actinobactéria em nenhum dos pHs, isso ocorreu devido a baixa temperatura

de fermentação, que inibiu o crescimento da actinobactéria. Já na temperatura de 25 °C, a actinobactéria cresceu em pH 7 e em pH 9, e não cresceu em pH 5. Foi observado que a quantidade de micélio em pH 9 foi bem menor que em pH 7. Este resultado indica que em pHs diferente de 7, há uma inibição do crescimento da actinobactéria. A temperatura de 30 °C a actinobactéria EUCAL 26 cresceu em pH 5 e em pH 7, porém não cresceu em pH 9, sendo que a quantidade de micélio em pH 5 foi bem menor que em pH 7 semelhante ao ocorrido pela temperatura de 25 °C, o pH do meio influencia no crescimento da actinobactéria.

Foi desenvolvido um método de LC-MS com nigericina padrão. Todos os extratos brutos das fermentações obtidos foram submetidos à análise de LC-MS em modo positivo (ESI+), como mostra a Figura 9. Através das comparações das áreas do sinal de nigericina no cromatograma, foi possível determinar o pH e a temperatura de fermentação, onde se obtenha a máxima produção de nigericina. Com base nos dados apresentados na Tabela 5 podemos observar que em pH 7 e na temperatura de 25 °C houve uma maior produção de nigericina.

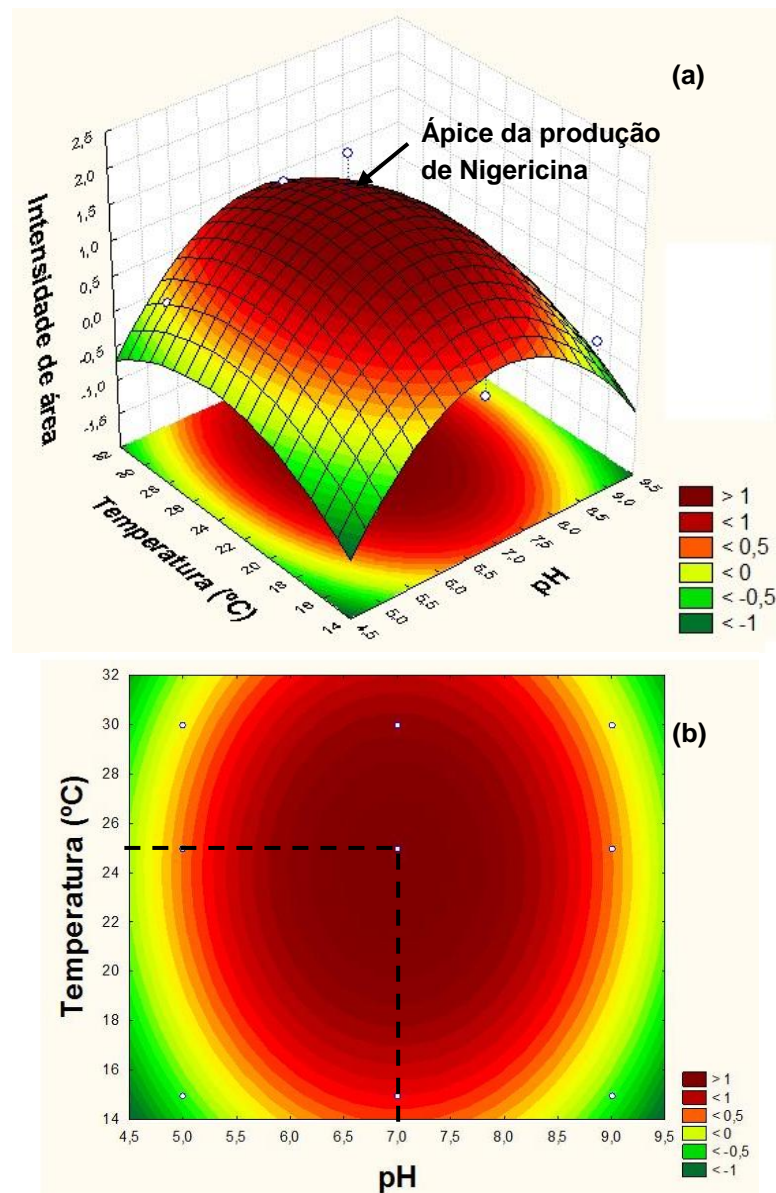


**Figura 9.** (a) LC-MS do padrão de nigericina ( $m/z$  747) e (b) LC-MS do extrato bruto da fermentação em pH 7 a temperatura de 25 °C.

**Tabela 05.** Resultados das áreas dos LC-MS dos extratos brutos em diferentes pHs e temperatura de fermentação

pH	Temperatura (°C)		
	15	25	30
Área ( $e^{12}$ )			
5	0	0	0,166
7	0	2,151	1,189
9	0	0,165	0

A partir desses resultados, determinou-se a superfície de resposta e as curvas de níveis utilizando o programa STASTISCA 9.0, como podemos observar na Figura 10. Onde está assinalado o ápice de produção de nigericina, que foi em pH 7 à temperatura de 25 °C, região com vermelho mais intenso na superfície de resposta e na curva de nível.



**Figura 10.** (a) Superfície de resposta e (b) curva de nível dos dados da Tabela 05.

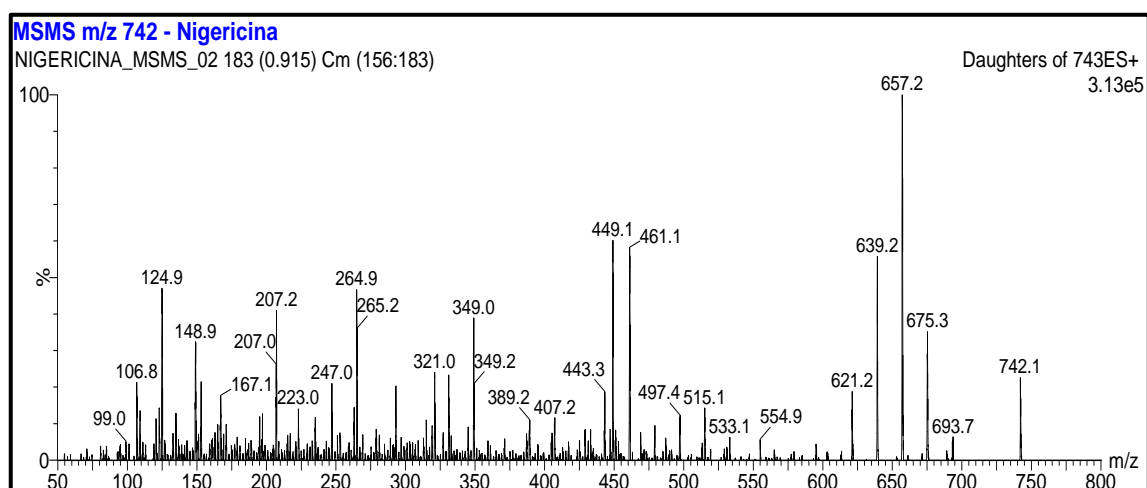
A superfície de resposta mostra também resultados estimados a partir de valores de pH do meio e temperaturas de fermentação que não foram testados experimentalmente, podendo se ter uma noção de qual seria a resposta se esses experimentos fossem realizados. A partir desses resultados podemos concluir que as condições de pH do meio e temperatura de fermentação, são fatores que influenciam a produção de nigericina pela actinobactéria EUCAL 26, e a partir dos experimentos planejados através do

planejamento fatorial  $3^k$ , foi possível determinar as condições ótimas de pH do meio e temperatura de fermentação para a produção de nigericina em meio Czapeck.

#### 4.3 Determinação do período de fermentação para a máxima produção de nigericina em meio Czapeck em pH 7 e temperatura de 25 °C

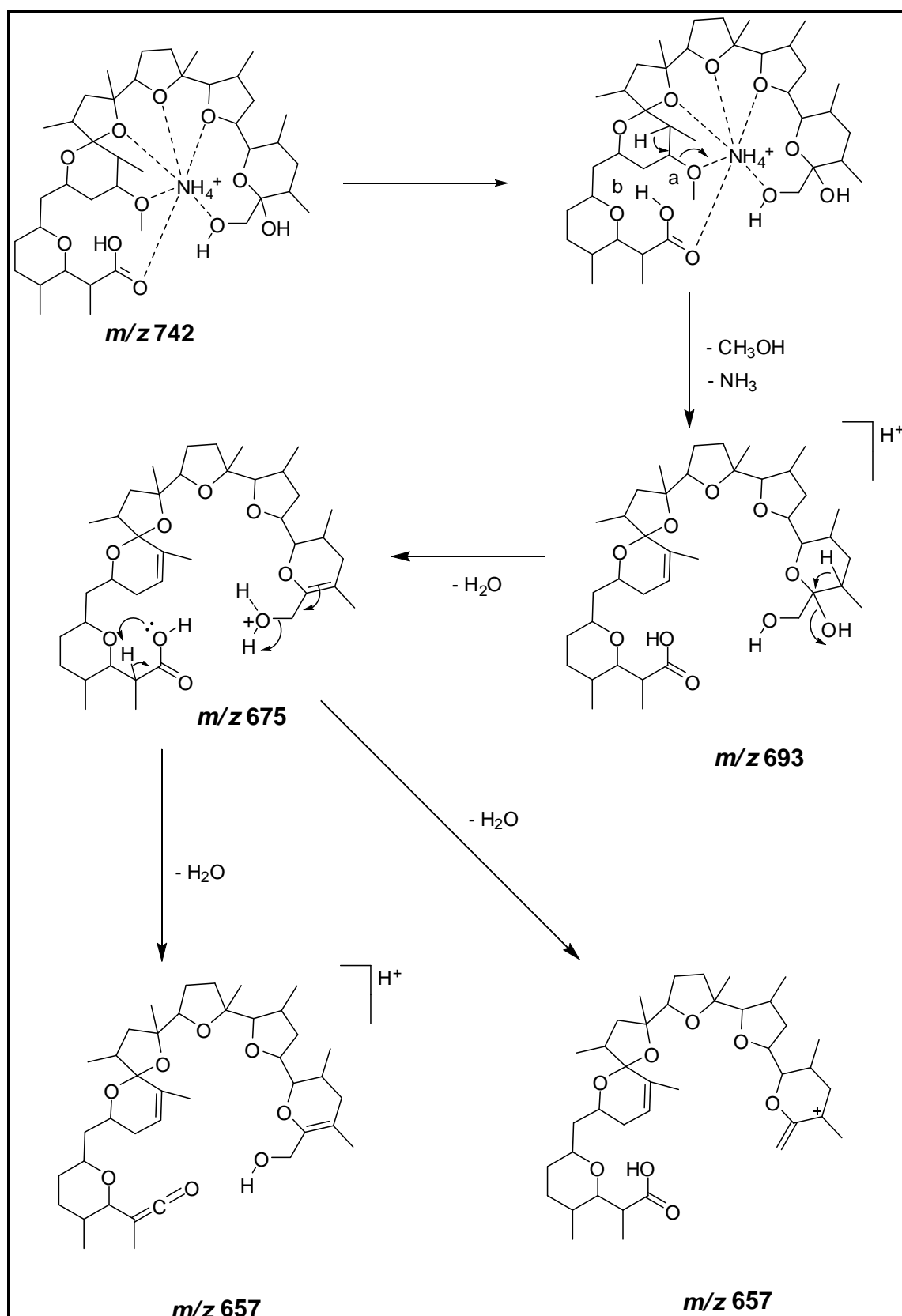
Sabendo-se agora as melhores condições de temperatura de fermentação e pH do meio para actinobactéria EUCAL 26 em meio Czapeck, foi realizado um experimento para determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção de nigericina. Após 31 dias, todas as 14 alíquotas foram extraídas da mesma maneira, e seus extratos foram diluídos em mesmo volume de metanol para análise comparativa, como descrito no item 3.5 (página 28).

