



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS ENTRE
BACTÉRIAS AMBIENTAIS E PLANTAS MEDICINAIS
DA AMAZÔNIA

VESPASIANO YOJI KANZAKI DE SOUSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
MAIO/2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS ENTRE
BACTÉRIAS AMBIENTAIS E PLANTAS MEDICINAIS
DA AMAZÔNIA

VESPASIANO YOJI KANZAKI DE SOUSA
ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS ISAMU B. KANZAKI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL
PUBLICAÇÃO:061/2012

BRASÍLIA/DF
MAIO/2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS ENTRE
BACTÉRIAS AMBIENTAIS E PLANTAS MEDICINAIS DA
AMAZÔNIA

VESPASIANO YOJI KANZAKI DE SOUSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS



REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SOUSA, V.Y.K. **Bioprospecção de antimicrobianos entre bactérias ambientais e plantas medicinais da Amazônia**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 69p. Dissertação de Mestrado

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, Vespasiano Yoji Kanzaki

Bioprospecção de antimicrobianos entre bactérias ambientais e plantas medicinais da Amazônia / Vespasiano Yoji Kanzaki de Sousa orientação de Luís Isamu B. Kanzaki – Brasília, 2012. 69 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. Bioprospecção
2. Antimicrobianos
3. Solo
4. Plantas medicinais
5. Castanha-do-pará
6. Amapá. I. Kanzaki, L.I.B. II. Bioprospecção de antimicrobianos entre bactérias ambientais e plantas medicinais.

CDD ou CDU
Agris/FAO

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Luís Isamu B. Kanzaki e ao Programa de pós-graduação em Saúde Animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária pela oportunidade.

Aos colegas do Laboratório de Bioprospecção, Amanda, Anderson, Élide, Elisângela, Luciana, Maísa e Suzana e também aos que não estão mais, mas que foram importantes ao decorrer do curso, Amabel, Silas, Beatriz e Dayane, sou grato por toda a ajuda e companhia.

Agradeço a equipe do laboratório de microbiologia do HUB, Paulo, Gláucia e Denise, por todo o aprendizado e pela boa vontade, pois sempre se mostraram dispostos para ajudar e foram importantes para a conclusão deste trabalho.

Agradecimento especial a profa. Dra. Simone Perecmanis e aos seus alunos, que em muitos momentos deram suporte ao Laboratório de Bioprospecção.

Agradeço ao professor Dr. Bergman por permitir o uso de equipamentos necessários para o andamento da pesquisa, da mesma forma a profa. Dra. Ângela Patrícia.

Aos membros da banca, os professores Dr. Sérgio Paulo e Dra. Carolina Pombo, agradeço por todas as observações e críticas, que certamente contribuíram para melhorar este trabalho.

Agradeço a Kelly, secretária da pós-graduação do curso de saúde animal, por sempre auxiliar nos processos burocráticos.

Sou muito grato a todos os meus familiares pelo apoio e incentivo, especialmente a meus pais e meu irmão que sempre me ajudaram em todos os aspectos, dando condições para que eu pudesse prosseguir.

Agradeço aos meus tios, Isamu e Élide, não só pela moradia, mas por tudo que fizeram por mim durante todo o período de conclusão deste trabalho. Sou imensamente grato!

Agradeço a minha namorada pela compreensão e força durante todo o período do curso.

Agradeço a Eletronorte & ANEEL por financiar a coleta do solo.

Aos professores Roberto Messias Bezerra, Silvio Wigwam Mendes Pereira e José Carlos Tavares Carvalho da Universidade Federal do Amapá, e ao Dr. Jorge Federico Orellana Segovia da Embrapa/Amapá e a pró-reitora de Pesquisa e Pós-

graduação da Universidade Estadual do Amapá, Ms. Magda Celeste Alvares Gonçalves pelo apoio na coleta e análise das amostras de solo e de plantas medicinais.

Especial agradecimento ao farmacêutico-bioquímico Paulo Oliveira Martins Júnior por sua colaboração nas análises de identificação dos isolados bacterianos e a Ms. Amabel Fernandes Correia nos estágios iniciais de aprendizagem das técnicas em bacteriologia.

Ao prof. Dr. Ernesto Hoffer por sua gentil colaboração em nos ceder as amostras de bactérias ATCC da Fiocruz e identificação das bactérias *Burkholderia pseudomallei*, *Bacillus cereus* e *Acinetobacter* spp, em colaboração de Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho (Lab. Pesquisa em Infecção Hospitalar/IOC) e Dra. Deyse Christina Vallim (Lab. Zoonoses Bacterianas/IOC), também as quais agradeço.

Sou muito grato a todos que contribuíram para realização deste trabalho!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Justificativa.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 As bactérias e os antimicrobianos.....	15
2.2 Histórico da terapia antimicrobiana.....	17
2.3 Antibióticos: mecanismo de ação e resistência bacteriana.....	18
2.4 Aplicação dos antibióticos: Prevenção e controle de infecções e promoção do crescimento em animais de produção.....	20
2.5 Principais bactérias de interesse animal e humano como patógenos.....	21
2.5.1 Gênero <i>Salmonella</i>	21
2.5.2 <i>Escherichia coli</i>	23
2.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.5.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.5.5 <i>Enterococcus faecalis</i>	30
2.6 Plantas Medicinais.....	31
2.7 Solos do Amapá.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Coleta do solo.....	37
3.2 Coleta de frutos e sementes de <i>Bertolletia excelsa</i> (castanha-do-pará).....	37
3.3 Meios de cultura.....	37
3.3.1 Caldo Lúria Bertani (Caldo LB – ACUMEDIA).....	37
3.3.2 Ágar Mueller Hinton (ACUMEDIA).....	37
3.3.3 Meio Fluido Tioglicolato (DIFCO).....	38
3.3.4 Ágar MacConkey (ACUMEDIA).....	38
3.3.5 Ágar Extrato de Solo.....	38
3.3.5.1 Preparo de extrato de solo.....	38

