

## Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais

Keidi Ujikawa

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp,  
Campus de Araraquara

*Várias amostras de solo do Brasil foram semeadas em placas de ágar e diversas cepas de actinomicetos produtoras de antibióticos antifúngicos foram isoladas. Foram desenvolvidos meios para eliciação da biossíntese dos antibióticos e métodos para determinação rápida do seu rendimento. Ao todo, foram isoladas 41 cepas de actinomicetos aeróbios produtoras de metabólitos antifúngicos. Destes, 11 (26,8%) eram macrolídeos tetraênicos, 13 (31,7%) macrolídeos pentaênicos, 1 (2,4%), macrolídeo oxopentaênico, 1 (2,4%) macrolídeo hexaênico e 6 (14,6%) macrolídeos heptaênicos. Os antibióticos antifúngicos produzidos pelas restantes 9 cepas ativas (21,9%) não eram poliênicos. Os poliênicos mais utilizados atualmente na clínica são do tipo tetraênico (nistatina) e heptaênico (anfotericina B). Um meio à base de leite de soja favoreceu extraordinariamente a eliciação da biossíntese de polienos por algumas cepas, enquanto que para outras não houve favorecimento e para outras foi prejudicial. Os rendimentos obtidos atingiram cerca de 6000 U de antibióticos poliênicos por mL.*

### Unitermos:

- Antibióticos antifúngicos
- Polienos
- Triagem de antibióticos
- Meios de cultura

### Correspondência:

K. Ujikawa  
Departamento de Fármacos e  
Medicamentos  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
– UNESP  
Caixa Postal 902  
14801-902 – Araraquara – SP  
Brasil  
E-mail: ujikawak@fcfar.unesp.br

## INTRODUÇÃO

As matas nativas de vastas regiões do Sul e Sudeste do Brasil, outrora bastante abundantes, foram queimadas para dar lugar a culturas e o pouco que resta está sendo sorrateiramente derrubado, com risco de total extinção da mata primitiva e, portanto, do microambiente necessário para preservação de diversidade microbiana, conforme foi constatado em diversas viagens realizadas. Outrossim, sabe-se que está se tornando cada vez mais rara a descoberta de novos tipos de antibióticos, encontrando-se apenas variações de classes conhecidas (Omura, 1992; Knowles, 1977). Se é

verdade que compostos de mesma classe química apresentam perfis de resistência antimicrobiana semelhantes, não é menos correto que pequenas variações na estrutura podem provocar grandes variações na farmacocinética e toxicidade. Assim, antibióticos da mesma classe, mas com pequenas diferenças estruturais, podem apresentar atividade seletiva contra células de permeabilidade alterada na membrana e nos centros ativos como as células tumorais. Portanto, julgou-se oportuno realizar um estudo de metabólitos farmacologicamente ativos produzidos por microrganismos da microbiota nativa antes da sua descaracterização por práticas antecológicas.

Por outro lado, considerando a grande variedade de compostos já identificados a partir de microrganismos em outros países, é de vital importância que se faça uma rápida avaliação dos metabólitos. Para o início da etapa de purificação das substâncias ativas objetivando a sua caracterização total é vantajoso ter métodos rápidos e precisos para classificar preliminarmente e quantificar as substâncias ativas presentes no meio com alto conteúdo de impurezas, antes mesmo de se conhecer a sua estrutura. A quantificação precisa permite estimar o volume do meio fermentado necessário para obter uma quantidade de substância purificada necessária para caracterização assim como servirá para avaliar se os desenvolvimentos obtidos do meio de fermentação são suficientes para passar à etapa de purificação da substância ativa.

Entretanto, a eliciação da biossíntese de metabólitos muitas vezes depende do meio de cultivo utilizado. Portanto, foi julgado oportuno pesquisar a microbiota do país para verificar a prevalência de grupos de substâncias ativas entre seus metabólitos com potencial terapêutico, principalmente agentes antifúngicos, utilizando processos de aplicação rápida, porém econômicos, e desenvolver meios para obter rendimentos satisfatórios de metabólitos para passar à etapa de trabalhos de purificação completa das substâncias ativas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Meios de cultivos

O meio sólido m29 (Ujikawa, 1995) foi preparado com 5,0 g de extrato de levedura, 2,0 g de extrato de carne, 3 g de peptona, 10,0 g de dextrose, 1,0 g de carbonato de cálcio, 15 de ágar e 1 litro de água destilada e o meio sólido m615 com 50,0 g de dextrose, 332,0 mL de leite de soja, 10,0 g de carbonato de cálcio, 15,0 g de ágar e 668,0 mL de água destilada. Após esterilização por 20 minutos, foram distribuídos 20 mL por placa.

Os meios líquidos m534 (Ujikawa, 1996) e m602 foram preparados com os mesmos ingredientes dos meios m29 e m615 respectivamente, com exceção de ágar. Foram distribuídos 25 mL por erlenmeyer de 250 mL e esterilizados por 15 minutos.

### Colheita de amostras e isolamento de colônias

Foram colhidas amostras de solos das regiões do rio Jacaré, Jardim Imperador, Clube Náutico de Araraquara e do Parque Zoológico de São Paulo, utilizando-se recipientes e espátulas esterilizados. As colheitas foram feitas dentro de matas fechadas e semi-úmidas, primeiro fazendo-se a limpeza de folhas em decomposição da superfície

e retirando-se, a seguir, amostras de solos de horizontes de 1 a 10 cm de profundidade. Dez gramas de cada amostra foram agitados com 90 mL de solução fisiológica estéril por 5 minutos. A seguir foram feitas diluições seriadas de 1:10 mL com mesma solução até a diluição de 1:10<sup>6</sup>.