Com o número elevado de amostras geradas, o método de LC-MS desenvolvido do item 4.2 (página 42) se tornou inviável, devido ao longo tempo (75 minutos) de análise. Assim foi desenvolvido um método de UPLC-MS em modo positivo (ESI+), no modo de análise MRM (monitoramento de reações múltiplas), que o íon precursor selecionado foi o  $m/z$  742 (molécula de nigericina com amônio), e o íon produto escolhido foi o  $m/z$  657, esse íon produto foi escolhido, pois foi o mais intenso nos estudos de CID (dissociação induzida por colisão) do padrão de nigericina como mostra o espectro da Figura 11. Este modo de análise foi escolhido por ser bastante sensível, seletivo e rápido, onde se pode analisar um elevado número de amostras em um tempo muito menor que um LC-MS convencional.



**Figura 11.** Espectro de MS/MS padrão de nigericina (valor de energia 25 eV).

Foi desenvolvida uma proposta de fragmentação para explicar a formação do íon produto de  $m/z$  657, a partir do íon precursor de  $m/z$  742, como mostra a Figura 12.

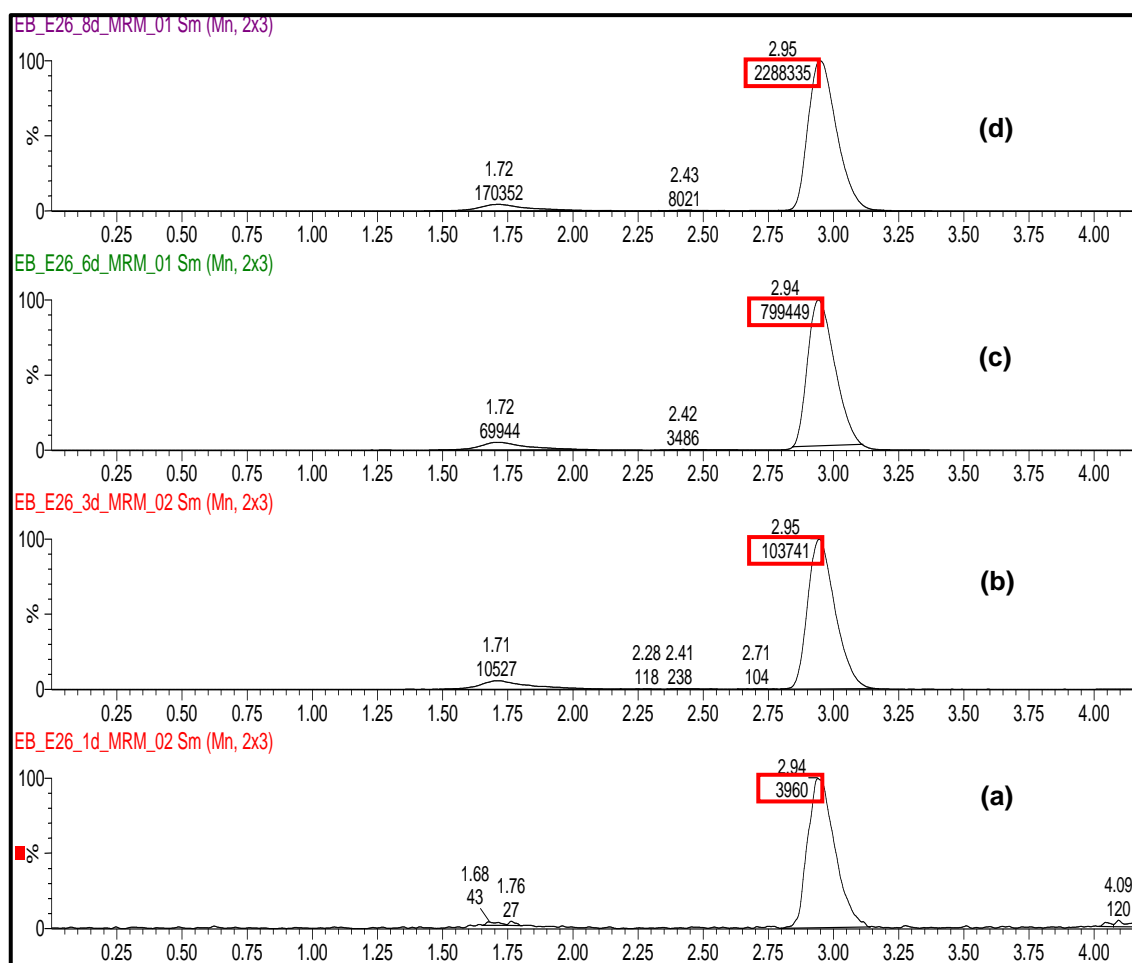


**Figura 12.** Proposta de fragmentação para a formação do íon produto de  $m/z$  657.

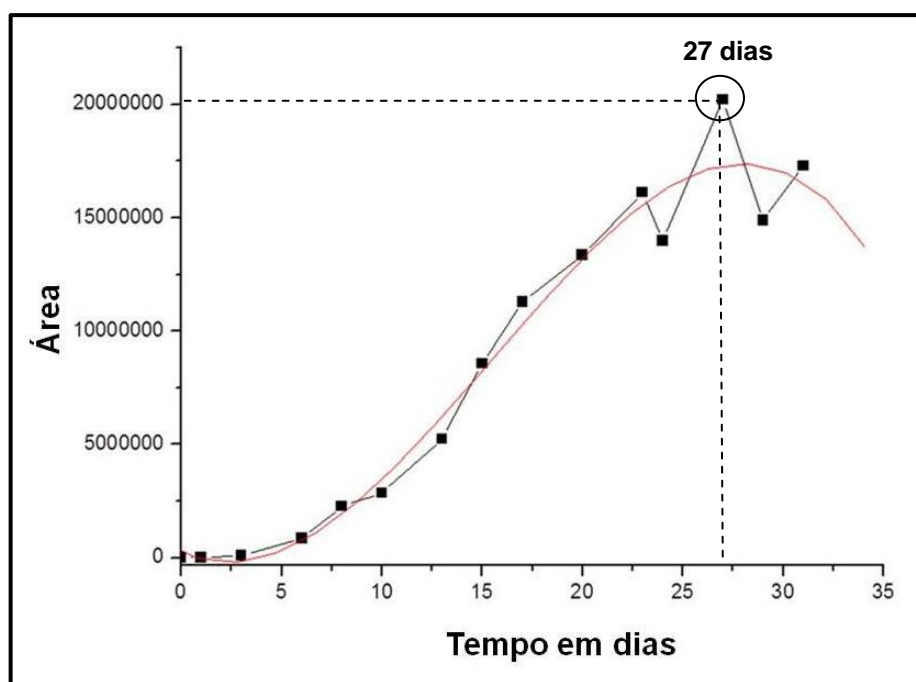
Podemos observar na Figura 12, a nigericina ( $m/z$  742) inicialmente perde amônia e metanol, e forma íon  $m/z$  693. Em seguida esse íon perde uma água, formando o íon  $m/z$  675. A partir do íon  $m/z$  675 foi proposto dois mecanismos de fragmentação de perda de água, formando assim dois possíveis íons produto de  $m/z$  657.

Após as análises de UPLC-MS foi possível determinar as áreas dos sinais de nigericina de cada amostra, como mostra a Figura 13. A partir dessas áreas foi construída uma curva de área em função do tempo de fermentação para se determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção de nigericina, como mostra a Figura 14.





**Figura 13.** Cromatogramas de UPLC-MS em modo MRM, dos extratos brutos das fermentações retiradas após (a) um dia, (b) três dias, (c) seis dias e (d) oito dias de fermentação, as áreas do sinal de nigericina estão marcadas nos cromatogramas.

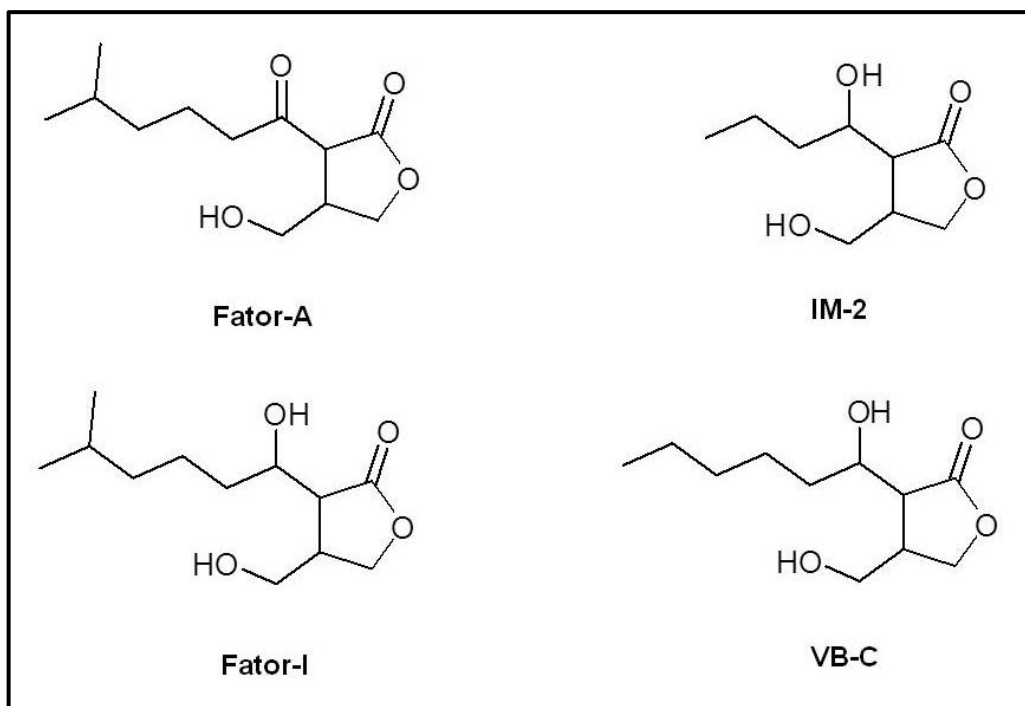


**Figura 14.** Curva de produção de nigericina: área por tempo de fermentação.

Nota-se que as áreas aumentam em função do aumento do período de fermentação (isso mostra que a concentração de nigericina está aumentando), e esse crescimento chega a um ápice em 27 dias. A partir destes resultados foi possível determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção de nigericina pela actinobactéria EUCAL 26 nas condições ótimas de temperatura de fermentação e de pH do meio Czapeck.