3.4 Cepas de bactéria – <i>American Type Culture Collection</i>	38
3.5 Extratoteca.....	39
3.6 Cultivo de bactérias do solo e frutos/sementes de <i>Bertolletia excelsa</i>	39
3.6.1 Semeio e isolamento em ágar Lúria Bertani.....	39
3.6.2 Enriquecimento em caldo tioglicolato.....	40
3.7 Obtenção de sobrenadantes de bactérias do solo para teste de difusão de disco em ágar e teste em placas de microtitulação.....	40
3.8 Teste de atividade antimicrobiana.....	40
3.8.1 Teste em placa de microtitulação.....	40
3.8.2 Teste de difusão de disco em ágar com sobrenadantes filtrados das bactérias do solo.....	41
3.8.3 Teste de difusão de disco em ágar com extratos botânicos.....	41
3.8.4 Teste de difusão em meio sólido (cavidades).....	42
3.9 Identificação de microorganismos que apresentaram atividade antimicrobiana..	43
3.10 Ensaio de citotoxicidade em células aderentes e em suspensão.....	43
4. RESULTADOS	44
4.1 Cultivo em ágar extrato de solo.....	44
4.2 Teste de sobrenadantes filtrados de cultivos bacterianos em placas de microtitulação (espectrofotometria).....	44
4.3. Teste de difusão de disco em ágar com sobrenadantes bacterianos do solo filtrados.....	45
4.4. Teste de difusão de disco em ágar com extratos botânicos	45
4.5 Amostras de solo, frutos e sementes da castanha-do-pará enriquecidos com tioglicolato testados pelo método de difusão em meio sólido.....	45
4.6 Ensaio de citotoxicidade.....	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	56
7 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais famílias de antibióticos e mecanismos de ação (Levy e Marshall, 2004).....	19
Tabela 2 Análise físico-química de solos de diferentes áreas de Cerrado no estado do Amapá (Segóvia, 2012).....	34
Tabela 3 Análise físico-química de solos de diferentes áreas de floresta de Terra Firme no estado do Amapá (Segóvia, 2012).....	35
Tabela 4 Análise físico-química de solos de floresta de Terra Firme no estado do Amapá (Segovia, 2012).....	35
Tabela 5 Análise físico-química de solo de Campo de Várzea Graminóide no estado do Amapá (Segóvia, 2012).....	36
Tabela 1 Média dos valores de densidade ótica em placa de microtitulação. Teste realizado com filtrados bacterianos brutos e isolados de frutos/sementes de castanha-do-pará e do solo que apresentaram atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em meio sólido.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Placa com Agar Mueller Hinton com as cavidades para inoculação dos cultivos bacterianos.....42
- Figura 2** Extratos botânicos com atividade antimicrobiana. **(A)** Inibição de *Staphylococcus aureus* 25923; **(B)** Inibição de *Enterococcus faecalis* 29212.....45
- Figura 3** Filtrado bacteriano com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* 25923.....46
- Figura 4** Filtrados bacterianos (brutos) com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* 25923.....47
- Figura 5** Filtrados bacterianos com atividade antimicrobiana contra *S. aureus* 25923.....47
- Figura 6** Filtrado bacteriano com atividade antimicrobiana contra *S. aureus* 25923.....48
- Figura 7** Efeito citotóxico observado pelo descolamento celular da monocamada. Células CrFK aderentes alteradas (A- controle– não tratadas); (B- grupo i1); (C- grupo K); (D- grupo N).....49
- Figura 8** Células HUT-78 tratadas com filtrados de sobrenadantes de cultivo bacterianos. Ausência de efeito citotóxico. Densidade celular normal. (A) Células tratadas com filtrados bacterianos e (B) Controle– células não tratadas com os filtrados.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LB: Lúria Bertani

BHI: *Brain heart infusion*

MH: Mueller Hinton

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

µL: microlitro

mL: mililitro

mm: milímetro

nm: nanômetro

MRSA: *Staphylococcus aureus* metilina-resistente

BGN: bacilo gram-negativo

EUA: Estados Unidos da América

cmol_c: centimolc

dm³: decímetro cúbico

mg: miligrama

g: grama

M.O: matéria orgânica

RESUMO

A diversidade biótica amazônica rendeu o isolamento de bactérias, do solo e de frutos e sementes da castanha-do-pará (*Bertolletia excelsa*), produtoras de substâncias antimicrobianas, assim como de extratos aquosos de plantas medicinais amazônicas, frente a cepas patogênicas para o homem e animais, de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Do solo, foram isolados *Burkholderia pseudomallei* e *Dermacoccus nishinomiyaenses*, e dos frutos e sementes de *B. excelsa* foram isolados, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Kocuria varians*, *Granulicatella elegans*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Oligella ureolytica*, *Acinetobacter* spp e *Bacillus cereus*, todos produzindo substâncias que apresentaram atividade inibitória frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus*. As plantas medicinais amazônicas, *Hymenelobium petraeum* (angelim-pedra) exibiu atividade inibitória sobre colônias de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, enquanto *Vatairea guianensis* (faveira) e *Symphonia globulifera* (anani) apresentaram atividade inibitória unicamente sobre colônias de *Staphylococcus aureus*. Ensaio de citotoxicidade das substâncias produzidas por bactérias do solo, utilizando-se células estabelecidas transformadas de rim de gato (CrFK) demonstraram que o filtrado do bacilo gram-negativo (em identificação) e os isolados bacterianos de frutos e sementes de castanha-do-pará, *Kocuria varians*, *Granulicatella elegans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Oligella ureolytica* e *Bacillus cereus* apresentaram atividade citotóxica sobre as células em ensaio, enquanto que células linfoblásticas em suspensão malignizadas (HUT-78) não sofreram ação tóxica quando tratadas com as substâncias filtradas produzidas pela mesma bactéria isolada.

Palavras Chaves: bioprospecção, antimicrobianos, solo, plantas medicinais, castanha-do-pará, Amapá

ABSTRACT

The amazonian biotic diversity rendered bacterial isolation from soil and fruits and seeds of the brazilian nut (*Bertolletia excelsa*), which produced antimicrobial substances, as also aqueous extracts of amazonian medicinal plants, against human and animal pathogenic strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Burkholderia pseudomallei* and *Dermacoccus nishinomiyaenses* were isolated from soil, and also, from fruits and seeds of *B. excelsa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Kocuria varians*, *Granulicatella elegans*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli* and *Oligella ureolytica*, *Acinetobacter* spp e *Bacillus cereus* were isolated, all producing antimicrobial substances, which inhibited *Staphylococcus aureus* colony growth. The amazonian medicinal plants, *Hymenelobium petraeum* (angelim-pedra) showed inhibitory activity over *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*' colony growth, while *Vatairea guianensis* (faveira) and *Symphonia globulifera* (anani) presented inhibitory activity exclusively for *Staphylococcus aureus*' colonies. Citotoxicity assays of the substances produced by soil bacteria, utilizing established and transformed cat's kidney cells (CrFK) showed that filtered substances of gram negative bacilli (under identification) and bacterial isolates from fruits and seeds of the brazilian nut, *Kocuria varians*, *Granulicatella elegans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Oligella ureolytica*, *Acinetobacter* spp e *Bacillus cereus* presented cytotoxic activity, while the lymphoblastic cell line (HUT-78) did not show toxic activity when treated with the filtered substances produced by the same isolated bacteria.

Key words: Bioprospection, antimicrobials, soil, medicinal plants, brazilian nut, Amapa

1 INTRODUÇÃO

A cada dia número crescente de patógenos resistentes a antimicrobianos vem se avolumando, conseqüentemente dificultando o tratamento de enfermidades em que estas drogas são utilizadas. A resistência a antimicrobianos tem sido associada ao aumento nas taxas de hospitalizações e mortalidade em pessoas e animais devido à falência do tratamento e persistência da infecção. A necessidade em produzir novas drogas antimicrobianas requer estratégias variadas, dentre as quais, lança-se mão da bioprospecção de metabólitos secundários de bactérias ambientais e plantas medicinais da Amazônia com potencial atividade antimicrobiana.

Bioprospecção é a atividade exploratória da diversidade biológica por recursos genéticos e bioquímicos, de valor comercial, e que eventualmente, faz uso do conhecimento das comunidades indígenas ou tradicionais (SANT'ANA, 2002).

É senso comum, a extensa biodiversidade da Amazônia, pouco explorada racionalmente, que nos proporciona possibilidades incontáveis de se encontrar microorganismos produtores de metabólitos com propriedade antimicrobiana. Por outro lado, o achado de novos metabólitos com tais propriedades, abre grande leque de estudos, desde a caracterização química destas moléculas, incluindo-se a elucidação da topologia destas em interações com moléculas das células do hospedeiro para a análise de seus mecanismos de ação. Além do imenso potencial proporcionado por microorganismos ambientais, existe grande variedade de plantas ainda não estudadas, tanto no sentido de utilização direta, como na obtenção de novos constituintes ativos ou de novas moléculas para a produção de fármacos. A pesquisa relacionada à bioprospecção de microorganismos, assim como de plantas produtoras de metabólitos com potencial atividade biológica vem se tornando importante foco da era biotecnológica.