Das 3 últimas diluições, foram semeadas porções de 0,1 mL para placas de meio m29, fazendo-se o espalhamento com fio de níquel-cromo dobrado em L. A partir do 3º dia de incubação foram recolhidas colônias isoladas, semi-secas aparentando ser actinomicetos, por meio de um fio em gancho, e foram semeadas por esgotamento em placas de meio m29 e meio m615. As placas foram incubadas por 7 dias a 30 graus centígrados. Em 4 amostras, adicionou-se solução de nistatina (uma drágea de nistatina triturada com etanol e diluída para dar 500 U/mL na terceira diluição, de modo que nas diluições sucessivas das amostras, o antibiótico também sofreu as diluições).

As placas que apresentaram crescimento uniforme sem contaminação foram submetidas a análises e as placas irregulares foram submetidas à purificação das cepas. As colônias puras foram submetidas a testes taxonômicos preliminares conforme método usual (Lechevalier, 1994).

### Produção de antibióticos em meio líquido

Para o cultivo no meio líquido, uma alçada de crescimento de 7 dias no tubo de m29 foi inoculada em 25 mL de meio m534 e o frasco foi incubado por 2 dias a 30 °C. Um mililitro deste cultivo foi inoculado nos erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meios m534 e m602 e foram incubados por 5 dias com agitação orbital a 150 rpm.

### Teste de atividades antifúngica e antibacteriana

Foram preparadas placas de meio de ágar para antibióticos, inoculadas com microrganismos detetores *Candida albicans* MJ22, *Aspergillus oryzae* Ar25, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* Ar78 ATCC, de acordo com técnica para doseamento de antibióticos da Farmacopéia Brasileira IV (1988).

Os cultivos de colônias isoladas em meio sólido por 7 dias foram recortados em pastilhas de 7 por 7 mm utilizando uma faca fina flambada. As pastilhas foram colocadas sobre placas de ágar preparadas conforme acima descrito. Após a incubação por 24 horas a 30 °C, os diâmetros de halos de inibição de crescimento foram medidos.

Para o ensaio dos cultivos em meio líquido, foram colocadas placas de aço inoxidável denominadas "team plates" (que contêm seis orifícios umbilicados) sobre as placas de ágar semeadas com os microrganismos detetores. Em cada orifício foram colocados 0,15 mL de cada cultura e as placas foram incubadas por 24 horas. A seguir,

o excesso de líquido foi enxugado com papel absorvente, as placas metálicas foram retiradas e os diâmetros de halos de inibição foram medidos.

### **Classificação preliminar e doseamento dos antibióticos por espectrofotometria**

No processo de cultivo em ágar, utilizando uma pequena faca, foram recortadas pastilhas de ágar de 7 x 7 mm, que foram colocadas num béquer tarado de 50 mL e pesadas. A seguir as pastilhas foram trituradas com 10 mL de metanol por 10 minutos. A mistura foi filtrada e a solução foi submetida a espectrometria de varredura no intervalo de 200 a 450 nm utilizando os espectrofotômetros UV-VIS marca Hewlett Packard, modelo HP8453, e marca Shimadzu, modelo UV-1603, acoplados a computadores. (Nos casos de baixa absorvidade, repetiu-se com 5 g de cultivo em ágar triturados com 15 mL de metanol.)

No método de cultivo em meio líquido, foram adicionados 3 volumes de metanol aos erlemmeyers contendo os cultivos líquidos e agitado por 20 minutos. A mistura foi filtrada em papel e diluída convenientemente com metanol para realizar a varredura utilizando o mesmo espectrofotômetro UV-VIS.

Os antibióticos com atividade antifúngica contidos nos filtrados que produziram curvas de absorção UV-VIS com picos em torno de 291, 304 e 308 nm, foram classificados como sendo macrolídeos tetraênicos; os que apresentaram picos em torno de 317, 331 e 350 nm como macrolídeos pentaênicos; os que apresentaram picos em torno de 340, 358 e 380 nm, como sendo macrolídeos hexaênicos, os que apresentaram picos em torno de 363; 382 e 405 nm como macrolídeos heptaênicos do tipo de anfotericina B, com duas duplas *all-trans*, e os que apresentaram picos em torno de 358, 378 e 400 nm, como macrolídeos heptaênicos do tipo com 2 duplas em *cis* (patricinas), de acordo com os trabalhos de Ball *et al.* (1957), Martin e McDaniel (1977) e Schlingmann *et al.* (1999). Foram feitas, também, preparações testemunhas a partir de meios não inoculados.

Um processo mais simples principalmente para obtenção de resultados qualitativos foi feito adicionando-se 10 mL de solventes como metanol, propanol, butanol e acetato de etila nos cultivos em tubo ou em placas, repouso por 30 minutos, decantação e varredura no espectrofotômetro UV-VIS, no intervalo de 200 a 450 nm, utilizando o solvente puro como branco.

### **Cálculo da concentração de antibióticos**

Tendo em vista que os extratos obtidos deste modo

são bastante impuros, foram utilizadas fórmulas de cálculos para cada grupo de antibióticos poliênicos, as quais permitiram quantificar em presença de impurezas.

Assim, para a determinação da concentração do macrolídeo heptaênico, foi utilizada a seguinte fórmula: determinou-se o valor médio da absorvância dos vales em torno de 370 nm e 395 nm e o valor encontrado foi subtraído da absorvância do pico em torno de 377 nm; a seguir, o resultado foi dividido pelo fator 0,1108, calculado a partir de uma amostra de anfotericina B Sigma, e depois foi multiplicado pela diluição para se obter unidades de heptaeno (UHp) por mL.

Para o cálculo de pentaenos, os comprimentos de onda considerados foram, respectivamente, vales em torno de 323 e 341 nm e pico em torno de 331 nm, e o fator de cálculo utilizado foi 0,0416 calculado a partir de filipina Sigma para ter unidades de pentaeno (UPE) por mL. Similarmente para o cálculo de tetraeno, os valores utilizados foram, respectivamente, 296 nm, 311 nm, 304 nm e 0,03414, fator este calculado a partir de uma solução de nistatina Sigma para se obter unidades de tetraenos (UT) por mL.