#### 4.4 Avaliação da influência da adição de $\gamma$ -butirolactonas sintéticas ao meio Czapeck nas condições já otimizadas, na produção de nigericina

Actinobactérias em especial do gênero *Streptomyces*, se destacam pela sua alta capacidade de produzir antibióticos. Uma das características mais interessantes desses microrganismos é a capacidade de produzir moléculas de sinalização hormonal que ativam várias rotas biossintéticas, regulando a produção de antibióticos. Estas moléculas de sinalização são chamadas  $\gamma$ -butirolactonas autorreguladoras, vários compostos desta classe já foram isolados e quimicamente identificados (como alguns representados na Figura 15).<sup>40,64</sup> Jovem Kook Yang estudou a influência da adição de  $\gamma$ -butirolactonas sintéticas ao meio de cultivo na produção do antibiótico virginiamicina, produzidos por *Streptomyces virginiae*. Yang observou que houve um aumento significativo na produção de virginiamicina, e também melhoramento no tempo de resposta para produção da mesma, ou seja, a virginiamicina começou a ser produzida em um tempo menor em relação ao controle onde não houve adição de  $\gamma$ -butirolactonas. Também foi observado a inibição da produção da virginiamicina com a adição de algumas  $\gamma$ -butirolactonas ao meio de cultivo.<sup>41</sup>

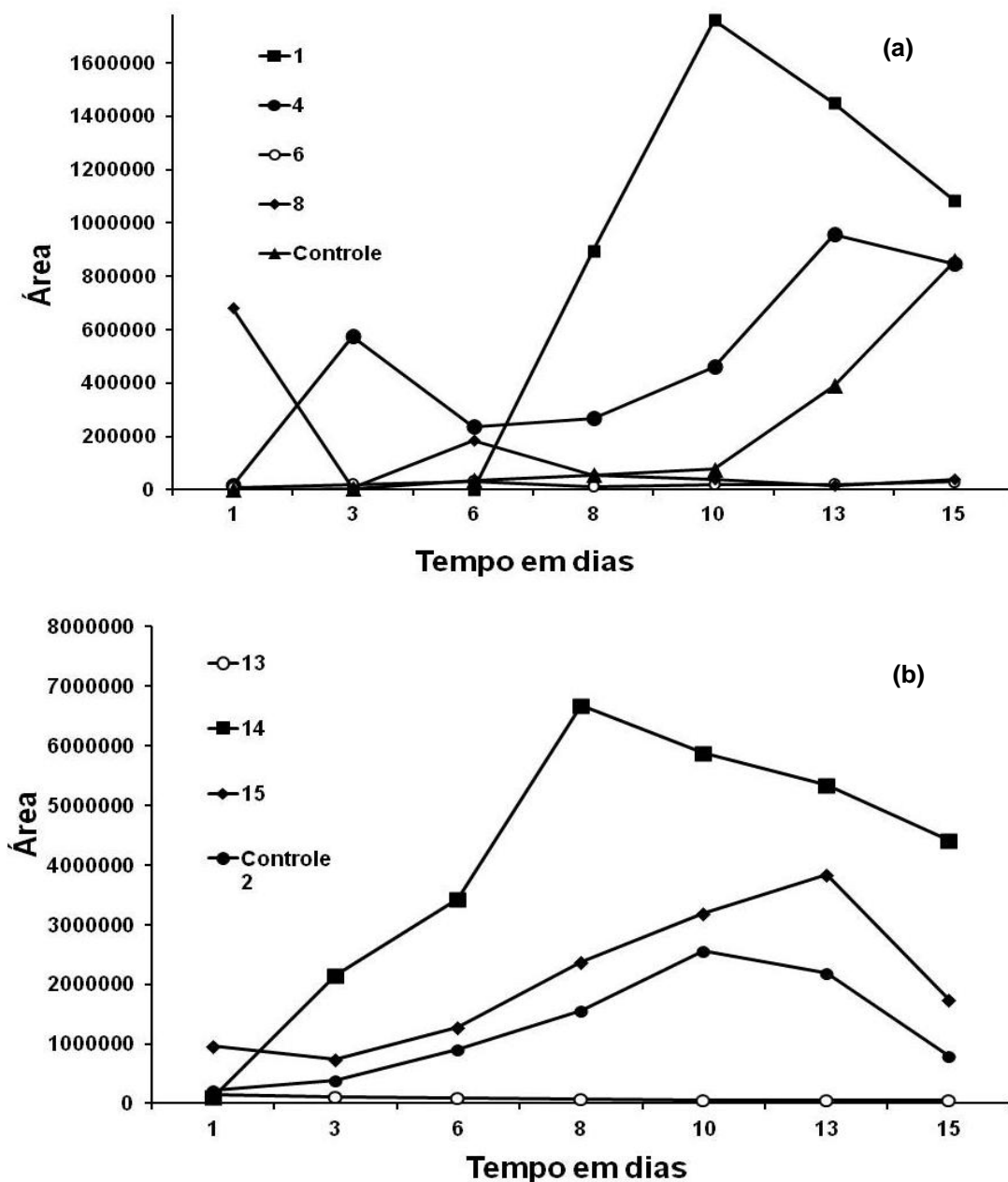


**Figura 15.** Estrutura química de  $\gamma$ -butirolactonas isoladas de *Streptomyces*: Fator-A, IM-2, Fator-I e VB-C.

A partir dos resultados otimizados para produção de nigericina pela actinobactéria EUCAL 26, foi realizado um estudo da influência na produção de nigericina a partir da adição de  $\gamma$ -butirolactonas sintéticas. Essas  $\gamma$ -butirolactonas foram sintetizadas pelo aluno de mestrado Daniel Previdi do Laboratório de Síntese Orgânica, do Departamento de Química da USP – Ribeirão Preto, sob a coordenação do professor Paulo Marcos Donate.

Foram estudadas 15  $\gamma$ -butirolactonas, os experimentos foram realizados em duas etapas como descrito no item 3.6 (página 29), todas as alíquotas retiradas, foram submetidas a análises de UPLC-MS em modo MRM, como no item 4.3. Porém foi desenvolvido um novo método mudando a fase orgânica de metanol para acetonitrila, o que melhorou a relação sinal/ruído no cromatograma e diminuiu o tempo de retenção da nigericina. A partir dos resultados de UPLC-MS obtidos, calculou-se área do sinal de nigericina nos

cromatogramas e construiu-se uma curva de produção de nigericina de área por tempo de fermentação para cada  $\gamma$ -butirolactona testadas (Figura 15).



**Figura 16.** Curvas de produção de nigericina de área por tempo de fermentação: (a) primeira etapa de  $\gamma$ -butirolactonas testadas e (b) segunda etapa de  $\gamma$ -butirolactonas testadas (cada número representa uma  $\gamma$ -butirolactona, como mostra a Tabela 06).

**Tabela 06.** Representação numérica de cada  $\gamma$ -butirolactona testada

Número	$\gamma$ -butirolactona
1	DP21A
2	DP21B
3	DPM93C
4	DPM84C
5	DPM54A
6	DPM54B
7	DPM85B
8	DPM85C
9	PR11A
10	PR12A
11	PR21A
12	DPM43
13	DPM32C
14	$\gamma$ -fenil-butiro lactona
15	DPM84B

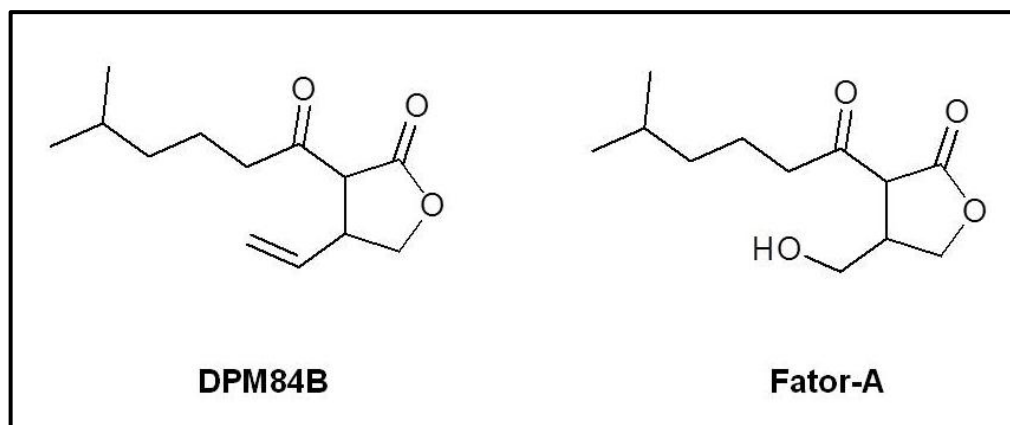
A partir das 8  $\gamma$ -butirolactonas testadas na primeira etapa (1 a 8), Figura 14 a, podemos observar que a adição dessas moléculas ao meio de cultivo Czapeck, influenciaram na produção de nigericina em comparação ao meio Czapeck sem adição das  $\gamma$ -butirolactonas (controle). As  $\gamma$ -butirolactonas 1 e 4 apresentaram as características mais relevantes. Essas  $\gamma$ -butirolactonas aumentaram a produção de nigericina, e seus ápices de produção foram em um tempo de fermentação menor que o do controle. A  $\gamma$ -butirolactona 1 foi a que apresentou o maior aumento na produção de nigericina em relação ao controle, nos primeiros dias de fermentação após a sua adição ao meio, houve pouca diferença em relação ao controle na produção de nigericina, mas a partir do 6º dia de fermentação, houve um aumento significativo na produção de

nigericina, chegando ao seu ápice de produção no 10º dia de fermentação. Em relação ao controle houve um aumento aproximadamente 23 vezes maior na produção de nigericina. Já a  $\gamma$ -butirolactona 4 apresentou um bom aumento na produção de nigericina em relação ao controle, após o 3º dia de fermentação, chegando ao seu ápice de produção no 13º dia de fermentação, que em relação ao controle no mesmo período foi aproximadamente 12 vezes maior na produção de nigericina. A  $\gamma$ -butirolactona 8 apresentou duas características interessantes, inicialmente ele aumentou relativamente a produção de nigericina em relação ao controle até o 6º dia de fermentação. Após esse período essa  $\gamma$ -butirolactona apresentou um efeito inibitório na produção de nigericina, isso ocorre possivelmente porque no início ela ativou a rota biossintética da produção de nigericina e em seguida pode ter ativado uma outra rota que pode usar a nigericina como precursor, isso explica o aumento inicial da concentração de nigericina e em seguida a diminuição da concentração da mesma. Já a  $\gamma$ -butirolactona 6 inibiu a produção de nigericina durante toda fermentação. As  $\gamma$ -butirolactonas 2, 3, 5 e 7 apresentaram poucas diferenças em relação ao controle, sendo os seus resultados não relevantes.

Na segunda etapa foram testadas mais 7  $\gamma$ -butirolactonas (9 a 15), como apresentado na Figura 14 (b), nota-se que a adição dessas outras  $\gamma$ -butirolactonas ao meio de cultivo, também influenciaram na produção de nigericina em comparação ao meio sem adição das  $\gamma$ -butirolactonas (controle 2). As  $\gamma$ -butirolactonas 14 e 15 apresentaram as características mais importantes, pois elas aumentaram bastante a produção de nigericina, e seus ápices de produção foram em um tempo de fermentação menor que o do

controle. A  $\gamma$ -butirolactona 14 foi a que apresentou o maior aumento na produção de nigericina em relação ao controle 2, a partir do 3º dia da sua adição ao meio, houve um aumento expressivo na produção de nigericina, chegando ao seu ápice de produção no 8º dia de fermentação, que em relação ao controle 2 no mesmo período foi aproximadamente 4 vezes maior na produção de nigericina. Já a  $\gamma$ -butirolactona 15 apresentou um bom aumento na produção de nigericina em relação ao controle 2, já partir do 1º dia da sua adição ao meio, chegando ao seu ápice de produção no 13º dia de fermentação, que em relação ao controle no mesmo período foi aproximadamente o dobro na produção de nigericina. Uma outra característica interessante da  $\gamma$ -butirolactona 15 (DPM84B) é que sua estrutura é bastante semelhante a uma  $\gamma$ -butirolactona descrita e caracterizada na literatura como sinalizadora hormonal para produção de antibióticos produzidos por *Streptomyces* conhecida como Fator-A<sup>39</sup> (Figura 16). Esta semelhança pode explicar porque a  $\gamma$ -butirolactona 15 aumenta a produção de nigericina. As  $\gamma$ -butirolactonas 9 e 13 inibiram a produção de nigericina durante toda fermentação, provavelmente elas também ativaram outras rotas biossintéticas do microrganismo que pode ter produzido outros metabólitos. Já as  $\gamma$ -butirolactonas 10, 11, 12 e 15 apresentaram poucas diferenças em relação ao controle.