1.1 Justificativa

Ao mesmo tempo que os antibióticos combatem enfermidades microbianas, atuam também selecionando cepas de microorganismos resistentes, tendo em vista a maneira como os profissionais da área de saúde os tem administrado e a forma incorreta da automedicação, tanto para aplicação em seres humanos, quanto em animais. O problema da transmissão de genes que conferem resistência à antibióticos está associado à transmissão destes genes de determinado

microorganismo “inofensivo” para outro com potencial patogênico e a disseminação deste fator. Portanto, desde a descoberta de vários agentes com ação antimicrobiana, busca-se novos metabólitos, tendo em vista que a resistência antimicrobiana tende a aumentar, e a utilização destes compostos na mesma proporção.

Sobre o enfoque econômico, não se deve omitir o desenvolvimento de prováveis patentes, mais recursos financeiros, com o fomento à biotecnologia nacional. Portanto, a exploração racional dos recursos da biota, traz ganhos a todos, em todos seus aspectos, melhorando a qualidade de vida da população e proporcionando campo de pesquisa científica de alto nível a academia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As bactérias e os antimicrobianos

As bactérias estão presentes em todos os ambientes naturais e estão entre os organismos mais abundantes na Terra. Estima-se que tenham surgido há cerca de 3 bilhões de anos. A maior parte desempenha papel positivo para a natureza, consistindo em mais de um milhão de espécies (ALCAMO, 1994; SORUM e SUNDE, 2001), diferindo metabolicamente, são capazes de utilizar diversas fontes de carbono e energia, além de executarem vários processos bioquímicos necessários para manter a vida (KENNEDY, 1999).

As bactérias representam parte importante da microbiota do solo (devido à sua abundância, diversidade de espécies e a sua multiplicidade de atividades metabólicas) (ZHANG e XU, 2008). Sabe-se que executam papel fundamental nos ciclos, do carbono, nitrogênio e enxofre, decomposição de matéria orgânica e na manutenção da fertilidade edáfica (ALCAMO, 1994; POTTER e MEYER, 1990).

Os microorganismos do solo podem aumentar a disponibilidade de nutrientes através da mineralização da matéria orgânica e solubilização dos minerais presentes neste (LEE e PANKHUNST, 1992). Em processo de mineralização, Chen *et al.* (2003) destacam que os nutrientes são liberados a partir da decomposição da matéria orgânica em formas inorgânicas, que podem ser captados pelas plantas, ou utilizados por micróbios para continuar o processo de decomposição.

A rizosfera, que possui abundância de nutrientes e pode conter até duas toneladas de microrganismo por hectare, é habitat de microorganismos produtores de antibióticos como mecanismo de auto-proteção (NWOSU, 2001; COSTA *et al.*, 2007). Os antibióticos são produzidos por organismos vivos capazes de inibir, em baixas concentrações, os processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos (ALCAMO, 1994). Massini (2009) relata que a capacidade de suprimir o crescimento de outros microrganismos, pela produção de determinados metabólitos, é grande vantagem para a sobrevivência de determinada espécie no solo, em virtude da extrema competição por recursos limitados existentes em decorrência da abundância de microrganismos neste ambiente.

A produção de substâncias, por membros da família Enterobacteriaceae, que exibem características antimicrobianas, tais como colicinas, produzidas por *Escherichia coli* é dentre numerosos mecanismos que capacitam as bactérias para responder às mudanças ambientais (CURSINO *et al.*, 2002).

Yu e Keller (2005) destacam que os metabólitos secundários são de grande interesse para a humanidade, devido as suas propriedades farmacêuticas (antibióticos) e/ou tóxicas (toxinas). Enquanto Keller *et al.* (2005) discutem que estes são frequentemente bioativos e geralmente se apresentam com baixo peso molecular, (São) e produzidos em restritas fases do ciclo celular em que estão relacionados, com específico estágio de diferenciação morfofisiológica dos microrganismos. Dentre os metabólitos secundários mais conhecidos, Wenzel e Muller (2005) citam que estão os policetídeos e peptídeos não ribossomais, os quais são sintetizados respectivamente pelas enzimas policetídeo sintases (PKS) e peptídeo sintetase não-ribossomal (NRPS). Os compostos policetídeos possuem ampla e importante atividade farmacológica como potentes antibióticos (por exemplo tetraciclina e eritromicina), anti cancerígenos, antifúngicos, agentes imunossupressores e antivirais.

Os actinomicetos compreendem classe bacteriana responsável pela síntese da maior parte dos compostos antimicrobianos usados clinicamente, tendo os estreptomicetos como principal contribuinte para essa produção (COSTA *et al.*, 2007). Esta classe de microrganismos tem a capacidade de produzir diversos compostos químicos que podem promover ou inibir o crescimento de outros organismos, tais como: tiamina, flavoproteínas, riboflavinas, vitamina B12, porfirina e

outros compostos que contêm ferro (KENNEDY, 1999). Além dos actinomicetos, Massini (2009) destaca que as bactérias do gênero *Bacillus* e da família Pseudomonadaceae também são importantes produtores de compostos antimicrobianos.

2.2 Histórico da terapia antimicrobiana

A partir da década de 40, com a obtenção pela primeira vez da estreptomicina, os actinomicetos foram reconhecidos como importantes produtores de antibióticos e outros metabólitos secundários com atividade biológica (CHALLIS e HOPWOOD, 2003). Atualmente cerca de 70% dos antibióticos comercializados são provenientes de bactérias do gênero *Streptomyces* (MASSINI, 2009).

A descoberta da estreptomicina pelo microbiologista de solo Selman Waksman, da Universidade de Rutgers em Nova Jersey, foi uma das maiores descobertas a respeito de quimioterapia antimicrobiana na primeira metade do século 20. Este evento foi importante por diversas razões, pois identificou-se nova classe de agentes antimicrobianos produzidos naturalmente, além do estudo a respeito de seu mecanismo de ação em comparação à ação de drogas como as sulfonamidas e penicilina (descobertas anos antes), que levaram a criação de conceitos importantes, como, por exemplo, a distinção entre agentes antimicrobianos sintetizados quimicamente e os de origem natural.

Waksman criou o termo “antibiótico” e, observando que algumas substâncias químicas antimicrobianas foram ativas contra muitos microorganismos, enquanto outras, ativas contra poucos, ampliou o termo para “antibiótico de amplo espectro” e “baixo espectro” (CALDWELL, 1995).

A penicilina, descoberta em 1928 pelo escocês Alexander Fleming, produzido pelo fungo *Penicillium notatum*, foi o primeiro antibiótico de amplo espectro, reconhecido como o mais famoso metabólito secundário fúngico que influenciou nas práticas da medicina. Dez anos após o registro de Fleming, o antibiótico foi purificado e teve papel importante no curso das pesquisas farmacêuticas, além de ter salvado milhares de vidas durante a Segunda Guerra Mundial (KELLER *et al.*, 2005).

Aproximadamente no mesmo período da descoberta da penicilina, em 1935, o pesquisador alemão da companhia farmacêutica Bayer, Gerhard Domagk, identificou o corante que inibiu o crescimento de estreptococos e estafilococos patogênicos,

chamado de “vermelho de prontosil”. Jacques e Therese Trefouel, do Instituto Pasteur em 1935, demonstraram que o componente ativo do vermelho de prontosil era uma sulfanilamida. Em 1940, os pesquisadores britânicos Woods e Fildes demonstraram a similaridade entre sulfanilamida e o ácido para-aminobenzóico (PABA), e relataram que o mecanismo de ação da sulfanilamida ocorria por inibição competitiva com a enzima necessária para o metabolismo de PABA em bactérias que sintetizavam ácido fólico. A sulfanilamida, por sua vez, assim como várias outras drogas sulfoderivadas desenvolvidas na época, foi agente químico sintético e não naturalmente produzido por microorganismos, como por exemplo, a estreptomicina, produzida pela bactéria *Streptomyces griseus* (CALDWELL, 1995).