Para verificar a influência dos componentes do meio, foi feita adição de 0,1 a 0,5 µg/mL de antibiótico poliênico no meio fermentado, isento de antibiótico antifúngico

## **RESULTADOS**

### **Amostras do solo próximo ao Clube Náutico de Araraquara**

Foram colhidas dez amostras do solo, das quais foram isoladas 4 cepas de actinomicetos. Dentre estas, duas produziram antibióticos tetraênicos e duas produziram antifúngicos não-poliênicos. Foi isolada, também, uma cepa de *Chromobacterium violaceus* produtora de um antibiótico antifúngico polipeptídico.

### **Amostras de solo do vale do Rio Jacaré**

Das 10 amostras de solos, foram isoladas 35 cepas de actinomicetos. Apresentaram atividade antifúngica 16 cepas. Os extratos metanólicos obtidos dos cultivos nos meios sólidos m29 e m615 de 14 cepas apresentaram picos característicos de polienos. As curvas espectrofotométricas de varredura obtidas por extração de meios não inoculados (frascos controle) não apresentaram aqueles grupos de três picos característicos de polienos citados na seção de métodos. Os filtrados que apresentaram três picos característicos, após a extração com acetato de etila (alguns polienos) ou

com butanol (todos os polienos), aumentaram a absorvância dos picos nos extratos, assim como as atividades antifúngicas, demonstrando que os picos estão ligados a estes antibióticos (Ball *et al.*, 1957; Martin, Mc Daniel, 1977; Schlingmann *et al.*, 1999). Os métodos de maceração de cultivos em tubos ou de placas com metanol ou butanol também levaram a bons resultados, sendo que o acetato de etila só extraiu alguns tipos de polienos, como metilpentaênicos e oxo pentaênicos, dependendo, provavelmente, da existência ou não e da polaridade de grupos ligados (micosamina, *p*-aminoacetofenona, etc.).

Apresentaram espectros de absorção UV-VIS típicos de antibióticos antifúngicos macrolídeos tetraênicos os extratos das cepas Ar1226, Ar1227, Ar1231, Ar1232, Ar1233, Ar1238 e Ar1258, totalizando 7 cepas.

Foram classificados preliminarmente como macrolídeos pentaênicos os extratos das cepas Ar1216, Ar1218, Ar1230, Ar1235 Ar1250 e Ar1252, totalizando 6 cepas.

A cepa Ar1263 produziu antibiótico heptaênico.

Não apresentaram curvas características de polienos 22 cepas, das quais somente as cepas Ar1223 e Ar1259 apresentaram atividade antifúngica.

Por outro lado, as cepas Ar1250 (pentaeno) e Ar1263 (heptaeno) não apresentaram inicialmente atividade antifúngica quando cultivadas no meio m29, só o fazendo no meio m615, embora apresentasse as curvas espectrofotométricas de varredura características no meio m29, se bem que com muito maior intensidade no meio 615. Em outras palavras, no meio m29, as quantidades produzidas dos polienos foram pequenas de modo que, embora os antibióticos pudessem ser reconhecidos pelo espectro UV-VIS, não foram detectados pelo teste microbiológico.

### Amostras de solo da região do Jardim Imperador

Destas amostras, foram isoladas 4 cepas de actinomicetos ativas contra fungos, das quais a cepa Ar1197 produziu substância com curva espectrofotométrica de varredura característica de tetraeno, as cepas Ar1196 e Ar1199, de pentaenos e a cepa Ar1198, de heptaeno.

### Amostras do solo do Parque Zoológico de São Paulo

Destas amostras, foram isoladas 33 colônias de microrganismos numeradas de Ar1272 a Ar1304, das quais 7 eram actinomicetos e destas 2 apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* e *A. oryzae*. A colônia de número Ar1278 produziu antibiótico macrolídeo tetraênico e a cepa Ar1287 um antibiótico macrolídeo pentaênico.

### Balanco de todas as cepas de microrganismos produtores de antibióticos antifúngicos testados para a presença de antibióticos poliênicos

Anteriormente tinham sido isoladas sete cepas da região, que foram conservadas por apresentarem boa potência antimicrobiana, sendo classificadas como produtoras de heptaenos as cepas Ar984, Ar985 e Ar1123 (Ujikawa, 1999), de hexaeno a Ar1011 (Ujikawa, Vilegas, 1999a), de pentaenos as cepas Ar386, Ar1153, Ar1211 (Ujikawa, Vilegas, 1999b; Ujikawa, 2000) e de oxopenaenos a cepa Ar1178.

Todas as cepas ativas contra fungos, no total de 41, estão relacionadas na Tabela I, as quais foram isoladas de diversas partes do País. Deste total, 32 apresentaram formação de substâncias com curvas típicas de antibióticos antifúngicos macrolídeos poliênicos, enquanto que em 9 cepas não se caracterizou a formação de polienos. A Figura 1 representa a freqüência dos achados de cada grupo.

Algumas cepas apresentaram largo espectro de atividade, mas o espectro não era devido a somente um antibiótico, mas à produção simultânea de um antifúngico poliênico juntamente com um antibacteriano polietérico, um dos quais identificado como sendo a 26 deoxilaidlomicina (Ujikawa, 1995, 1996; Ujikawa *et al.*, 1996)

No cultivo em meio m29, não foram encontradas curvas típicas de polienos nas cepas Ar1233 e Ar1238. Estas cepas só os produziram nos meios m602 ou m615.

Duas das cepas acima apresentaram curvas UV-VIS típicas de polienos no meio m29, mas não apresentaram atividade microbiológica, só o fazendo quando cultivadas no meio 602, o que indica que o método UV-VIS foi ligeiramente mais sensível que o método microbiológico.