**Figura 17.** Estruturas químicas das  $\gamma$ -butirolactonas DPM84B e Fator-A .

A partir desses resultados podemos concluir que, como no trabalho de Yang, a adição de  $\gamma$ -butirolactonas sintéticas ao meio de cultivo, influenciaram (seja aumentando ou inibindo) na produção de antibiótico pela actinobactéria do gênero *Streptomyces* (no caso a nigericina produzida pela EUCAL 26), e também no tempo de resposta para produção do mesmo, ou seja, o antibiótico atingiu seu ápice de produção em um tempo menor de fermentação.

Esses resultados comprovam a importância dessa classe de compostos e o estudo de suas influências na produção de antibióticos produzidos por *Streptomyces*. Desta forma, podemos também concluir que das 15  $\gamma$ -butirolactonas testadas, 4 (DP21A, DPM84C,  $\gamma$ -fenil-butiro lactona e DPM84B) apresentaram influência no aumento da produção de nigericina, além de aumentar a produção de nigericina, a adição dessas  $\gamma$ -butirolactonas ao meio de cultivo, diminuiu o período de fermentação onde se obtém a máxima produção de nigericina. Este resultado é bastante interessante do ponto de vista biotecnológico, pois se obtém uma quantidade maior de nigericina em um menor período de fermentação. Dentre essas 4  $\gamma$ -butirolactonas destaca-se a DP21A que se mostrou a mais promissora, com a sua adição a meio de cultivo

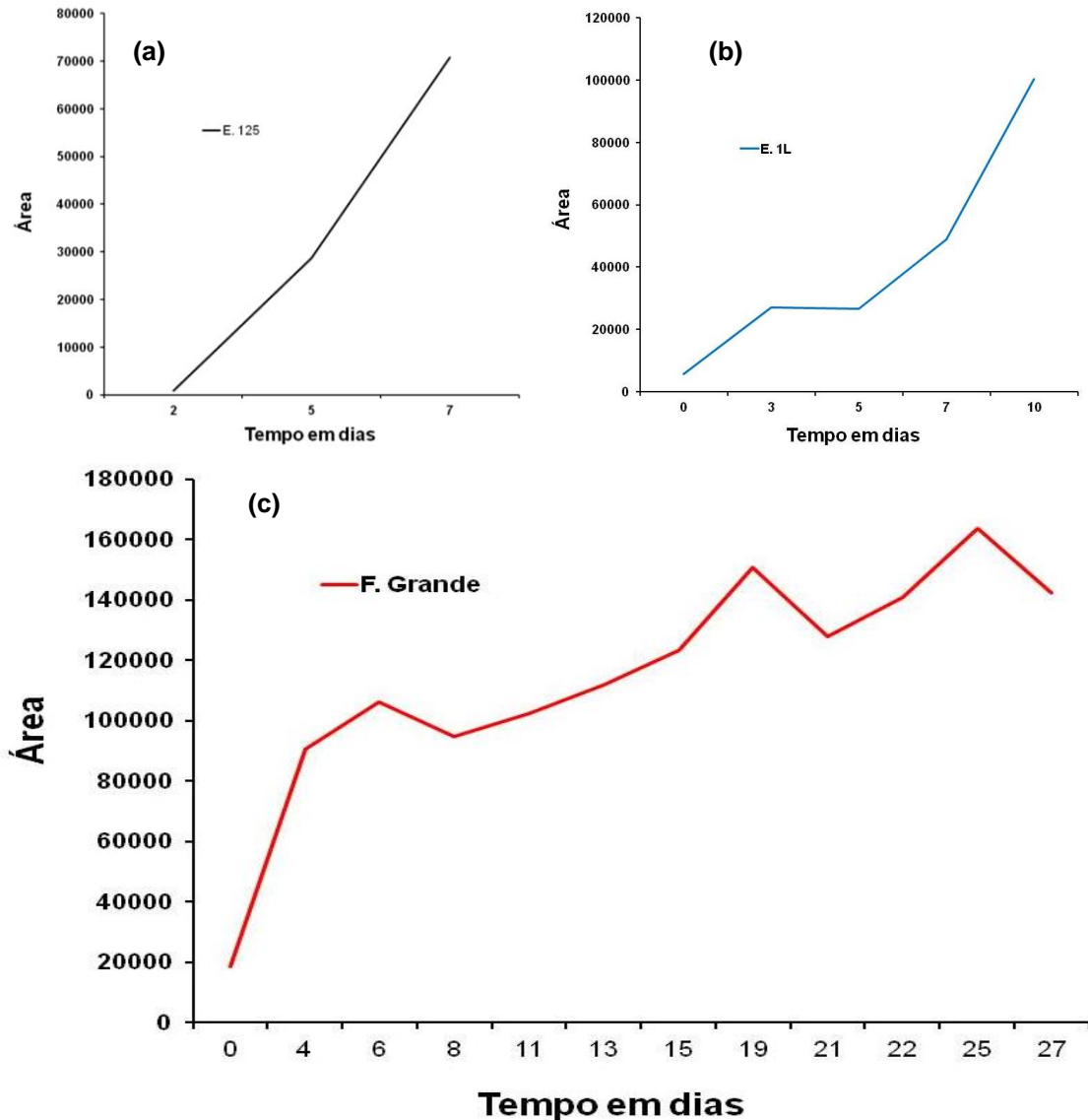
ao meio Czapeck se obteve uma produção de nigericina 23 vezes maior em relação ao meio Czapeck sem adição de  $\gamma$ -butirolactona.

#### 4.5 Otimização do aumento de escala (*scale up*) de fermentação

Industrialmente existe uma grande necessidade de se ampliar a escala de produção de um bioprocessos, pois a melhoria na produção de um produto alvo se torna um componente essencial para o estabelecimento do seu processo de escala de fermentação comercial. Essa melhora ajuda a reduzir os custos relacionados com as matérias-primas, o uso de instalações, custos trabalhistas, e outras despesas. Ele também reduz a produção de resíduos químicos (tais como solventes orgânicos), diminui as emissões de dióxido de carbono, e reduz o consumo de energia. Além disso, a otimização das condições de aumento de escala de fermentação ajuda a maximizar a produtividade e estabelecer um bioprocessos reprodutível em escala comercial.<sup>65</sup>

Sabendo da importância comercial de se aumentar a produção de um metabólito alvo, foi realizado um estudo para a otimização da produção de nigericina aumentando a escala de fermentação de um volume de meio de cultivo Czapeck de 50 mL para um volume de 4 L. Este experimento foi realizado em 3 etapas, como descritas no item 3.7 (página 32). Todas as alíquotas retiradas nas 3 etapas, foram submetidas a análises de UPLC-MS. A partir dos resultados de UPLC-MS obtidos, calculou-se área do pico de nigericina nos cromatogramas e construiu-se uma curva de produção de nigericina de área por tempo de fermentação para cada etapa do aumento de

escala, como mostrado na Figura 17. (Através desses resultados foi possível determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção de nigericina na escala de fermentação ampliada).



**Figura 18.** Curvas de produção de nigericina de área por tempo de fermentação: (a) primeira etapa de aumento de escala em Erlenmeyer de 125 mL, (b) segunda etapa de aumento de escala em Erlenmeyer de 1 L e (c) terceira etapa de aumento de escala em Balão de fermentação de 6 L.

Os períodos de fermentação usados para primeira e segunda etapa de fermentação foram estipulados em relação ao crescimento dos micélios da actinobactéria EUCAL 26, ou seja, na fermentação em Erlenmeyer de 125 mL,

após 7 dias de fermentação os micélios foram utilizados como pré-inóculo para segunda etapa. Já para a fermentação em Erlenmeyer de 1 L, os micélios foram crescidos por 10 dias e utilizados como pré-inóculo para a terceira etapa de fermentação em 4 L. Através da Figura 16 a e b nota-se que a produção de nigericina é crescente, isso mostra que o microrganismo está na fase estacionária (idiofase) onde o microrganismo está produzindo seu metabólito secundário. Já na etapa final (item (c) da Figura 16) podemos observar um grande aumento na produção de nigericina até o seu ápice de produção em 25 dias de fermentação.

A comparação da curva de crescimento em escala ampliada com a curva de crescimento do item 4.3, que foi realizada em escala menor de fermentação, em Erlenmeyer de 125 mL, mostra que elas são bastante semelhantes, e que o período de fermentação onde se obtém a máxima produção de nigericina também são muito próximos. A fermentação em escala ampliada pode ter tido esse período ápice de produção menor que a fermentação em escala menor, devido às mudanças de condições geradas com o aumento de escala, como aeração, por exemplo. Essa semelhança da fermentação ampliada com a fermentação em escala menor, mostra que esse aumento de escala foi bastante reprodutível.

Assim podemos concluir a partir destes resultados que foi possível otimizar o aumento na escala de fermentação para produção de nigericina, e que este aumento se mostrou bastante reprodutível com relação a escala de fermentação menor.

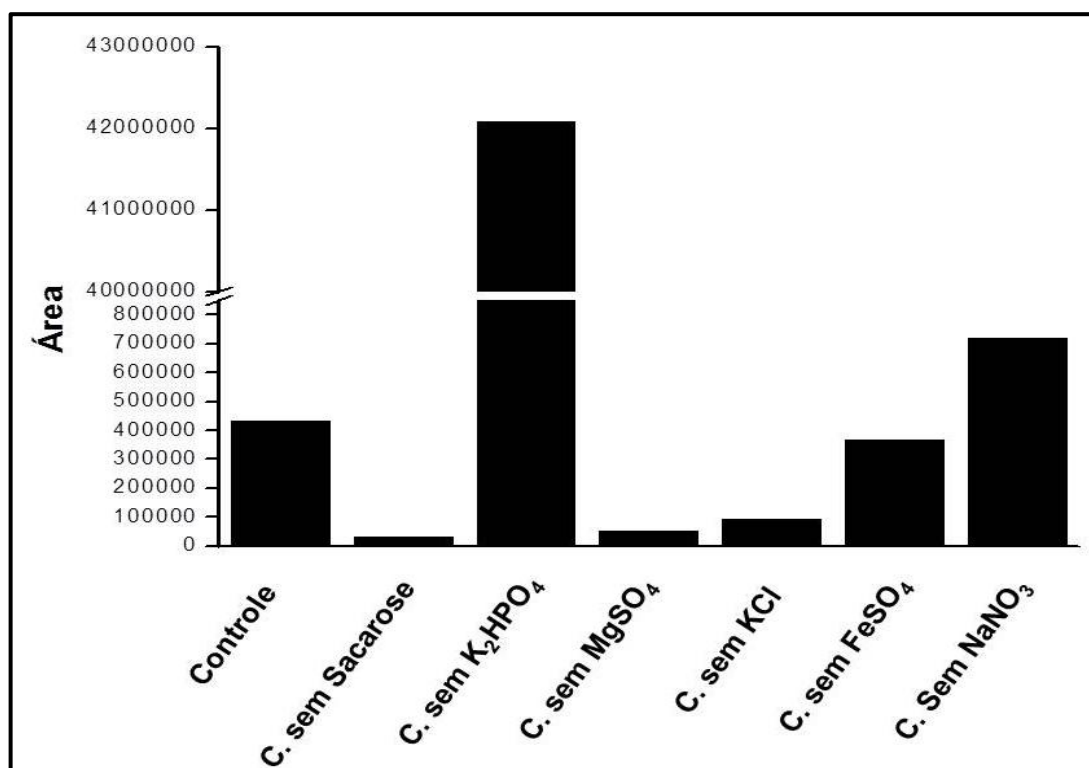
#### 4.6 Avaliação da influência na variação dos nutrientes do meio de cultivo Czapeck, na produção de nigericina

Actinobactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas como fontes produtoras de antibióticos, e essa capacidade de produzirem antibióticos não é uma propriedade fixa, pois pode ser aumentada ou completamente diminuída em diferentes condições de nutrição e cultivo. Portanto, a constituição do meio de cultivo (de fontes de carbono, nitrogênio, fosfato e íons metálicos, entre outros) em conjunto com a capacidade metabólica do microrganismo, gera grande influência na biossíntese de antibióticos. Assim, para se atingir a máxima produção de antibióticos por actinobactérias do gênero *Streptomyces*, é necessário avaliar as condições nutricionais do meio de cultivo e seus efeitos na produção de antibióticos.<sup>66,67,68</sup>

Sabendo da importância da influência dos nutrientes do meio de cultivo, na produção de antibióticos, foi realizado um estudo para avaliar a influência de cada nutriente do meio Czapeck na produção de nigericina. O estudo foi realizado preparando 6 meios Czapeck modificados com a ausência de um de seus 6 nutrientes (Sacarose,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ , KCl,  $FeSO_4$  e  $NaNO_3$ ) e comparando com um meio Czapeck sem alteração nos seus nutrientes (Controle), os experimentos foram realizados como descrito no item 3.8 (página 33).