2.3 Antibióticos: mecanismo de ação e resistência bacteriana

Os principais grupos de drogas antimicrobianas são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Podem atuar interferindo na biossíntese da parede celular, síntese de proteínas ou na replicação e reparo de DNA bacteriano (Tabela 1) (WALSH, 2000). No entanto, sabe-se que existem bactérias naturalmente resistentes, e as que desenvolvem resistência à ação destas drogas. O principal fator que confere resistência do microorganismo contra estas drogas consiste em alteração em seu genoma, por meio de mutação ou pela transferência horizontal de genes resistentes que se encontram em várias formas de elementos móveis do DNA, tais como: plasmídeos, transposons e integrons (NORMARK e NORMARK, 2002). Estes elementos diferem no tamanho, estrutura, propriedades biológicas, bem como as vias de disseminação (SCHWARZ e DANCLA, 2001).

Dentre os diferentes mecanismos de resistência descritos para microrganismos, cita-se os 3 principais: *Destruição do antibiótico* (resistência a dalfopristina e penicilinas) - enzimas catalisam a degradação do antibiótico ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, criando funções inativas para o reconhecimento molecular; *Efluxo contínuo do antibiótico* (resistência a tetraciclinas e fluoroquinolonas) - genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias no meio citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo concentração insuficiente para atuar como bloqueador de funções celulares; *Reprogramação e modificação da estrutura-alvo*

(resistência à eritromicina e vancomicina) - alvos macromoleculares do antibiótico, como ribossomos, proteínas e constituintes da parede celular, são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo e diminuindo sua potência (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Tabela 2 Principais famílias de antibióticos e mecanismos de ação (Levy e Marshall, 2004)

Mecanismo de ação	Família do antibiótico
Inibição da síntese de parede celular	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, daptomicina, monobactâmicos e glicopeptídeos.
Inibição da síntese de proteína	Tetraciclinas, aminoglicosídeos, oxazolidinonas, estreptograminas, quetolídeos; macrolídeos e licosamidas.
Inibição da síntese de DNA	Fluoroquinolonas.
Inibição competitiva de síntese com ácido fólico	Sulfonamidas e trimetoprin.
Inibição de síntese de RNA	Rifampicina.
Outros	Metronidazol.

Os plasmídeos são moléculas de DNA de fita dupla abrigando determinantes genéticos capazes de carrear um ou mais genes de resistência e de replicação independente do cromossomo bacteriano. Os transposons são flanqueados por sequências invertidas repetidas, codificando transposases, as quais são enzimas que introduzem “nicks” ao final destes elementos para permitir a integração à sequências de inserção, constituintes normais de plasmídeos e cromossomos bacterianos. Esses podem carrear vários *cassetes* de genes e participam na mobilização destes dentro de um cromossomo. Os integrons são “plataformas de montagem”, que incorporam material genético através de recombinação sítio-

específico e contém região promotora para expressão. Apresentam-se imóveis no cromossomo e são menos associados aos transposons (COSTA, 2007).

A disseminação destes elementos por transferência horizontal ocorre através de três mecanismos em populações microbianas, que são: transformação, conjugação ou transdução, e conferem três principais mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos, que são: inativação enzimática do composto químico, bombas de efluxo e modificação do sítio de ligação do antimicrobiano (DZIDIC e BEDEKOVIC, 2003; WALSH, 2000).

2.4 Aplicação dos antibióticos: Prevenção e controle de infecções e promoção do crescimento em animais de produção.

Animais de todas as espécies estão em contínuo contato com microorganismos. As bactérias ocorrem mais abundantemente em habitats onde os animais encontram alimentos, umidade e temperatura, que são apropriados para crescimento e multiplicação bacteriana. Normalmente todos os seres vivos possuem população microbiana normal, chamada de *microbiota normal* (SORUM e SUNDE, 2001).

Assim como na medicina humana, os antibióticos são utilizados para prevenção e controle de doenças em animais. Também para promoção do crescimento, os antibióticos são utilizados em animais de produção alimentar. O controle e prevenção de infecções bacterianas são alcançados a cada aplicação terapêutica, metafílica e profilática de antimicrobianos. Para isso, substâncias principalmente de mesma classe, como os utilizados na medicina humana, estão disponíveis para o tratamento de animais de produção (SCHWARZ, 2001).

Terapeuticamente, os antimicrobianos são administrados para combater infecção declarada em apenas um animal, ou, no bando, via oral ou parenteral. A aplicação metafílica ocorre quando número limitado de animais encontra-se infectado, sendo a administração do antimicrobiano realizada para todos os animais do bando como medida preventiva de disseminação da infecção. A administração profilática de antibióticos tem ação preventiva, na qual o antimicrobiano é administrado individualmente, ou em grupos de animais em determinadas circunstâncias, e em alguns períodos de vida do animal, tais como: cirurgia, vacinação, transporte e mistura de animais, desmame de suínos e ao final de

lactação de vacas leiteiras. Nestes períodos os animais são geralmente reconhecidos como mais susceptíveis à infecções (SCHWARZ, 2001).

Como promotores de crescimento, os antibióticos são administrados em níveis subterapêuticos na alimentação de animais, que podem ter ganho de peso corporal em 5%, melhorando as taxas de conversão alimentar, sem a necessidade de aumentar a quantidade de ração (SORUM e SUNDE, 2001).

Atualmente o aumento na resistência antimicrobiana é preocupação de saúde pública e sua emergência e disseminação são problemas complexos causados por vários fatores interligados, em particular o uso e abuso dos antimicrobianos. A correlação entre uso intenso de antimicrobianos e desenvolvimento de bactéria resistente é bem demonstrado para bactérias patogênicas. Animais de produção alimentar, como por exemplo, gado bovino, suínos, frango e peru, assim como seus derivados, são reservatórios de patógenos, dentre estes, *Salmonella* spp e *E. coli* (AHMED, 2009).

Witte (2000) relata que a pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais de produção parece ter criado grandes reservatórios de resistência a antibióticos transferíveis nestes ecossistemas. Perron *et al* (2008) destacam que as bactérias resistentes que são encontradas em animais produtores de alimentos podem contaminar os produtos alimentícios e serem transferidas para humanos através da cadeia alimentar. No trato gastrointestinal, Rapini *et al.* (2004) citam que as bactérias podem transferir genes que conferem a resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não relacionadas, patogênicas, ou não.

2.5 Principais bactérias de animais e humanos como patógenos

2.5.1 Gênero *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella* são distribuídas mundialmente, são correntes nos ambientes de produção animal, constituindo-se potencial problema sanitário. São microorganismos complexos que possuem variedade de fatores de virulência, como antígenos de superfície, fatores que permitem a invasividade, endotoxina, citotoxina e enterotoxina. Alguns sorovares de *Salmonella* são adaptados a espécie de hospedeiro específico, como o Typhi para humanos, o Cholerae suis para suínos e o Dublin para bovinos (BOROWSKY *et al.*, 2006),

apesar de ocasionalmente poder causar enfermidades em pequenos ruminantes, suínos e humanos (HOELZER *et al.*, 2011), enquanto outros como o Typhimurium, o Anatum e o Newport, entre outros, afetam grande número de hospedeiros, desempenhando importante papel na disseminação destes agentes entre (as) diferentes espécies (BOROWSKY *et al.*, 2006).