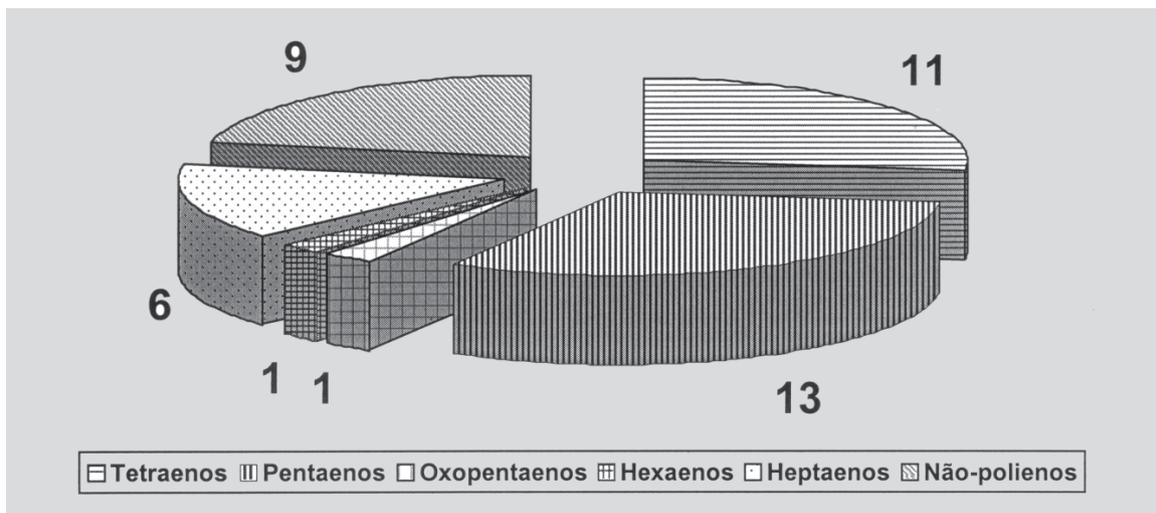
### Quantificação dos antibióticos antifúngicos e estudo dos meios de produção

Os resultados obtidos com a adição de 0,1 a 0,5 mg por mL de antibióticos poliênicos nos extratos de meios fermentados isentos de antibióticos permitem concluir que o método de varredura UV-VIS é válido para realizar estimativas prévias do conteúdo de antibióticos nos extratos brutos. O método permitiu detectar 0,2 mg de antibiótico poliênico por mL de extrato bruto em presença de impurezas presentes nos extratos acima e estimar perdas e ganhos de pureza específica durante a purificação sem se conhecer a sua estrutura exata. A Figura 2 apresenta a curva obtida com a adição 0,5 mg/mL de nistatina no meio fermentado isento de antibiótico.

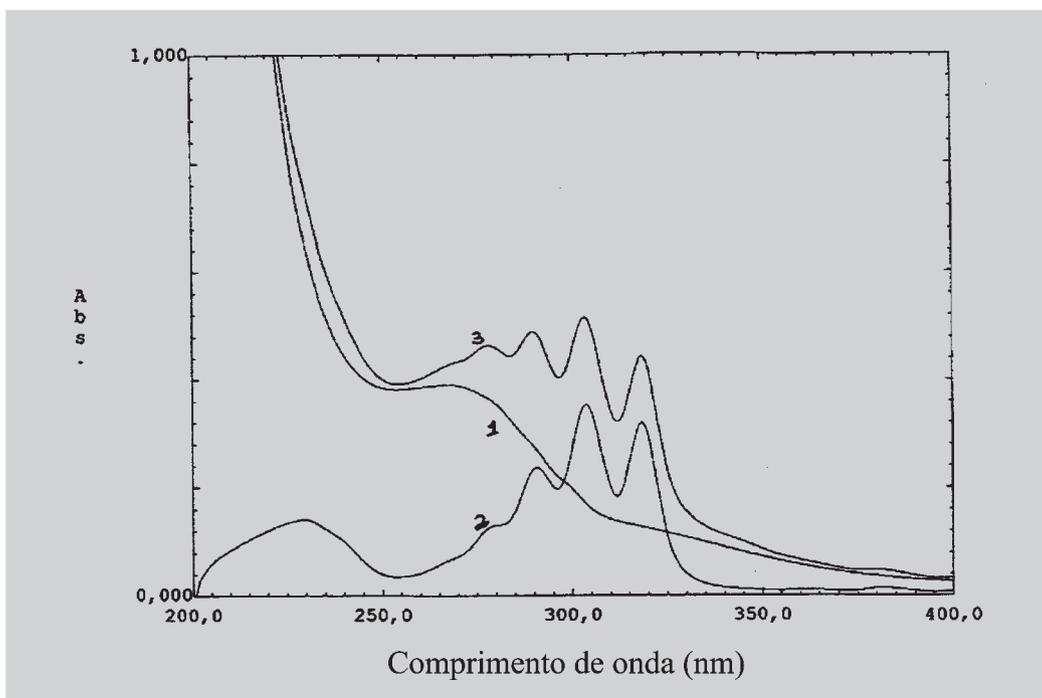
**TABELA I** - Actinomicetos aeróbicos isolados do solo do Brasil produtores de antibióticos antibacterianos e antifúngicos, bandas de absorção no espectro UV-VIS, grupos de macrolídeos poliênicos enquadrados e atividade antimicrobiana