Após as fermentações, todos os extratos brutos de cada fermentação foram submetidos a análises de UPLC-MS. A partir dos resultados de UPLC-MS obtidos, calculou-se área do sinal de nigericina nos cromatogramas e

comparou-se qual extrato produziu mais nigericina com relação ao controle como mostra a Figura 17.



**Figura 19.** Coparação das áreas de nigericina dos extratos dos 7 meios testados, Controle (Czapeck) e Czapeck sem: Sacarose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KCl, FeSO<sub>4</sub> e NaNO<sub>3</sub>.

A partir destes resultados podemos observar que a produção de nigericina no meio Czapeck sem K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> foi muito maior do que em relação ao meio Czapeck (controle) (Figura 17). Esse aumento foi de aproximadamente 100 vezes. Esse resultado mostra que o fosfato causa a inibição da biossíntese da nigericina na actinobactéria EUCAL 26. Podemos observar que nos meios Czapeck sem Sacarose, MgSO<sub>4</sub> e KCl a produção de nigerlcina foi aproximadamente 93, 88 e 78% menor, respectivamente, com relação ao meio Czapeck controle, o que mostra a importância da presença destes nutrientes no meio de cultivo para a produção de nigericina. Já o meio Czapeck sem FeSO<sub>4</sub>, apresentou uma pequena diminuição na produção de nigericina, de

aproximadamente 15% com relação ao meio Czapeck controle. E por fim, o meio Czapeck sem NaNO<sub>3</sub> também apresentou um aumento na produção de nigericina de aproximadamente 70% com relação ao meio Czapeck controle.

A literatura discute bastante a influência de nutrientes dos meios de cultivo na produção de antibióticos produzidos por *Streptomyces*. Claus Lubbe estudou a influência de diferentes concentrações de fonte fosfato inorgânico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), na produção do antibiótico cefalosporina, produzido pela actinobactéria *Streptomyces clavuligerus*. Os autores observaram que altas concentrações de fosfato no meio de cultivo diminuíram a produção da cefalosporina, e concluiu que esse efeito é causado pela inibição ou supressão da enzima desacetoxicefalosporina C sintetase (atividade expansão do anel) envolvida na biossíntese do antibiótico cefalosporina.<sup>69</sup> Assim a grande concentração de fosfato no meio Czapeck deve estar inibindo alguma enzima da biossíntese de nigericina, por isso esse grande aumento na produção de nigericina no meio Czapeck sem K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. O meio Czapeck sem Sacarose gerou uma grande diminuição na produção de nigericina, isso ocorre devido a necessidade da fonte de carbono na produção de antibióticos por *Streptomyces*, que esta relacionada com o crescimento celular e produção de metabolitos secundários.<sup>70</sup> Isso foi observado, pois a EUCAL 26 pouco cresceu no meio Czapeck sem Sacarose, e a produção de nigericina foi mínima. O meio Czapeck sem MgSO<sub>4</sub>, também mostrou uma diminuição significativa na produção de nigericina, a literatura descreve que íons bivalentes como Mg<sup>2+</sup> apresentam influência na biossíntese de antibióticos, e é também um estimulante de crescimento.<sup>71</sup> O Mg<sup>2+</sup> deve estar relacionado como cofator enzimático na biossíntese de nigericina, isso explica a baixa produção da

mesma no meio Czapeck sem  $\text{MgSO}_4$ . No meio Czapeck sem KCl também houve diminuição da produção de nigericina, isso ocorre devido a influência de íons metálicos como o  $\text{K}^+$  na biossíntese de antibióticos produzidos por *Streptomyces*<sup>72</sup>. Portanto a diminuição na concentração de  $\text{K}^+$  no meio Czapeck sem KCl (este meio possui fonte de  $\text{K}^+$ , o  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), gerou uma diminuição na produção de nigericina. O meio Czapeck sem  $\text{FeSO}_4$  apresentou uma pequena diminuição na produção de nigericina, isso ocorre porque cátions bivalentes como  $\text{Fe}^{2+}$  influenciam a produção de polienos por *Streptomyces*<sup>73</sup>, que são intermediários na biossíntese de polímeros ióforos<sup>32</sup>.

Assim podemos concluir que, a retirada de nutrientes do meio Czapeck apresentou grande influência na produção de nigericina pela EUCAL 26, e o meio mais promissor onde se obteve a maior produção de nigericina foi o meio Czapeck sem  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Os outros nutrientes como Sacarose,  $\text{MgSO}_4$ , KCl e  $\text{FeSO}_4$  se mostraram fundamentais para produção de nigericina. Porém não pode-se tirar conclusões sobre a influência do  $\text{NaNO}_3$ , pois os resultados dos dois experimentos foram totalmente diferentes.

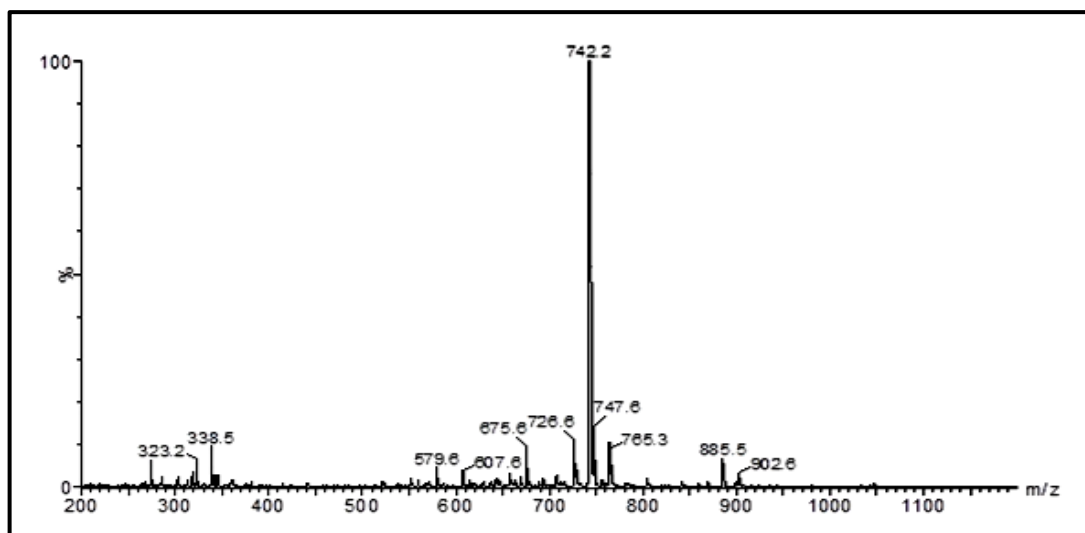
#### 4.7 Teste de resíduos agroindustriais como meios de cultivo para produção de nigericina.

Devido a grande produção mundial de resíduos agroindustriais, uma tendência crescente é a conversão destes resíduos agroindustriais de forma mais eficiente, em uma gama de bioprodutos de valor agregado. Além disso, o bioprocessamento destes resíduos pode ajudar a resolver os problemas ambientais relacionados com o seu descarte. O desenvolvimento de processos mais eficientes, com potencial para agregar valor a esses resíduos



agroindustriais se tornou um dos maiores desafios da biotecnologia. Portanto, o desenvolvimento de novos bioprocessos para converter esses resíduos em intermediários industriais e produtos finais é um ponto-chave para um futuro sustentável.<sup>74</sup>

Sabendo da grande importância sustentável de se produzir alvos a partir de bioprocessos envolvendo resíduos agroindustriais, foi realizado um estudo da utilização de dois resíduos agroindustriais como meios de cultivo, o meio “Farmal” e o meio “Melaço de Soja”, para produção de nigericina a partir da actinobacteria EUCAL 26. Os experimentos foram realizados como descrito no item 3.9 (página 33). Após as fermentações, notou-se que não houve crescimento da EUCAL 26 no meio de “Farmal”. Já para o de “Melaço de Soja” houve um bom crescimento da EUCAL 26. O extrato bruto da fermentação no meio de “Melaço de Soja” foi submetido a análise de ID-MS, para observar se houve produção de nigericina, através da presença do íon da nigericina no espectro. A Figura 18 mostra o espectro de ID-MS do extrato bruto do meio de “Melaço de Soja”, o íon de  $m/z$  742 ( $[M+NH_4]^+$ ) no espectro indica que houve a produção de nigericina, como componente principal. Esse resultado é bastante interessante, pois a partir de um resíduo agroindustrial se produz somente a nigericina através de um processo fermentativo em grandes quantidades.



**Figura 20.** Espectro de ID-MS do extrato bruto do meio de cultivo de “Melaço de Soja”.

A partir deste resultado, os extratos brutos do meio de “Melaço de Soja” e do meio Czapeck foram submetidos a análises de UPLC-MS, para análise comparativa de produção de nigericina. A partir dos resultados de UPLC-MS obtidos, calculou-se área do sinal de nigericina nos cromatogramas e comparou-se qual extrato produziu mais nigericina como mostra a Tabela 07.

**Tabela 07.** Resultados das áreas dos UPLC-MS dos extratos brutos dos meios Czapeck e “Melaço de Soja”

	Área (e <sup>6</sup> )
<b>Czapeck</b>	0,142
<b>Melaço de Soja</b>	42,793

Os resultados da Tabela 07 mostram que a actinobactéria EUCAL 26 no meio de “Melaço de Soja” produziu uma quantidade de nigericina muito maior do que em meio Czapeck, aproximadamente 300 vezes mais. Este resultado é bastante promissor, pois é possível se produzir uma grande quantidade de nigericina a partir de uma pequena quantidade do resíduo agroindustrial

“Melaço de Soja” (2% em água). Isso pode ter ocorrido, pois o “Melaço de Soja” é um meio complexo rico em açúcares como glicose, frutose, sacarose, rafinose, entre outros. A literatura fala que açúcares são geralmente uma excelente fonte de carbono para o crescimento celular, e que apresentam grande influência na formação de antibióticos.<sup>75</sup>

A partir destes resultados podemos concluir que dos dois resíduos agroindustriais testados como meio de cultivo para a actinobactéria EUCAL 26, o “Melaço de soja” foi o mais promissor, pois seu extrato bruto gerado produziu basicamente nigericina, além disso, a quantidade de nigericina produzida foi muito maior em relação a quantidade de nigericina produzida no extrato do meio Czapeck. Já o resíduo agroindustrial “Farmal” inibiu o crescimento da actinobactéria EUCAL 26, portanto não se mostrou promissor na produção de nigericina.