A *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis é frequentemente encontrada no trato intestinal de animais domésticos e selvagens, sendo muito comum em aves (PETTER, 2001). Frangos e perus são principais fontes de salmonela que causam doenças em humanos e são mais frequentemente isoladas de aves do que de carne vermelha (GYLES, 2008). Tem sido a principal causa de pandemia de salmonelose de origem alimentar em humanos nos últimos 20 anos, além de serem causadores de distúrbios gastrointestinais em diversas espécies de mamíferos, aves e répteis (GANTOIS *et al.*, 2009).

A *Salmonella* Enteritidis é o único patógeno humano que contamina ovos rotineiramente, embora o ambiente de produção de aves seja fonte rica de diversos sorotipos de Salmonela (PETTER, 2001). A pandemia de *S. Enteritidis* envolve interações do patógeno com vários ambientes, que incluem o galinheiro, o pássaro, o ovo, bem como o hospedeiro humano. Os ovos podem ser contaminados na superfície da casca, externa e internamente (GANTOIS *et al.*, 2009).

Ao contrário do que se pensava anteriormente, que apenas ovos com a casca rachada poderiam ser contaminados e potenciais fontes de contaminação para humanos (ALCAMO, 1994), sabe-se atualmente que a contaminação de ovos pode ocorrer por duas possíveis rotas. A primeira por meio da penetração do microorganismo através da casca a partir do intestino colonizado, ou por fezes contaminadas durante ou após a oviposição (transmissão horizontal) e a segunda por contaminação direta da gema, albúmem e membranas da casca ou casca do ovo antes da oviposição, provenientes dos órgãos reprodutores infectados com a bactéria (transmissão vertical) (GANTOIS *et al.*, 2009).

A *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, assim como outras salmonelas, inicia a infecção (por) ao aderir e invadir células da mucosa intestinal, principalmente as da região terminal do íleo. A partir destas, o microorganismo pode invadir e proliferar em macrófagos e neutrófilos, principalmente, e em sequência, alcançar

órgãos internos do hospedeiro, tais como linfonodos, fígado, baço e corrente sanguínea (MICHAELSEN *et al.*, 2011).

Em suínos, a forma clínica da doença pode se manifestar como septicemia aguda ou como enterocolite aguda ou crônica. Suínos que sobrevivem à septicemia aguda podem desenvolver sinais clínicos devido às lesões localizadas, como pneumonia, hepatite, enterocolite e ocasionalmente, meningoencefalite. Animais com enterocolite podem vir a desenvolver definhamento crônico ou recuperar-se totalmente, mas alguns poderão permanecer como portadores e excretadores intermitentes do patógeno por meses (KICK, 2004).

Em suínos foi demonstrado que portadores assintomáticos podem contaminar o ambiente, os equipamentos e a carcaça. No abatedouro, as etapas de escaldagem e depilação foram consideradas pontos críticos de controle de salmonelas na linha de abate de suínos (MICHAELSEN *et al.*, 2011).

A transmissão de *Salmonella* sp. ao homem ocorre principalmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, o que pode resultar em toxinfecções alimentares (BOROWSKY *et al.*, 2006; HOELZER *et al.*, 2011). Nas toxinfecções alimentares registradas, tanto no Brasil quanto no exterior, os sorovares de *Salmonella* isolados com maior frequência têm sido o Enteritidis e o Typhimurium (BOROWSKY *et al.*, 2006). Só nos EUA aproximadamente 1,4 milhões de casos humanos são registrados anualmente, dentre estes 15.000 hospitalizações e mais de 400 óbitos (HOELZER *et al.*, 2011).

A *Salmonella* sp., resistente à antibióticos, tem sido crescente preocupação em saúde pública. Devido a salmonelose ser de origem alimentar, infecções em humanos, que ocorrem com isolados resistentes a antimicrobianos, estão associadas a salmonelas carregadas por alimentos que são tratados com antimicrobianos (BRADEN, 2006).

2.5.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é bacilo gram-negativo componente da família Enterobacteriaceae, e constitui parte da microbiota normal do intestino humano e de animais saudáveis, impedindo o crescimento de espécies bacterianas nocivas, sintetizando apreciável quantidade de vitaminas K e do complexo B (ALCAMO, 1994).

Atualmente, existem 6 grupos reconhecidos de *E. coli* patogênicas, referidas como EEC (*E. coli* enterovirulentas), que causam gastroenterites em humanos: as enteropatogênicas (EPEC), que é agente causal da diarreia infantil e de recém-nascidos; as enterotoxigênicas (ETEC), que é agente causal de diarreia aquosa semelhante à cólera, conhecida também como diarreia dos viajantes, na qual ocorre aderência das bactérias às células epiteliais do intestino delgado, produzindo uma ou mais enterotoxinas termolábeis ou termoestáveis; as enteroinvasivas (EIEC), que apresentam sintomas semelhantes aos da shigelose, provocando diarreia através da invasão das células epiteliais do intestino grosso, causando necrose do tecido epitelial do cólon e diarreia sanguinolenta; as entero-hemorrágicas (EHEC) ou verotoxigênicas (VTEC), que causam colite hemorrágica e em casos mais graves, síndrome urêmica hemolítica, devido a produção de toxina similar à produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae*, as enteroagregativas (EAEC) e as de aderência difusa (CDC, 2011; SILVA *et al.*, 2001).

As cepas de *E. coli* são classificadas de acordo com os antígenos somáticos (O), capsular (K), flagelar (H) e pili (F). Estes microorganismos podem expressar diversos fatores de virulência, tais como: adesinas, presença de cápsula e produção de diversas toxinas, como, aerobactinas, hemolisinas, fator necrotizante citotóxico-FNC, enterotoxinas (exotoxinas termoestável e termolábil) e verotoxinas - STX1 e STX2, que conferem a capacidade de invadir tecidos e resistir aos fatores séricos inibitórios do hospedeiro (SAINDENBERG, 2008).

As adesinas fimbriais são moléculas responsáveis pela ligação da bactéria às células do hospedeiro. Normalmente, proteínas da matriz extracelular como, fibronectina, laminina ou o colágeno, funcionam como receptores para estas moléculas bacterianas (SIQUEIRA, 2006; SAINDENBERG, 2008). Estas moléculas diferem funcionalmente do pili sexual, que possui função de conjugação, e não de ligação com outras superfícies (SIQUEIRA, 2006).

A aerobactina é um sideróforo codificado pelo gene *iuc* normalmente presente em cepas mais virulentas (SIQUEIRA, 2006). A alfa-hemolisina (codificada pelo gene *hly_a*) é uma citotoxina capaz de induzir a formação de poros na membrana de diversas células do hospedeiro, resultando em morte celular (TRABULSI, 2004). A formação de poros, decorrente da ligação desta com o receptor na célula do hospedeiro permite o fluxo livre de cátions, íons e água, levando a perda do

conteúdo intracelular, alterações no citoesqueleto e no metabolismo da célula (SIQUEIRA, 2006). Juntos, alfa-hemolisina e sideróforos agem como mecanismo para aquisição de íons de Ferro em ambientes com baixa concentração deste (SAINDENBERG, 2008).

O efeito citopático da toxina, fator necrotizante citotóxico 1 (CNF-1), em linhagens celulares HeLa e Vero, é observado no desarranjo do tapete celular, formação de células gigantes e multinucleadas. A toxina CNF-1 induz profunda reorganização no citoesqueleto de actina, multinucleação e alongamento de células HeLa, formação de grandes vacúolos e capacidade de internalização bacteriana em células (SIQUEIRA, 2006).