Cepa nº	Bandas de absorção UV (nm)	Grupo	Atividade contra		
			S. a.	C. a.	A. o.
Ar386	349,0-331,0-316,8-301,0-271,8	Pentaeno	+++	++	++
Ar984	399,2-376,6-357,2-338,8-267,8	Heptaeno	-	++	++
Ar985	399,5-376,6-357,6-338,8-267,8	Heptaeno	-	++	++
Ar1093	349-331-317-300	Pentaeno	+++		++
Ar1011	377,0-356,5-339,0	Hexaeno	+++	++	++
Ar1123	399,0-377,5-356,5-339,5-287,5-277,5	Heptaeno	+++	++	+
Ar1153	349,5-331,5-317,0-303,5	Pentaeno	-	+	++
Ar1178	359	Oxopentaeno	+++	+	++
Ar1193	349,0-331,0-317,0	Pentaeno	-	++	+
Ar1196	349,4-331,6-316,6-302,6-289,4	Pentaeno	+++	++	+++
Ar1197	318,4-303,6-290,0-277,4	Tetraeno	++	++	+++
Ar1198	403,2-379,6-359,2-255,2	Heptaeno	-	++	+++
Ar1199	349,5-331,6-316,0-302,2-288,8-262,2.	Pentaeno	-	+	++
Ar1210	404,0-380,2—358,8	Heptaeno	-	+	-
Ar1212	262,5	Não-poliêno	+++	++	-
Ar1216	349,5-331,5-316,5-302,5 289,0	Pentaeno	-	+	-
Ar1218	348,0-320,0-316,0-270-259,5	Pentaeno	++	++	-
Ar1223	262	Não-poliêno	+	++	+
Ar1226	318,2-303,4-289,8-277,8	Tetraeno	++	+++	-
Ar1227	318,5-304,0-290,5-279,5	Tetraeno	++	++	++
Ar1230	349,0-331,5-313,0-285,5	Pentaeno	+++	+++	+/-
Ar1231	318,5-304,0-291,0-279,5	Tetraeno	++	++	+
Ar1232	318,5-304,0-291,0-279,5	Tetraeno	-	++	+
Ar1233	317,0-302,5-288,5-276,5	Tetraeno	-	++	++
Ar1235	349,5-331,5-316,5-303,0-262,0	Pentaeno	-+	-	++
Ar1238	317,0-302,0-288,0-276,5	Tetraeno	-	++	+
Ar1250	347,5-329,5-313,2-250,0	Pentaeno	-	-	+
Ar1252	349,5-331,5-316,5-303,0-287,5-269,0	Pentaeno	-	+	++
Ar1259	205	Não-poliêno	+	+/-	-
Ar1258	318,5-304,0-291,0-279,5	Tetraeno	-	++	+
Ar1263	397,0-374,0-356,0-338,0	Heptaeno	-	+	-
Ar1267	267,0	Não-poliêno	+++	+++	+
Ar1269	252,5	Não-poliêno	-	++	+++
Ar1271	262,5	Não-poliêno	++	+	-
Ar1277	sem pico	Não-poliêno	-	-	++
Ar1278	317,5-302,5-288,5	Tetraeno	-	+++	+++
Ar1287	349,2-331,4-316,6-302,6	Pentaeno	++	++	+++
Ar1312	386-276	Não-poliêno	++	-	+++
Ar1313	237-203	Não-poliêno	+++	+	+
Ar1316	318-303-290	Tetraeno	++	+++	+++
Ar1317	319-304-291	Tetraeno		+	+

Atividade antimicrobiana contra: - S.a. = *Staphylococcus aureus*; C. a. = *Candida albicans*, A. o. = *Aspergillus oryzae*. Sinais + indicam diâmetros de halos de inibição produzidos por pastilhas quadradas de 7 mm de lado de cultivo em ágar: + = 9-15 mm, ++ = 16- 20 mm, +++ = 21-30 mm



**FIGURA 1** - Distribuição de 41 antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos nativos isolados: divisão por grupos químicos.



**FIGURA 2** - Efeito da adição de nistatina pura no meio de cultura sobre o espectro de absorção. Curva 1 – Extrato metanólico do meio de cultura; Curva 2 – Nistatina a 0,5 µg/mL; Curva 3 – Extrato metanólico do meio de cultura adicionado de nistatina a 0,5 µg/mL.

Por outro lado, observou-se que o efeito da composição dos meios no rendimento em polienos dependeu da cepa empregada.

Os rendimentos obtidos de antibióticos tetraênicos e pentaênicos por fermentação com as colônias isoladas no Brasil utilizando diversos meios podem ser observados nas Figuras 3, 4 e 5.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na triagem de microrganismos da microbiota das diversas regiões mostraram que os actinomicetos aeróbicos presentes produzem muito freqüentemente antibióticos macrolídeos poliênicos de vários subgrupos. Assim, das amostras de solos da regiões

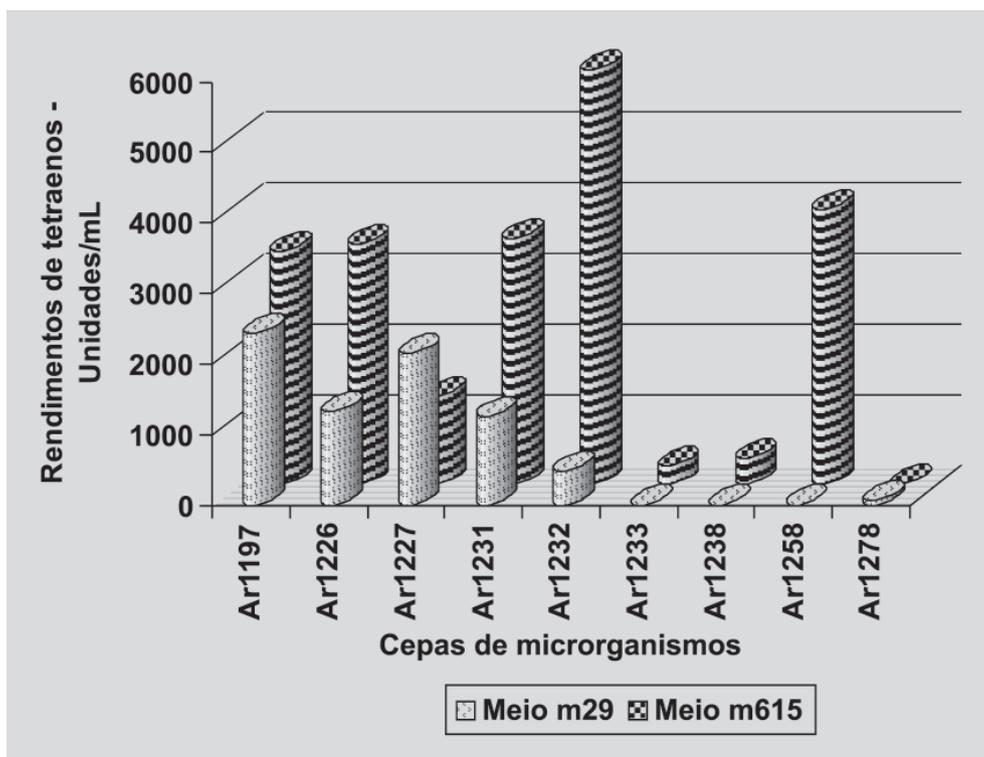


FIGURA 3 - Teor de antifúngicos macrolídeos tetraênicos de acordo com meio de cultivo e cepa de actinomiceto.