#### 4.8 Bioensaios antimicrobianos da nigericina contra bactérias da mastite

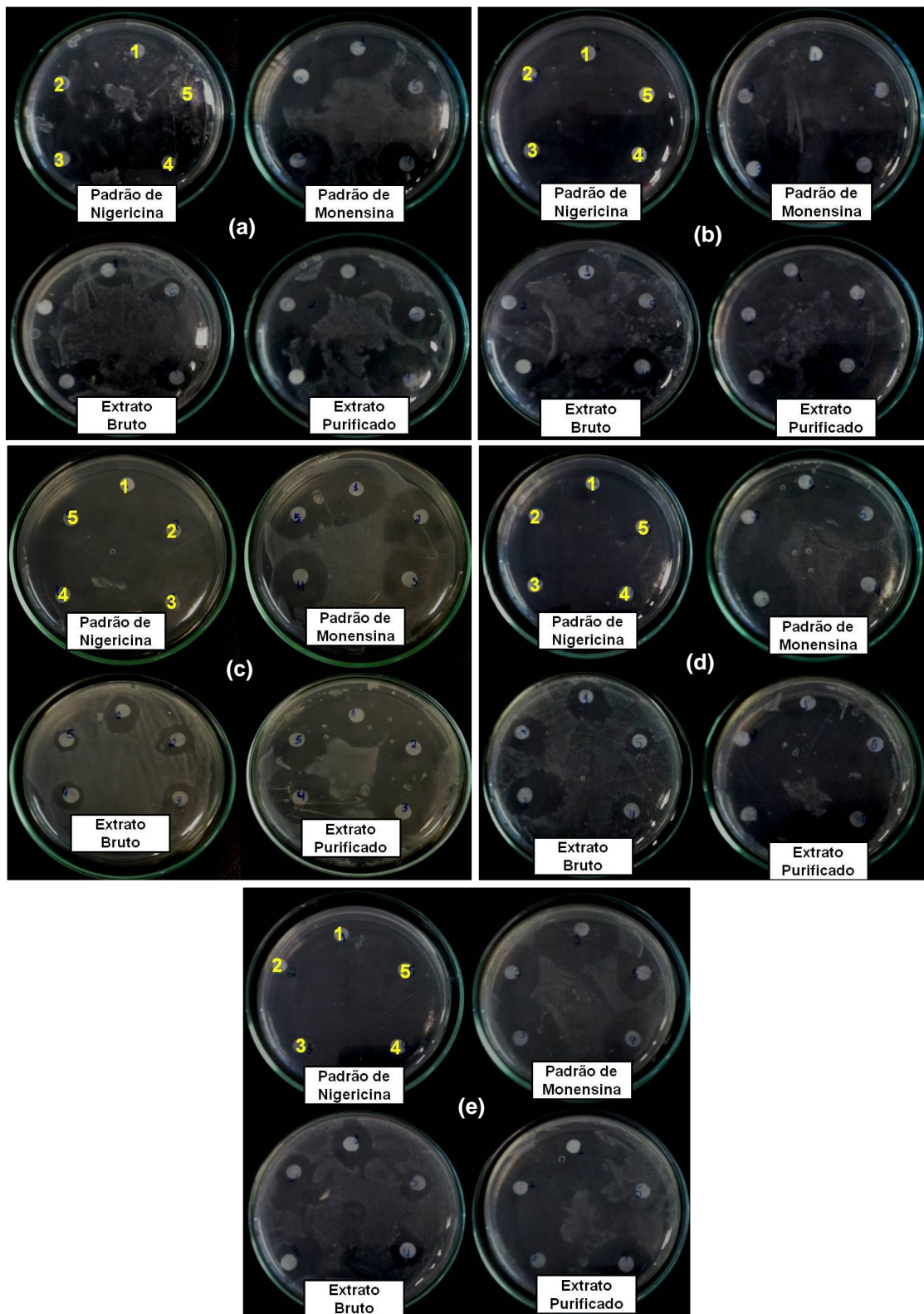
A mastite é uma doença causada por microrganismos patogênicos que produzem toxinas que geram uma reação inflamatória da glândula mamária. Devido a esta inflamação, a composição do leite é alterada com a diminuição de nutrientes como a caseína e a lactose, e na qualidade da gordura. A mastite representa uma doença relevante na pecuária leiteira, devido à má qualidade do leite, perda de funcionalidade das glândulas mamárias, e às vezes levando até a morte do animal. A mastite é causada por bactérias de diferentes genes e espécies, como a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, entre outras. No mundo todo, a

mastite causa um grande o déficit econômico na pecuária leiteira. O tratamento mais comum da mastite é realizado com o uso de antibióticos, porém o uso desses antibióticos comerciais vem criando linhagens de bactérias da mastite mais resistentes.<sup>76,77,78</sup>

Sabendo da importância da doença da mastite, e da importância da descoberta novos tratamentos contra as bactérias causadoras da mastite, foram realizados bioensaios, para avaliar a influência da nigericina produzida pela EUCAL 26 em 5 tipos diferentes de bactérias causadoras da mastite, como descrito no item 3.10 (página 34).

O extrato bruto utilizado nos bioensaios foi produzido pela EUCAL 26 em meio Czapeck. Parte desse extrato foi purificado por cromatografia em coluna de permeação em gel, como descrito no item 3.2, as frações coletadas foram submetidas a análises de ID-MS, e as frações que apresentaram o íon característico da nigericina nos espectro de massas foram agrupadas, obtendo-se um extrato purificado de nigericina. Esse extrato purificado de nigericina também foi testado nos bioensaios. Para análise comparativa dos extratos bruto e purificado, foram testados também nos bioensaios o padrão comercial de nigericina, e padrão comercial de monensina, que é o antibiótico poliéter ionóforo mais usado comercialmente.

Os resultados obtidos nos bioensaios para cada uma das 5 bactérias da mastite testadas, *Staphylococcus chromogenes* (42), *Streptococcus agalactiae* *Staphylococcus aureus* (97), *S. aureus* (211), *S. aureus* (212) e *S. aureus* (213) estão representados na Figura 19.



\*As soluções dos padrões e os extratos foram testadas em 5 concentrações diferentes, os números nos discos representam as concentrações: o 1 a 1 mg/ml, o 2 a 500 µg/mL, o 3 a de 250 µg/mL, o 4 a de 125 µg/mL e o 5 a de 62,5 µg/mL.

**Figura 21.** Bioensaios usando soluções de padrão de nigericina e monensina, extrato bruto e extrato purificado contra 5 tipos de bactérias da mastite: (a) 42, (b) 97, (c) 211, (d) 212 e (e) 213.

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios podemos observar que o padrão de nigericina inibiu o crescimento de todas as cinco bactérias testadas, essa inibição total pode ter ocorrido pela sobreposição dos halos de inibição das 5 concentrações testadas, mostrando que a nigericina apresenta uma grande atividade contra as bactérias da mastite. O padrão de monesina apresentou também uma relevante inibição no crescimento das 5 bactérias da mastite, porém essa inibição foi menor que o padrão de nigericina pois os halos de inibição do padrão monensina foram menores do que os do padrão de nigericina. Para o extrato bruto podemos observar que ele apresentou inibição a todas as bactérias testadas, nas 5 diferentes concentrações. E que mesmo em baixas concentrações a nigericina presente no extrato bruto apresentou atividade a todas bactérias da mastite testadas. Por fim o extrato purificado apresentou uma relevante inibição a todas bactérias, próxima a do padrão de nigericina, mostrando que a purificação da nigericina presente no extrato bruto foi eficaz.

As 5 bactérias testadas são dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que são bactérias do tipo Gram-positivas, a literatura fala que antibióticos poliéteres ionóforos possuem atividade contra bactérias Gram-positivas<sup>21,22</sup>, como a nigericina e a monensina pertencem a essa classe de antibióticos, isso pode explicar a atividade que apresentaram contra as bactérias da mastite. A diferença de inibição que houve entre a nigericina e a monensina ocorre porque poliéteres ionóforos apresentam mecanismos de ação diferentes na célula, que está relacionada com a afinidade dessa classe de compostos por cátions metálicos<sup>19</sup>. Robert S. Wehbie mostra em seu trabalho que poliéteres ionóforos induzem perda de  $K^+$  em bactérias do gênero

*Streptococcus*<sup>79</sup>, a nigericina possui grande afinidade por potássio<sup>80</sup> já a monensina possui mais afinidade por sódio do que por potássio<sup>81</sup>, isso pode explicar porque a nigericina pode ter um mecanismo de ação nas bactérias da mastite mais efetivo do que o da monensina.

A partir destes resultados podemos concluir que os antibióticos poliéteres ionofóros nigericina e monensina apresentaram atividade contra 5 tipos de bactérias da mastite, destacando-se a nigericina que apresentou uma atividade antibiótica maior que a monensina. Destaca-se também que a nigericina mesmo em concentrações baixas presentes no extrato bruto apresentou atividade contra as 5 bactérias da mastite testadas. Portanto a nigericina se torna um antibiótico promissor para o tratamento da mastite.

#### 4.9 Outros bioensaios realizados com o extrato bruto produzido pela da EUCAL 26 em meio Czapeck

Em colaboração com o nosso grupo de pesquisa, outros dois centros de pesquisas realizaram estudos de bioensaios, utilizando o extrato bruto produzido pela actinobactéria EUCAL 26 em meio Czapeck, para avaliar a atividade da nigericina frente a diversas linhagens de bactérias. O grupo do Marcelo Brocchi do Instituto de Biologia da Unicamp, testou o extrato bruto da EUCAL 26, em 17 linhagens de diferentes bactérias (descritas na Tabela 08). Esses testes foram realizados, e observando os halos de inibição.

**Tabela 08.** Linhagens das bactérias testadas nos bioensaios, e descrição da atividade do extrato bruto da EUCAL 26: (+) apresentou atividade e (-) não apresentou atividade

Bactéria testada	Atividade do Extrato Bruto
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-
<i>S. aureus</i> Bec 9393	-
<i>S. aureus</i> N315	+
<i>S. aureus</i> Rib 1	+
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+
<i>Enterococcus faecalis</i> 6778	+
<i>E. faecalis</i> 1614	+
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+
<i>Enterococcus faecium</i> 6569	+

Podemos observar na Tabela 08 que o extrato bruto da EUCAL 26, dentre as 13 linhagens testadas nos bioensaios, apresentou atividade contra 9 linhagens. Dentre essas 9 linhagens de bactérias com exceção da bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853, todas são do tipo Gram-positivas. Como a nigericina possui grande atividade contra bactérias do tipo Gram-positivas, isso explica a atividade apresentada sobre estas 8 linhagens de bactérias. Já a *P. aeruginosa* ATCC 27853 é uma bactéria do tipo Gram-negativa, e a nigericina mostrou atividade, isso pode ser explicado pelo trabalho de Paul D. Shaw, que mostrou que a nigericina apresenta também atividade contra bactérias do tipo Gram-negativas, porém a concentração de nigericina capaz de inibir o crescimento dessas linhagens de bactérias é muito maior do que a concentração de nigericina necessária para inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas.<sup>82</sup> Em outro trabalho Thongchai Taechowisan mostrou que a nigericina



apresentou atividade sobre essa mesma bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853<sup>83</sup>, o que comprova a atividade da nigeцина sobre essa linhagem de bactéria.