A *Escherichia coli* é um dos mais prevalentes microorganismos de origem ambiental, na gênese da mastite bovina. As infecções mamárias por *E. coli* ocorrem sob a forma clínica, de maneira hiperaguda ou aguda, nas primeiras semanas pós-parto, caracterizadas pela difícil resolução terapêutica, nos casos com comprometimento sistêmico, e morte ocasional de animais por toxemia. A presença de mecanismo de captação de ferro exógeno, através de sideróforos, alfa-hemolisinas e enterohemolisinas contribui para virulência da *E. coli* no desenvolvimento de mastite, embora, provavelmente, não representem mecanismos essenciais na ocorrência de infecções clínicas ou subclínicas na glândula mamária bovina (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Em animais de companhia, como cães e gatos, este microorganismo está associado à piometra, (A piometra) a qual pode ser gerada a partir de hiperplasia endometrial cística, quando mudanças na produção hormonal no útero favorecem à susceptibilidade de infecções secundárias, principalmente por *E. coli* (FRANSSON e RAGLE, 2003). As infecções do trato urinário (ITUs), em homens e animais, são as infecções extra-intestinais mais comuns causadas por *E. coli*. As cepas são convencionalmente denominadas uropatogênicas (UPEC – *Uropathogenic Escherichia coli*). As linhagens de *E. coli* isoladas de cães e gatos com ITU são similares fenotipicamente e geneticamente com aquelas isoladas de pacientes humanos (SIQUEIRA, 2006).

Na avicultura industrial, a *Escherichia coli* é considerada um dos principais agentes de doença, acarretando grandes prejuízos econômicos no mundo inteiro (PIATTI e BALDASSI, 2007). São excretadas de forma contínua nas fezes dos

animais, o que torna a sua distribuição cosmopolita, permanecendo nas criações por longos períodos, contaminando o alimento e a água que servirão como via de transmissão. Os roedores e aves silvestres também podem funcionar como reservatório do agente (GUASTALLI *et al.*, 2010).

As *E. coli* patogênicas para as aves (APEC) causam, com frequência, infecções extraintestinais (ExPEC). Podem determinar síndrome complexa caracterizada por lesões em múltiplos órgãos, determinando: septicemia, perihepatite, pericardite, celulite, problemas respiratórios severos e entéricos (PIATTI e BALDASSI, 2007).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é o principal agente, de origem alimentar, causador de diarreia e colite hemorrágica, a qual é caracterizada por febre, vômito, diarreia com sangue e dores abdominais e síndrome urêmica hemolítica, caracterizada por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e falência renal aguda, ocasionada pela ação das toxinas nas células endoteliais, em humanos (HUSSEIN, 2011). As Shiga toxinas Stx1 e Stx2, ou “verotoxinas”, são os fatores de virulência responsáveis pelos sintomas hemorrágicos da doença (BURVENICH *et al.*, 2003; BOUKHORS *et al.*, 2002; HUSSEIN, 2011).

Os ruminantes são reconhecidos como principais reservatórios de *E. coli* produtora de shiga-toxina (STEC), que é potencialmente patogênica para humanos. Embora a cepa O157:H7 seja a principal causadora da síndrome urêmico hemolítica, mais de 100 outros sorotipos têm sido associados com casos esporádicos da doença (BOUKHORS *et al.*, 2002).

Na maioria dos surtos informados e casos esporádicos de enfermidades humanas, a infecção por *E. coli* produtora de shiga-toxina (STEC) foi atribuída ao consumo de leite cru, através da contaminação do úbere das vacas ou dos equipamentos de ordenha com conteúdo fecal, carne moída mal cozida e outros derivados cárneos (defumados, rosbife e linguiças) contaminados com a O157 ou outros sorotipos (HUSSEIN, 2011). A carne pode ser contaminada durante o abate ou processamento inadequado quando as bactérias intestinais contaminam a carcaça ou quando a carne é moída. Além da fonte animal de infecção, o consumo de brotos de alfafa e alface contaminados com a bactéria pode causar infecções em humanos (CDC, 2011).

2.5.3 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é bactéria anaeróbica facultativa, gram-positiva, catalase positiva, pertencentes à família Micrococcaceae. Representam normalmente parte da microbiota normal da pele e das superfícies mucosas do trato respiratório, alimentar superior e urogenital de mamíferos e aves. Embora seja parte da microbiota normal, este microorganismo pode causar diversas infecções, considerado, portanto, como patógeno oportunista (WERCKENTHIN *et al.*, 2001).

O *S. aureus* é o agente mais comum de infecções piogênicas. Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas. Na pele podem ter diferentes denominações de acordo com o local da infecção, tais como: foliculite (infecção de apenas um folículo piloso), furúnculo, ou abscesso (com infecção de vários folículos pilosos ou glândulas sebáceas obstruídas, com envolvimento de tecido celular subcutâneo) e terçol, quando a infecção ocorre na glândula marginal das pálpebras. Entre as infecções mais profundas, destacam-se osteomielite, bacteremias, endocardite e pneumonia (TRABULSI, 2004).

A bactéria é causadora de infecção da pele conhecida como “síndrome da pele escaldada” ou doença de “Ritter”. Nesta doença, que atinge normalmente crianças, a pele torna-se vermelha, enrugada e sensível ao toque, com aparência de lixa e pode sofrer descamação. As toxinas (toxina esfoliativa) produzidas de um ponto distante da pele são responsáveis por estas condições. Além da pele escaldada, o *S. aureus* pode causar a “síndrome do choque tóxico”. A TSST-1 é reconhecida como a principal causa da síndrome que também é causada, menos frequentemente pelas enterotoxinas SEA, SEB, SEC ou SED, primariamente B e C1 (LUZ, 2008). A toxina produzida pela bactéria causa colapso sanguíneo e até falência cardíaca (ALCAMO, 1994).

O *Staphylococcus aureus* pode estar presente em vários produtos alimentícios como doces, carnes e derivados, e leites e derivados sem causar alteração de suas características sensoriais. A maioria das cepas de *S. aureus* produz uma enterotoxina que é resistente ao calor, e que tem propriedades de induzir os sintomas clássicos de vômitos, diarreia e dores abdominais (CORBIA *et al.*, 2000). Apesar de ser quase incomum a fatalidade de intoxicação alimentar estafilocócica, ela ocorre ocasionalmente em indivíduos debilitados imunologicamente, idosos e crianças em tenra idade (CUNHA e CUNHA, 2007).

O *S. aureus* é um dos principais agentes de mastite considerada contagiosa e está amplamente distribuído entre, ovelhas, vacas e cabras (SÁ *et al.*, 2004). A infecção é frequentemente subclínica em bovinos, levando à redução na produção e qualidade do leite, mas inflamação aguda catarral ou gangrenosa pode também ocorrer. Porém, em ovelhas e cabras, a mastite gangrenosa aguda enzoótica é normalmente observada (WERCKENTHIN *et al.*, 2001).

Sultra e Poultrrel (1994) destacam que a presença de lesões no tecido da teta permite a colonização persistente com *S. aureus*. A transmissão da bactéria entre as tetas de um mesmo animal, ou de um animal para outro, ocorre principalmente no momento da ordenha, através das mãos do ordenhador, recipientes utilizados para coleta do leite e panos para higienização das tetas.

Recentemente a emergência de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) está implicada com o aumento no número de hospitalizações de crianças e adultos (WEESE *et al.*, 2006). Cepas de MRSA são resistentes à todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, através da proteína de ligação à penicilina (*penicillin binding protein-PBP2a*), que apresenta baixa afinidade por todas as drogas desta classe (KHANNA *et al.*, 2008).

Alguns isolados de *S. aureus* produzem série de fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade. A cápsula, apresentada por algumas cepas de *S. aureus*, é a camada polissacarídica com atividade antifagocítica por células do sistema imunológico, o que favorece a permanência do microorganismo no hospedeiro (TUCHSCHERR *et al.*, 2005).