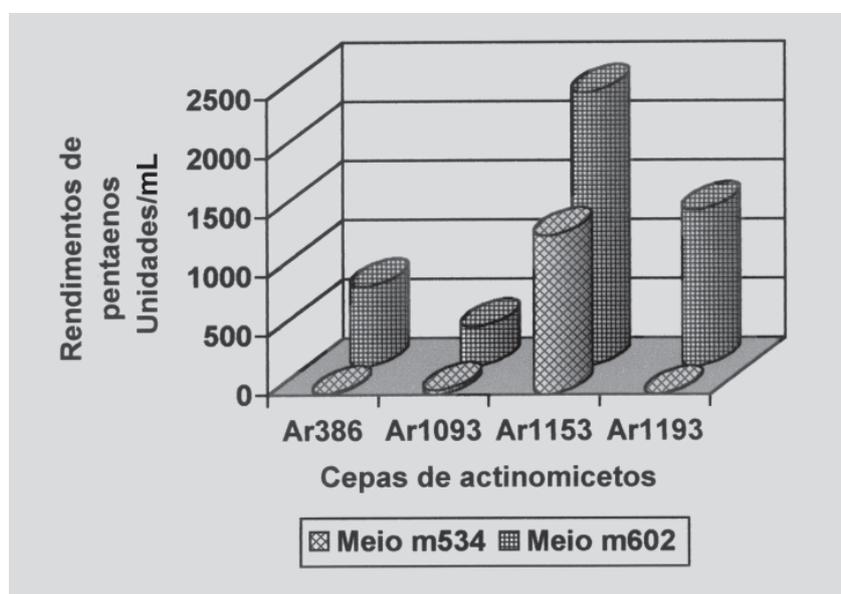
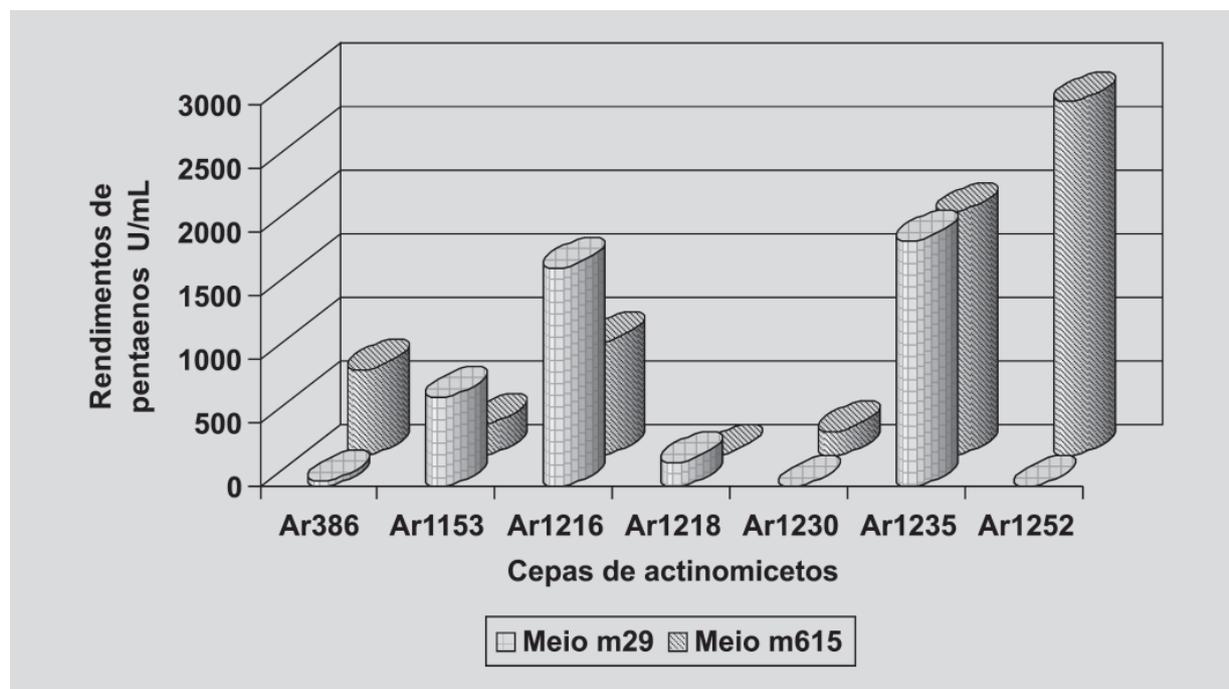


FIGURA 4 - Produção de antifúngicos pentaênicos por cepas de actinomicetos em dois meios líquidos.

do Rio Jacaré, do Jardim Imperador (Araraquara), do Parque Zoológico de São Paulo e do Clube Náutico Araraquara foram isoladas ao todo 50 cepas de actinomicetos produtores de antibióticos antifúngicos, das quais

22 cepas produziram antibióticos antifúngicos poliênicos, correspondendo a 44% dos actinomicetos. Segundo Martin e McDaniel (1977), de 34 a 88% dos actinomicetos produzem antifúngicos poliênicos.