A pesquisado Dra. Andressa Berreta da empresa Apis Flora, também realizou bioensaios com o extrato bruto da EUCAL 26 contra algumas linhagens de bactérias. A metodologia empregada envolveu a utilização de microdiluição em microplaca, seguindo os preceitos do CLSA. As cepas dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *S.aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram repicadas em meio de cultura Muller Hinton (MH) e mantidas a temperatura de 37°C por 16 horas. Após esse período foram preparadas suspensões de cada microrganismo a  $1 \times 10^8$  células/ml. Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 100 ul de meio de cultura MH, partindo da segunda coluna da placa. Em seguida, foi adicionado ao primeiro poço 200 ul da solução da droga a ser testada. A partir dessa coluna, fez-se diluição seriada até a última coluna, descartando-se 100 ul. Adicionou-se 10 ul da suspensão previamente preparada, sendo o equivalente à  $5 \times 10^5$  células/ml. Finalmente, adicionou-se 90 ul de MH em cada poço. Cada adição foi seguida pela apropriada homogeneização do conteúdo. As placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, adicionou-se a cada poço 40 ul de solução aquosa a 0,2% de MTT para a avaliação da viabilidade celular, sendo que a realização da leitura foi efetuada após 30 minutos de incubação à temperatura de 37°C. Os poços corados em violeta indicam a presença de microrganismos viáveis, enquanto à coloração amarela indica a morte dos microrganismos. Os resultados estão representados na Tabela 09.

**Tabela 09.** Apresentação da concentração bactericida mínima (CBM) (n=3) do extrato bruto da EUCAL 26 frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*,

*S.aureus* MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.  
Resultados expressos em µg/ml

<b>Amostras Microrganismos</b>	<b>E. B. EUCAL 26</b>
<i>S. aureus</i>	3,12
<i>S. aureus</i> MRSA	6,25
<i>S. epidermidis</i>	6,25
<i>E. coli</i>	>100
<i>P. aeruginosa</i>	>100

Podemos observar na Tabela 09 que o extrato bruto da EUCAL 26 apresentou atividade sobre as 5 linhagens de bactérias testadas. O extrato bruto da EUCAL 26 apresentou CBM baixas sobre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, mostrando a grande atividade de nigericina sobre bactérias Gram-positivas. Estes resultados reproduzem o trabalho de Shaw mostrou que a nigericina inibiu bactérias Gram-positivas em concentrações baixas. Já para as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*, o extrato bruto da EUCAL 26 apresentou CBM altas, o que mostra que a nigericina possui uma atividade menor sobre bactérias Gram-negativas em relação a bactérias Gram-positivas, como no trabalho de Shaw.

A partir destes resultados, podemos concluir que o extrato bruto da EUCAL 26, como no item 4.8 apresentou atividade sobre diferentes linhagens de bactérias Gram-positivas, e apresentou também atividade sobre bactérias Gram-negativas como a *E. coli* e *P. aeruginosa*, porém em concentrações de extrato bruto maiores, o mostra que a nigericina possui maior atividade sobre as bactérias Gram-positivas.

#### 4.10 Identificação da espécie da actinobactéria EUCAL 26

O trabalho de identificação da espécie da actinobactéria EUCAL 26, foi realizado pela aluna de Doutorado Ana Paula Ferranti do nosso grupo de pesquisa com a colaboração do pesquisador Tiago Domingues Zucchi do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa do Meio Ambiente - Jaguariúna.

Para a identificação da espécie da EUCAL 26, foi extraído o seu DNA pelo kit Invitrogen. Através da técnica de PCR a sequência do gene 16S rRNA foi amplificada, utilizando-se os devidos primers. Após o sequenciamento foi possível encontrar 99,6% de similaridade com a actinobactéria *Streptomyces yogyakartaensis*, com 5 nucleotídeos diferentes em 1267, em comparação a sequência depositada no banco de dados GenBank para tal actinobactéria.

# Conclusão

## 5. Conclusão

Com base nos principais resultados obtidos deste trabalho podemos concluir que dentre as duas linhagens de actinobactérias (EUCAL 26 e 74) fermentadas em 5 meios de cultivo diferentes (BD, Czapek, ISP2, M29 e TSB), a EUCAL 26 se mostrou eficiente na produção do antibiótico nigericina quando fermentada em meio Czapeck.

O planejamento fatorial fracionário se mostrou eficaz para determinar os experimentos para se obter as melhores condições de pH do meio e temperatura de fermentação (7 e 25 °C) da EUCAL 26 em meio Czapeck, para a máxima produção de nigericina.

Também foi possível determinar o período de fermentação onde se obtenha a máxima produção (27 dias) de nigericina pela EUCAL 26 em meio Czapeck em pH 7 a 25 °C.

No estudo empregando diferentes  $\gamma$ -butirolactonas sintéticas podemos concluir que a  $\gamma$ -butirolactona DP21A, foi a mais eficiente. Pois além aumentar a produção de nigericina ela acelerou o processo de produção. As  $\gamma$ -butirolactonas DPM54B, PR11A e DPM32C causaram inibição da produção de nigericina quando adicionadas ao meio de.

A retirada de nutrientes do meio Czapeck apresentou grande influência na produção de nigericina pela EUCAL 26, e o meio mais promissor onde se obteve um aumento de 100 vezes na produção de nigericina foi o meio Czapeck sem  $K_2HPO_4$ . Os outros nutrientes como Sacarose,  $MgSO_4$ , KCl e  $FeSO_4$  se mostraram fundamentais para produção de nigericina. Porém não se

pôde tirar conclusões sobre a influência do  $\text{NaNO}_3$  na produção de nigericina, devido a resultados não conclusivos obtidos neste estudo.

O emprego do Melaço de Soja mostrou-se bastante promissor para a produção de nigericina. A utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultivo para a produção de antibióticos, diminui o custo de produção e contribui para o meio ambiente.

Os estudos de atividade antimicrobianas estão de acordo com os descritos na literatura, onde a nigericina mostrou-se mais ativa para bactérias Gram-positivas.

A utilização das técnicas de ID-MS, LC-MS, UPLC-MS, MS/MS se mostraram bastante eficientes tanto para análises qualitativas quanto para análises quantitativas, pois foi possível analisar perfis químicos dos extratos brutos produzidos pelas actinobactérias EUCAL 26 e 74.

# Referências

## 6. Referências

1. Kato, N.; Takahashi, S.; Nogawa, T.; Saito, T.; Asenjo, H. O.; *Construction of a microbial natural product library for chemical biology studies* **Current O. Chem. Biology** 2012, 16, 101-108.
2. Li, J. W.-H.; Vederas, J. C. *Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?* **Science**, 325, 161-165, 2009.
3. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010* **J. Nat. Prod.** 2012, 75, 311–335.
4. Lugo, G.; Bologna, C. G.; Ursu, O.; Oprea, T.; Melançon, C. E.; Tegos, G. P.; *Emerging trends in the discovery of natural product antibacterials* **Current O. Pharm.**, 2013, 13, 678-687.
5. Koehn, F. E.; Carter, G. T. *The evolving role of natural products in drug discovery* **Nat. Rev. Drug Discov.**, 4, 206-220, 2005.
6. Norrby, S. R.; Nord, C. E.; Finch, R.; *Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health* **Lancet Infect Dis** 2005, 5, 115-119.
7. Watve, M. G.; Tickoo, R.; Jog, M. M.; Bhole, B. D.; *How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?* **Arch. Microbiol.**, 2001, 176, 386–390.
8. Barrett, J. F.; *Can biotech deliver new antibiotics?* **Current O. Microbiol.** 2005, 8, 498-503.
9. Wright, G.D.; *Q&A: antibiotic resistance: what more do we know and what more can we do?* **BMC Biology** 2013, 11, p. 51.
10. Bush, K.; Macielag, M.; Wells, M. W.; *Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond phase 1* **Current O. Microbiol.** 2004, 7, 466-476.
11. Chater, K. F.; Biró, S.; Lee, K. J.; Palmer, T.; Schrempf, H. *The complex extracellular biology of Streptomyces* **FEMS Microbiol. Rev**, 34, 171-198, 2009.
12. Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Sivakumar, K.; Kim, S.; *Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria* **Microbio. Research**, 2014, 169, 262-278.
13. Ohnishi, Y.; Ishikawa, J.; Hara, H.; Suzuki, H.; Ikenoya, M.; Ikeda, H.; Yamashita, A.; Hattori, M.; Horinouchi, S.; *Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism Streptomyces griseus IFO 13350* **J. Bacteriol.**, 2008, 190, 4050-4060.
14. Bosso, J. A.; Mauldin, P. D.; Salgado, C. D.; *The association between antibiotic use and resistance: the role of secondary antibiotics* **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 2010, 29, 1125-1129.



15. Procópio, R. E. L.; Silva, I. R.; Martins, M. K.; Azevedo, J. L.; Araújo, J. M.; *Antibiotics produced by Streptomyces* **The Brazilian J. of Infect. Di.** 2012, 16, 466-471
16. Bohn, P.; Bak, S. A.; Björklund, E.; Krogh, K. A.; Hansen, M.; *Abiotic degradation of antibiotic ionophores* **Enviro. Pollution**, 2013, 177-183.
17. Dutton, C. J.; Banks, B. J.; Cooper, C. B.; *Polyether ionophores* **Nat. Prod. Rep.** 1995,12, 165-181.
18. Mollenhauer, H. H.; Morré, D. J.; Rowe, L. D.; *Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity* **Bio. et Biophysica Acta** 1990, 1031, 225-246.
19. Novilla M. N.; *Chapter 83 – Ionophores* **Vet. Toxic.** 2007, 1021-1041.
20. Lindoy, L. F.; *Outer-sphere and inner-sphere complexation of cations by the natural ionophore lasalocid* **A Coord. Chem. Reviews** 1996,148, 349-368.
21. Spizek, Pressman, B. C.; Fahim, M.; *Pharmacology and Toxicology of the Monovalent Carboxylic Ionophores* **Annual Rev. Pharm. Toxic.** 1982, 22, 465-490.
22. Kevin, D. A.; Meujo, D. A. F.; Hamann, M. T.; *Polyether ionophores: Broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites* **E. Opin. Drug Disc.** 2009, 4, 109-146.
23. Cha, J. M.; Yang, S.; Carlson, K. H.; *Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection* **J. of Chromat. A** 2005, 1065, 187-198.
24. De Oliveira, Russell, J. B; Strobel, H. J; *Effect of ionophores on ruminal fermentation* **Appl Env. Microbiol.** 1989, 55, 1-6.
25. Huczyński, A.; *Polyether ionophores-promising bioactive molecules for cancer therapy* **Bioorg. Med. Chem. Letters** 2012, 22, 7002-7010.
26. Donadio Shavit, N.; Dilley, R. A.; Pietro, S.; *A Ion translocation in isolated chloroplasts. Uncoupling of photophosphorylation and translocation of K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> ions induced by nigericin* **Biochemistry** 1968, 7, 2356-2363.
27. El Sayed, Rottenberg, H.; Scarpa, A.; *Calcium uptake and membrane potential in mitochondria* **Biochemistry** 1974, 13, 4811-4817.
28. Eytan, G. D.; Carlenor, E.; Rydstrom, J.; *Energy-linked transhydrogenase. Effects of valinomycin and nigericin on the ATP-driven transhydrogenase reaction catalyzed by reconstituted transhydrogenase-ATPase vesicles* **J. Biol. Chem.** 1990, 265, 12949-12954.