A formação de biofilme confere maior capacidade de adesão às células do hospedeiro e resistência aos tratamentos com antimicrobianos (RIZK *et al.*, 2006).

A proteína A estafilocócica (SpA) é a molécula ligada a superfície da parede celular das bactérias que confere capacidade de se ligar a porção Fc de muitas subclasses de IgG, além de outros componentes do hospedeiro. Tal comportamento torna a bactéria mais resistente à ação fagocítica dos neutrófilos (SEAGHDHA *et al.*, 2006).

O *S. aureus* é capaz de produzir toxinas hemolíticas (alfa, beta, gama e delta) e enterotoxinas (A, B, C, D, E TSST-1, G, H e I, sendo a C dividida em 3 subgrupos), que são termoestáveis e resistentes à inativação por enzimas proteolíticas. Estas toxinas são consideradas superantígenos por sua habilidade em ativar a proliferação

de células T policlonais em concentrações picomolares (KRAKAUER, 1999). Além da produção de outras enzimas como beta-lactamase, hialuronidase, catalase e coagulase (SANTOS *et al.*, 2007; BALABAN e RASOOLY, 2000).

2.5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* apresenta-se como bacilo gram-negativo aeróbio, ubíquo, considerado como patógeno oportunista, identificado em diversas afecções, tanto nos humanos como nos animais, observadas especialmente em quadros de otite, cistite, endometrite, encefalite, linfadenite, mastite, dermatite, abscessos, pneumonia, enterite e septicemia. No ambiente, é encontrado preferencialmente na água, no solo e, ocasionalmente, nas plantas. Nos animais, pode ser isolado das mucosas e fezes (ARMSTRONG *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2009).

Em ambientes nosocomiais é responsável por infecções pulmonares devido à colonização de aparelhos de respiração nas unidades de terapia intensiva (UTI), sendo mais preocupante a infecção de pacientes com fibrose cística. É também agente etiológico de outras infecções hospitalares diversas, como por exemplo, infecções de queimaduras extensas, ou feridas, assim como infecções do trato urinário e bacteriemia (POOLE e SRIKUMAR, 2001; ARMSTRONG *et al.*, 2009).

Dentre os mecanismos de patogenicidade de *P. aeruginosa*, pode-se citar os fatores envolvidos como a exotoxina A (citotoxina), seus componentes da membrana externa, como lipopolissacarídeos (LPS), proteínas e fosfolipídeos. O LPS desempenha papel imunoestimulante e confere a capacidade de aderir-se à superfície das células pulmonares e da córnea (BEATTIE e MERRILL, 1999; PALMA *et al.*, 2011).

A *P. aeruginosa* é frequentemente resistente a muitos antibióticos utilizados comumente. Sua resistência intrínseca está relacionada à permeabilidade da membrana externa associada à presença de bombas de efluxo multidrogas energia-dependente, além de beta-lactamases geneticamente codificadas (NORMARK e NORMARK, 2002). Embora muitas cepas sejam suscetíveis à gentamicina, tobramicina, colistina e amicacina, formas resistentes têm se desenvolvido. Os antibióticos carbapenêmicos são os principais agentes de defesa contra *Pseudomonas aeruginosa*, porém a prevalência de resistência a estas drogas tem

aumentado mundialmente, principalmente na América Latina (ZAVASCKI *et al.*, 2005).

2.5.5 *Enterococcus faecalis*

Os *Enterococcus* spp. são bactérias ubíquas, presentes no trato gastrointestinal de mamíferos e outros animais, como suínos e aves, e em alimentos, tais como, leite, carne e queijo. Embora sejam microorganismos comensais no intestino da maioria dos animais, possuem resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos e habilidade para adquirir eficientemente determinantes de resistência (DONABEDIAN *et al.*, 2010; RIZZOTTI *et al.*, 2009).

Ultimamente têm sido considerados como patógenos emergentes de humanos e são frequentemente identificados como causa no aumento do número de infecções adquiridas em ambientes nosocomiais (RIZZOTTI *et al.*, 2009). A habilidade na formação de biofilme pelo gênero *Enterococcus* permite a colonização de superfícies inertes e biológicas, protege contra agentes antimicrobianos e ação de fagócitos, mediando a adesão e invasão de células do hospedeiro (PARADELLA *et al.*, 2007). O biofilme resulta da colonização de comunidades bacterianas crescendo em agregados de superfície, envolvido por matriz de exopolímeros. O biofilme confere mais resistência aos antibióticos, quando comparados à bactérias que vivem livremente (DEL PAPA *et al.*, 2007).

Dentre os fatores de virulência envolvidos na patogênese de infecções enterocócicas, encontram-se, substância de agregação, gelatinase, citolisina e proteína de superfície enterocócica (BIAVASCO *et al.*, 2007).

As substâncias de agregação são proteínas de superfície induzidas por ferormônio, que facilitam a troca conjugativa de plasmídeos, além de contribuir para a adesão e internalização da bactéria, assim como sua sobrevivência no interior de macrófagos (BIAVASCO *et al.*, 2007).

A gelatinase é uma metaloprotease dependente de zinco, que atua na degradação de fibrina, fibrinogênio e colágeno, contribuindo para a formação de biofilme (THURLOW *et al.*, 2010). A citolisina é toxina hemolítica, que além de lisar hemácias, apresenta atividade de bacteriocina para outras bactérias gram-positivas, favorecendo sua prevalência no local em que a bactéria se encontra (FURUMURA *et al.*, 2001). Por fim, a proteína de superfície estafilocócica confere a habilidade para

E. faecalis não ser reconhecido pelas células de defesa do hospedeiro, permitindo sua permanência no local da infecção (SHANKAR *et al.*, 2002).

A terapia antimicrobiana para as enfermidades causadas por enterococos são de difícil resolução, quando a maioria dos antibióticos não tem efeito bactericida em concentrações clinicamente relevantes. Dessa forma, as infecções enterocócicas sistêmicas, como endocardites, são comumente tratadas com um agente que atua na parede celular (um betalactâmico, como a ampicilina, ou um glicopeptídeo, como a vancomicina) e um aminoglicosídeo (usualmente gentamicina ou estreptomicina). Esses agentes atuam sinergicamente para promover a ação bactericida. Entretanto a resistência aos aminoglicosídeos, à ampicilina, à penicilina e à vancomicina tem se tornado importante problema, contribuindo para a redução das opções de tratamento (HORNER *et al.*, 2005).

2.6 Plantas Medicinais

As plantas respondem de forma direta ou indireta quando são atacadas por herbívoros, ou quando são infestadas por fungos e infectadas por bactérias patogênicas, através da síntese de compostos químicos, os quais possuem atividade antimicrobiana ou tóxica (CHENG *et al.*, 2007). Como todos os organismos vivos, apresentam diversos constituintes, presentes no metabolismo primário e secundário, os quais podem ser considerados medicinais quando apresentam estes constituintes farmacologicamente ativos, utilizados no tratamento e prevenção de determinadas enfermidades (DA MATA, 2011). Desde o início da civilização, as plantas têm sido utilizadas no combate de doenças, atuando como recurso terapêutico popular. O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa em plantas medicinais, por ter a mais rica biodiversidade do planeta, distribuído em seis biomas distintos (SANTOS *et al.*, 2011).