**FIGURA 5** - Produção de antifúngicos pentaênicos em dois meios sólidos por cepas de actinomicetos isolados.

No que se refere à distribuição por grupos de polienos, do total de 41 antibióticos produzidos por cepas de actinomicetos aeróbicos isoladas neste laboratório a partir das amostras de solo do Brasil os tetraenos representaram 26,8%; os pentaenos, 31,7%, os oxopentaenos 2,4%, os hexaenos 2,4%, os heptaenos 14,6% e os não-polienos, 21,9% (Figura 1). Confrontando com a distribuição dos achados de Ball *et al.* (1957) de solos de diversos países do mundo (37,3% tetraenos, 29,8% pentaenos, 4,4% metilpentaenos, 1,5% hexaenos, 22,4% heptaenos e 4,5% de não-polienos) verifica-se que os achados semelhantes.

A proporção de antibióticos antifúngicos não-poliênicos para poliênicos foi de 1:3,6 ao passo que Ball *et al.* (1957) dão a proporção de 1:20.

Entretanto, levando-se em conta a variabilidade dos testes, pode-se considerar que também nesta proporção a microbiota do Brasil é semelhante a de outros países.

Houve grande variação na quantidade de actinomicetos isolados e das cepas ativas entre as amostras de diversas regiões, que podem não refletir a variação por regiões, mas a amostragem realizada. Poderia ter sido tomada amostra mais úmida e rica em gram negativos, ou mais seca e com menos competidores de actinomicetos. Chuvas recentes ou estiagens prolongadas podem ter contribuído para estas diferenças de resultados. A adição de nistatina no meio de isolamento favoreceu o isolamento de actinomicetos produtores de antibióticos poliênicos.

No que se refere à metodologia de detecção de antibióticos, verificou-se que o processo espectrofotométrico apresentou sensibilidade e precisão maior que o processo microbiológico de pastilhas de ágar. Porém, só é aplicável a poucos grupos de antibióticos que apresentam forte absorção acima de 300 nm, como os poliênicos e antraciclínicos, realizando as correções adequadas nos espectros por subtração do espectro do extrato de cultivos inativos. O processo espectrofotométrico aplicado ao extrato metanólico bruto permitiu detectar concentrações de 0,2-0,5 mg/mL de antibióticos poliênicos em presença de impurezas. Isto é vantajoso em relação a outros processos de pré-caracterização estrutural, que exigem amostras purificadas e em muito maior quantidade. Segundo Silverstein *et al.* (1994), há vantagem na seletividade da absorção no ultra violeta, pois grupos característicos, principalmente sistemas conjugados, podem ser reconhecidos em moléculas de complexidade variável. Os métodos atuais de ms/ms (espectrometrias de massas repetidas acopladas a HPLC) permitem detectar variedade maior de metabólitos em presença de impurezas, mas requer investimento muito maior.

Avaliando o processo microbiológico, do ponto de vista de equipamento, o método de pastilhas de ágar, que pode ser feito utilizando pequenas facas, é mais simples que o processo de rolhas de ágar. Tratando-se de cultivo em meio líquido, o uso de "team plates" permite a aplicação do caldo integral, mas sendo o cultivo heterogêneo, irá

apresentar variação conforme se introduza mais ou menos micélio na placa de teste. Esta irregularidade pode ser sanada usando o caldo integral homogeneizado para os antibióticos mais difusíveis. No entanto, para a maioria dos polienos, que são pouco hidrossolúveis, é preciso usar o método de diluição ao invés do método de difusão. A desvantagem do método de pocinhos feitos no ágar é que o microrganismo produtor presente pode crescer para fora e interferir na leitura, de modo que é necessário filtrar esterilmente o caldo fermentado. O processo de microplacas poderia ser utilizado com a vantagem de requerer menor quantidade de amostra para teste, mas exige o uso de ponteiras com filtro estéril e capela estéril.

Para se testar extratos em solventes tóxicos, é preciso usar o método de disco de celulose, para permitir a evaporação do solvente. A esse respeito, é preciso considerar que, nos discos, se colocam cerca de 10 a 20  $\mu\text{L}$  de amostra, enquanto num "template", cerca de 150  $\mu\text{L}$  são colocados. Assim, para obter o mesmo halo de inibição, é preciso ter amostras 10 vezes mais concentradas naquele processo. A não observância deste pormenor pode levar a conclusões errôneas sobre a eficiência do método de extração desenvolvido. Os métodos modernos e automatizados de triagem TAPs (triagens de alta produtividade ou "HTS") são muito mais eficientes, mas o investimento inicial demandado é elevado.

As fórmulas utilizadas para a quantificação dos antibióticos poliênicos baseadas no espectro UV foram bastante sensíveis e específicas para antibióticos contendo duplas ligações conjugadas, contrastando com os métodos microbiológicos, que são menos precisos e específicos.

A utilização do meio sólido ao invés do líquido para cultivo apresenta a desvantagem de ser mais difícil a agitação para extração, porém não há necessidade de ter incubadores orbitais, que, além de onerosos, podem sofrer interrupções por problemas mecânicos e de suprimento de eletricidade.

De modo geral, não se dispendo de fermentadores de grande porte, só se deve iniciar a etapa de isolamento da substância ativa quando se conseguir meios ou cepas que produzam quantidades detectáveis da substância em diluição do meio superiores a 10 vezes, isto é, só quando se puder contar com mais de 100 mg da substância dispersa no volume total fermentado. Dispendo-se de fermentador de grande porte, o volume maior fermentado compensará a menor concentração no meio fermentado. Assim, um método rápido de estimativa quantitativa permite avaliar se existe no caldo quantidade suficiente de substância a ser extraída. Portanto, a estimativa quantitativa é muito importante para se passar às etapas de isolamento e purificação.

Foi observado que as cepas podem ser divididas em três grupos de acordo com a preferência pelo meio para a

produção de antibióticos poliênicos. Um grupo produz quase igualmente no meio com pouco açúcar (meios m29, m534) ou muito açúcar e lipídio (meios m615 e m602), outro grupo tem marcada preferência pelo meio com excesso dos mesmos e um outro sofre inibição da produção pelos mesmos (Figuras 3, 4 e 5). Obtiveram-se rendimentos de até 5870 unidades de tetraeno/mL.