29. Adovelande, J.; Schrevel, J.; *Carboxylic ionophores in malaria chemotherapy: the effects of monensin and nigericin on Plasmodium falciparum in vitro and Plasmodium vinckei petteri in vivo* **Life Sci.** 1996, 59, 309-315.
30. Chlipala, G.; Myskiwb, C.; Pipera, J.; Huzarewicha, R.; Bootha, T. F.; Caoa, J.; He, R.; *Nigericin is a potent inhibitor of the early stage of vaccinia virus replication* **Ant. Research** 2010, 88, 304-310.
31. Deng, C.; Liang, L.; Wu, M.; Feng, F.; Hu, W.; Chen, L.; Feng, Q.; Bei, J.; Zeng, Y.; *Nigericin selectively targets cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma* **The I. J. Bioche. Cell Biol.** 2013, 45, 1996-2006.
32. Cane, D. E.; Celmer, W. D.; Westley, J. W., *Unified stereochemical model of polyether antibiotic structure and biogenesis* **J. Am. Chem. Soc.** 1983, 105, 3594-3600.
33. Holmes, D. J.; Sherringham, J. A.; Dyer, U. C.; Russell, S. T.; Robinson, J. A., *Synthesis of putative intermediates on the monensin biosynthetic pathway and incorporation experiments with the monensin-producing organism* **Helv. Chim. Acta** 1990, 73, 239-259.
34. Fabbretti, A.; Gualerzi, C.O.; Brandi, L.; *How to cope with the quest for new antibiotics* **FEBS Letters** 2011, 585, 1673-1681.
35. Clay, A. T. K.; *The structures of type I polyketide synthases* **Nat. Prod. Rep.** 2012, 29, 1050-1073.
36. Hur, G. H.; Vickery, C. R.; Burkart, M. D.; *Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology* **Nat. Prod. Rep.** 2012, 29, 1074-1098.
37. Knerr, P. J.; Oman, T. J.; Gonzalo, C. V. G.; Lupoli, T. J.; Walker, S.; van der Donk, W.A.; *Non-proteinogenic amino acids in lacticin 481 analogues result in more potent inhibition of peptidoglycan transglycosylation* **ACS Chem. Biol.** 2012, 7, 1791-1795.
38. Harvey, C. J.; Puglisi, J. D.; Pande, V. S.; Cane, D. E.; Khosla, C.; *Precursor directed biosynthesis of an orthogonally functional erythromycin analogue: selectivity in the ribosome macrolide binding pocket* **J. Am. Chem. Soc.** 2012, 134, 12259-12265.
39. Kawabuchi, M.; Hara, Y.; Nihira, T.; Yasuhiro, Y.; *Production of butyrolactone autoregulators by Streptomyces coelicolor A3(2)* **FEMS Microbio. Letters** 1997, 157, 81-85.
40. Yang, Y.; Shimizu, H.; Shioya, S.; Suga, K.; Nihira, T.; Yamada, Y.; *Optimum autoregulator addition strategy for maximum virginiamycin production in batch culture of Streptomyces virginiae* **Biotec. Bioeng.** 1995, 46, 437-442.
41. Pejó, P. E. T.; Negro, M. J.; Sáez, F.; Ballesteros, M.; *Effect of nutrient addition on preinoculum growth of S. cerevisiae for application in SSF processes* **Bio. Bioen.** 2012, 45, 168-174.

42. Wanga, Z. W.; Liua, X. L.; *Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated Paenibacillus sp. using response surface methodology* **Biores. Techn.** 2008, 99, 8245-8251.
43. Abe, F.; Prather, K. L. J.; *The 'new' biotech industry* **Cur. Opin. Biotec.** 2013, 24, 963-964.
44. L. A.; Calado, V.; Montgomery D. C.; *Planejamento de experimentos usando o Statistica* 2003, 43-104.
45. de Carvalho, C. C. C. R.; Sandvossa, M.; Weltringa, A.; Preissa, A.; Levsena, K.; Wuenschb, G.; *Combination of matrix solid-phase dispersion extraction and direct on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy–tandem mass spectrometry as a new efficient approach for the rapid screening of natural products:: Application to the total asterosaponin fraction of the starfish Asterias rubens* **J. of Chromat. A** 2001, 917, 75-86.
46. Hostettmann, K.; Potterat, O.; Wolfender, J. L.; *The potential of higher plants as a source of new drugs* **Chimia** 1998, 52, 10-17.
47. Sashidhara, K. V.; Rosaiah, J.N.; *Various dereplication strategies using LC-MS for rapid natural product lead identification and drug discovery* **Nat. Prod. Com.** 2007, 2, 193-202.
48. Wolf D.; Siems, K.; *Burning the Hay to Find the Needle-Data Mining Strategies in Natural Product Dereplication* **Chimia** 2007, 61, 339-345.
49. Garcia, D. E.; Baidoo, E. E.; Benke, P. I.; Pingitore, F.; Tang, Y. J.; Villa, S.; Keasling, J. D.; *Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics* **Curr. Opin. Microbiol.** 2008, 11, 233-239.
50. Kai, M.; De Vos, R. C. H.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J. J. B.; Bino, R. J.; Hall, R. D.; *Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry* **Nat. Prot.** 2007, 2, 778-791.
51. Glish, G. L.; Burinsky, D. J.; *Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry* **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 2008, 19, 161-172.
52. Ho, C.; Lam, C.; Chan, M.; Cheung, R.; Law, L.; Lit, L.; Ng, K.; Suen, M.; Tai, H.; *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications* **Clin. Biochem. Rev.** 2003, 24, 3-12.
53. Swartz, M. E.; *UPLC™: An introduction and review* **J. Liq. Chromat. and Rel. Techn.** 2005, 28, 1253-1263.
54. He, L. C.; Wang, S.C.; Yang, G. D.; Zhang, Y. M.; Wang, C. H.; Yuan, B.X.; Hou, X. F.; *Progress in cell membrane chromatography* **Drug Discov. Ther.** 2007, 1, 104-107.

55. Gachon, P.; Kergomard, A. *Grisorixin, an ionophorous antibiotic of the nigericin group. I. Fermentation, isolation, biological properties and structure* **J. Antibiot.**, 28, 345-350, 1975.
56. Thom C, Raper KB (1945). *Manual of the aspergilli*. Baltimore: Williams and Wilkins, **1945**, p.39.
57. Schmidt, W. H.; Moyer, A. J. *Penicillin: I. Methods of assay* **J. Bact.**, 47, 199-208, 1944.
58. Shirling, R.; Gottlieb, D. *Cooperative description of type cultures of Streptomyces. 11. Species descriptions from first study* **Int J Syst Bacteriol.**, 18, 69-189, 1968.
59. Ujikawa, R. *Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais* **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, 39. 149-158, 2003.
60. Loss, E.; Royer, A. R.; Rodrigues, M. B.; Barana, A. C.; *Use of maize wastewater for the cultivation of the Pleurotus spp. mushroom and optimization of its biological efficiency* **J. of Hazard. Mat.** 2009, 166, 1522-1525.
61. Johnson, L. A.; Myers, D. J.; Burden, D. J.; *Soy Protein's History* **Prosp. in Food, Feed.** 1992, 3, 429-444.
62. Maa, F. X.; Kima, J. H.; Kima, S. B.; Seoa, Y. G.; Changb, Y. K.; Hongc, S. K.; Kima, C. J.; *Medium optimization for enhanced production of Rifamycin B by Amycolatopsis mediterranei S699: Combining a full factorial design and a statistical approach* **Proc. Bioch.** 2008, 43, 954-960.
63. Elibol, M.; *Optimization of medium composition for actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2) with response surface methodology* **Proc. Bioch.** 2004, 39, 1057-1062.
64. Natsume, R.; Ohnishi, Y.; Senda, T.; Horinouchi, S.; *Crystal Structure of a  $\gamma$ -Butyrolactone Autoregulator Receptor Protein in Streptomyces coelicolor A3(2)* **J. Mol. Biol.** , 336, 409–419.
65. Ueda, S.; Kinoshita, M.; Tanaka, F.; Tsuboi, M.; Shimizu, S.; Oohata, N.; Hino, M.; Yamada, M.; Isogai, Y.; Hashimoto, S.; *Strain selection and scale-up fermentation for FR901379 acylase production by Streptomyces sp. no. 6907* **J. of Biosc. Bioeng.** 2011, 112, 409-414.
66. Thakur, D.; Bora, T. C.; Bordoloi, G. N.; Mazumdar, S.; *Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by Streptomyces sp. 201* **J. of Med. Mycol.** 2009, 19, Pages 161-167.
67. Devi, S.; Sridhar, P.; *Optimization of critical parameters for immobilization of S. clavuligerus alginate gel matrix of Cephamicin C production* **W. J. Microbiol. Biotechnol.** 1999, 15, 167-173.

68. Raytapadar, S.; Paul, A. K.; *Production of an antifungal antibiotic by Streptomyces aburavirensis IDA-28* **Microbiol. Res.** 2001, 155, 315–323.
69. Lubbe, C.; Wolfe, S.; Demain, A. L.; *Repression and inhibition of cephalosporin synthetases in Streptomyces clavuligerus by inorganic phosphate* **Arch. of Microbiol.** 1985, 140, 317-320.
70. Jonsbu, E.; McIntyre, M.; Nielsen, J.; *The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by Streptomyces noursei* **J. of Biotech.** 2002, 95, 133-144.
71. Jia, Y.; Zhong, J. J.; *Enhanced production of ansamitocin P-3 by addition of Mg<sup>2+</sup> in fermentation of Actinosynnema pretiosum* **Biores. Techn.** 2011, 102, 10147-10150.
72. Liu, G.; Chater, K. F.; Chandra, G.; Niu, G.; Tan, H.; *Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in Streptomyces* **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 2013, 77, 112-143.
73. Gesheva, V.; Ivanova, V.; Gesheva, R.; *Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by Streptomyces hygroscopicus* **Microbiol. Res.** 2005, 160, 243-248.
74. Cinelli, B. A.; López, J. A.; Castilho, L. R.; Freireb, D. M. G.; Castro, A. M.; *Granular starch hydrolysis of babassu agroindustrial residue: A bioprocess within the context of biorefinery* **Fuel** 2014, 124, 41-48.
75. Demain, A. L.; Fang, A.; *Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes* **Actinomycetology**, 1995, 9, 98-117.
76. Fagundes, H.; Barches, L.; Filho N. A.; Ferreira, L. M.; Oliveira, C. A. F.; *Occurrence of Staphylococcus aureus in raw milk produced in dairy farms in Sao Paulo State, Brazil* **Braz. J. Microbiol.** 2010, 41, 376-380.
77. Zafalon, L. F.; Filho, A. N.; Oliveira, J. V.; Resende, F. D.; *Subclinical mastitis caused by Staphylococcus aureus: cost benefit analysis of antibiotic therapy in lactating cows* **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.** 2007, 59, 577-585.
78. Fratini, F.; Casella, S.; Leonardi, M.; Pisseri, F.; Ebani, V. V.; Pistelli, L.; Pistelli, L.; *Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis* **Fitoterapia** 2014, 96, 1-7.
79. Wehbie, R. S; Runsheng, C.; Lardy, H. A; *The antibiotic W341C, its ion transport properties and inhibitory effects on mitochondrial substrate oxidation* **J. of Antibio.** 1987, 40, 887-893.
80. Daniele, R. P.; Holian, S. K.; Nowell, P. C.; *A potassium ionophore (Nigericin) inhibits stimulation of human lymphocytes by mitogens* **J. of Exp. Med.** 1978, 147, 571-581.

- 
- 81.** Mollenhauer, H. H.; Morré, D. J.; Rowe, L. D.; *Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity* **Bioch. Bioph. Acta** 1990, 1031, 225-246.
- 82.** Shaw, P. D.; *Nigericin* **Mech. Act. Antibio.** 1967, 1, 613-616.
- 83.** Taechowisan, T.; Chanaphat, S.; Ruensamran, W.; Phutdhawong, W. S.; *Antibacterial activity of 1-methyl ester-nigericin from Streptomyces hygrosopicus BRM10; an endophyte in Alpinia galanga* **J. App. Pharm. Scie.** 2013, 3, 104-109.