Os antibióticos antifúngicos poliênicos são geralmente bastante tóxicos, instáveis e pouco solúveis. Somente são utilizados comumente no Brasil na terapêutica humana a anfotericina B, um heptaeno, e a nistatina, um tetraeno, por falta de compostos melhores. Devido à grande variedade de estruturas secundárias, alguns agentes poucos ativos para células normais por apresentar impedimento espacial poderiam ser eventual e seletivamente ativos contra sítios ativos mais expostos nas células com imperfeições estruturais, como nas células neoplásicas. Pequenas variações estruturais geralmente não impedem a ocorrência de resistência cruzada, mas podem provocar variações na farmacocinética e toxicidade, tornando os antibióticos mais ou menos seletivos em relação aos tipos celulares como de diversos tipos de neoplasias.

Por outro lado, foi relatada a existência de cepas de actinomicetos que produzem concomitantemente a antifúngicos poliênicos, agentes promotores de câncer como as teleocidinas (Itoh *et al.*, 1990). Assim, os preparados comerciais devem estar isentos dos mesmos. Os antibióticos polietéricos encontrados algumas vezes concomitantemente com poliênicos são também tóxicos, mas têm seu emprego na veterinária para combater a coccidiose. Os trabalhos relatados são de simples execução para demonstrações acadêmicas de triagens de biofármacos produzidos por microrganismos nativos. Em suma, a maioria dos actinomicetos isolados de algumas amostras do solo do Brasil produziu, à semelhança dos de outros países, antibióticos antifúngicos macrolídeos poliênicos em meios adequados e, concomitantemente, produziu, embora com menor frequência, outros tipos de antibióticos, principalmente polietéricos. Cepas altamente produtoras de antifúngicos semelhantes à nistatina, e à anfotericina foram encontradas com frequência.

## ABSTRACT

### **Antifungal antibiotics produced by Brazilian actinomycetes and its preliminary determination in experimental media**

*Various Brazilian soil samples were seeded in agar plates and several strains of antifungal antibiotic producing actinomycetes were isolated. Antibiotic biosynthesis*

*elicitation media were developed and methods for determination of yields were studied. A total of 41 antifungal antibiotic producing strains of aerobic actinomycetes resulted. Among the antibiotics produced, 11 (26.8%) were grouped as macrolide tetraenes, 13 (31.7%) as pentaenes, 1 (2.4%) as oxo pentaene, 1 (2.4%) as hexaene and 6 (14.6%) as heptaenes. Several of these strains also produced antibacterial antibiotics, like polyether antibiotics. The remaining 9 active strains (21.9%) produced non polyene type of antifungals. A medium based on soybean milk favored extraordinarily the elicitation of polyenes biosynthesis by some native strains, while with other strains, this was not favored, while with others it was detrimental. The yields reached about 6,000 polyene units per mL. High polyene type antifungals producing actinomycetes were frequently isolated.*

*UNITERMS: Antifungal antibiotics. Polyenes. Screening Brazilian Soils.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Salvador Lepera, pela cessão de aparelhos, e à Sra. Maria do Rosário Guerra Araújo, pelo auxílio prático.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALL, S.; BESSEL, C. J.; MORTMER, A. The production of polyenic antibiotics by soil streptomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, v.17, p.96-103, 1957.
- ITOH, A.; IDO, J.; IWAMOTO, Y.; GOSHIMA, E.; MIKI, T. E.; HASUDA, K. YS-822A, a new polyene macrolide antibiotic. *J. Antibiotics*, v.43; p.948-954, 1990.
- KNOWLES, D. J. C. New strategies for antibacterial drug design. *Trends Microbiol.*, v 5, p. 379-382, 1977.
- LECHEVALIER, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: HOLT, G. H *et al.*, eds. *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 611-623.
- MARTIN, J. F.; MCDANIEL, L. E. Production of polyene macrolide antibiotics. *Adv. Appl. Microbiol.*, v.21, p.1-52, 1977.
- OMURA, S. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Industrial Microbiol.*, v.10, p. 135-156, 1992.
- SCHLINGMANN, G.; MILNE, L.; BORDERS, D. B.; CARTER, G. T. Strevertenes, antifungal pentaene macrolides produced by *Streptoverticillium* LL-30F848. *Tetrahedron*, v.55, p. 5977-5990, 1999.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 263.
- UJIKAWA, K. *Isolamento e caracterização de um antibiótico polietérico obtido a partir de um microrganismo da região de Araraquara*. Araraquara, 1995. 99p.[Tese de Livre-Docência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP].
- UJIKAWA, K. Fermentação de 26-deoxilaidlomocina por *Streptomyces* sp. Ar386. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v.77, p.77-80, 1996.
- UJIKAWA, K. Antifungal antibiotic isolated from microbiota of Araraquara region, Brazil. *Boll. Chim. Farm.*, Milano, v.138, n.2, p.136, 1999.
- UJIKAWA, K. *Streptomyces* sp Ar386 produz um antibiótico antifúngico pentaênico além do antibacteriano 26-deoxilaidlomocina. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP, 47., Araraquara, 2000. Anais. Araraquara: FCF/UNESP, 2000. p. 97.
- UJIKAWA, K.; VILEGAS, W. Antibiótico hexaênico isolado de microrganismo da região de Araraquara. *Farm. e Quím.*, São Paulo, nov., 1999a. p.73.
- UJIKAWA, K.; VILEGAS, W. Antibiótico antifúngico isolado de microrganismo nativo. *Farm. Quím.*, São Paulo, p.78, 1999b.
- UJIKAWA, K.; VILEGAS, W.; VILEGAS, J. H. Y.; LLABRÈS, G. Antibiotic 26-deoxylaidlomycin isolated from *Streptomyces* sp Ar386 from Brazilian soil. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v.38, p.185-191, 1996.

Recebido para publicação em 10 de setembro de 2002.