Dentre as diversas famílias botânicas que apresentam atividade biológica, citamos alguns representantes com atividade antimicrobiana utilizadas neste estudo. Membros da família Rubiaceae, da espécie *Chimarrhis turbinata*, a chimarhinina apresenta atividade antimicrobiana para bactérias do solo por peptídeos ciclotídeos, assim como pela produção de óleos essenciais de *Anthospermum emirnense* e *Anthospermum perrieri*, constituído de hidrocarbonetos sesquiterpeno e sesquiterpenos oxigenados (RASOARIVELO *et al.*, 2011). Membros da família

Ochnaceae, são representados por 85 espécies incluindo árvores, arbustos e formações arbustivas de pequeno porte, distribuídas na Ásia tropical, África, e América. As plantas medicinais desta família são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de asma, disenteria, epilepsia, problemas gástricos, queixas menstruais, lumbago, úlceras, abortivo e como antídoto de picada de cobras venenosas. Até o momento, 111 constituintes, tais como flavonóides (incluindo bi-, tri-, e pentaflavonoides), antranoides, triterpenos, esteróides, ácidos graxos dentre outros menos abundantes tem sido identificados neste gênero. Ensaio laboratoriais tanto com extratos brutos e compostos isolados tem exibido atividade analgésica, anti-HIV-1, anti-inflamatória, anti-malária, antimicrobiana e atividade citotóxica, dando suporte às aplicações populares como já mencionado. Como exemplo de um membro da família Ochnaceae, cita-se a *Brackenridgea zanguebarica*, utilizada na medicina tradicional africana, para a cura de qualquer enfermidade. O extrato etanólico da casca amarela desta planta inibiu a formação de colônias de muitas espécies de bactérias, bloqueou a replicação do vírus Herpes Simplex 1 e apresentou efeito citotóxico para diferentes linhas celulares malignizadas. De outra planta desta família, *Ouratea sulcata*, isolou-se da parte aérea vários compostos, tais como sulcatona A e o 3-hidroxi-2,3-dihidroapigenil-[1-4',O,11-3']-dihidrokaempferol que exibiram *in vitro* significativa atividade antimicrobiana (BANDI *et al.*, 2012; MÖLLER *et al.*, 2006; PEGNYEMB *et al.*, 2005).

Dentre os membros da família Clusiaceae, alguns compostos isolados, tais como, benzofenonas poliisopreniladas (nemorosona e gutiferona A) demonstram atividade contra *Staphylococcus aureus* e atividade inibitória na síntese de exopolímeros e biofilme de *Streptococcus mutans* por 7-Epiclusianona, obtida de *Rheedia brasilienses*. O extrato de folhas de *Voacanga globosa* da família Apocynaceae apresentou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, e *Salmonella Typhimurium* e atividade antifúngica contra *Candida albicans*, assim como contra protozoários, *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*. Análises fitoquímicas preliminares revelaram a composição química dos extratos da planta contendo alcalóides, saponinas, 2-deoxiaçúcares e taninos hidrolisáveis (VITAL e RIVERA, 2011).

Algumas plantas representantes da família Fabacea, subfamília Caesalpinaceae, tais como *Peltophorum vogelianum*, *Tessmania densiflora* *Bauhinia racemosa* e o gênero *Copaifera* apresentaram atividade antimicrobiana (DA MATA, 2011; GOMES *et al.*, 2006).

O gênero *Copaifera* compreende mais de 20 espécies, as quais fornecem óleos de composição distinta, principalmente sesquiterpenos e diterpenos (SANTOS *et al.*, 2008). Popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo, as copaibas são encontradas facilmente nas regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil. Na região Amazônica, o uso do óleo de copaíba é tão extenso, que a copaíba destaca-se como a planta medicinal mais utilizada e conhecida pela população. As utilizações da medicina popular para o óleo são muitas e indicam grande variedade de propriedades farmacológicas. São utilizadas principalmente como anti-inflamatório das vias superiores e inferiores, cicatrizante e antissépticos (GOMES *et al.*, 2006; VEIGA JUNIOR E PINTO, 2002). Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *Copaifera officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Duck e *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguay), *C. coriacea* Mart. (Bahia) e *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002).

2.7 Solos do Amapá

O estado do Amapá, em seu domínio territorial, alcançando cerca de 143.000 km², em suas florestas nativas, ainda se encontra densamente preservado, possuindo apenas cerca de 3% de sua área desmatada, apresentando grande diversidade biológica abrigada em diferentes ecossistemas como mangues (2.785 km²), cerrados (9.862 km²), campos inundáveis (16.065 km²), florestas de Terra-Firme (103.082 km²), de transição (3.906 km²) e de várzeas (6.959 km²), além dos seus 795 km² de águas superficiais (ZEE/AP, 2008).

Os principais tipos de solo encontrados no estado do Amapá são: latossolo amarelo, (e) latossolo vermelho e gleissolo háplico. Os latossolos amarelos estão localizados em relevo plano e de pluviosidade elevada, apresentando estágio avançado de intemperização e processo intenso de lixiviação, já o latossolo vermelho se encontra em relevo ondulado. Em geral observa-se que este tipo de

solo apresenta acidez média a elevada, associada principalmente a teores médios de alumínio e a solos de textura média a argilosa. Apresentam também teores de potássio, cálcio, magnésio, fósforo e matéria orgânica baixo (Tabela 2, 3 e 4), portanto, de baixa fertilidade natural. Em contrapartida, sua baixa fertilidade é compensada pela degradação da matéria vegetal em senescência, fundamental no armazenamento de água e nutrientes no solo, bem como para a manutenção e aumento da biomassa nesses ecossistemas (STARK e JORDAN, 1978; GONÇALVES, 2009; SEGÓVIA, 2012).

Tabela 3. Análise físico-química de solos de diferentes áreas de Cerrado no estado do Amapá (Segóvia, 2012)

Local	pH (H ₂ O)	K ⁺ (cmol _c / dm ³)	Ca ²⁺ +Mg ²⁺ (cmol _c / dm ³)	Al ³⁺ (cmol _c / dm ³)	H ⁺ +Al ³⁺ (cmol _c / dm ³)	P (mg/ dm ³)	M.O. (g/ dm ³)	Silte (%)	Areia (%)	Argila (%)
Macapá	4,8	0,04	0,65	0,85	4,54	4	3,5	26	43	31
Itaubal do Pírim	4,6	0,08	0,2	0,8	4,25	3	3,4	11	68	21
Ferreira Gomes	5,1	0,01	0,25	0,4	1,9	1	1,2	12	70	18
Tartarugalzinho	4,9	0,43	2,8	0,4	8,6	1	29,29	21,5	67,8	10,7
Tartarugalzinho	4,7	0,10	0,4	1,1	8,1	3	24,83	38,3	46,5	15,2
Amapá	4,5	0,05	0,2	1,5	10,9	2	25,72	48,5	40	11,5
Amapá	4,4	0,08	0,2	1,6	11,7	2	35,25	43,7	47,8	8,5
Calçoene	4,5	0,10	0,5	1,5	19,5	2	51,64	34,9	40,9	24,2
Calçoene (Cunani)	4,7	0,13	0,7	3,6	27,1	2	73,68	78,8	4,1	17,1

Tabela 4. Análise físico-química de solos de diferentes áreas de floresta de Terra Firme no estado do Amapá (Segóvia, 2012)

Local	pH (H ₂ O)	K ⁺ (cmol _c /dm ³)	Ca ²⁺ +Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	Al ³⁺ (cmol _c /dm ³)	H ⁺ +Al ³⁺ (cmol _c /dm ³)	P (mg/dm ³)	M.O. (g/dm ³)	Silte (%)	Areia (%)	Argila (%)
Oiapoque	4,1	0,09	0,4	1,8	14,03	2	5,5	25	28	47
Calçoene (Lourenço)	4,1	0,05	0,2	1,5	7,8	2	18,67	41,3	44	14,7
Calçoene (Luorenço)	4,1	0,15	1,5	1,0	14,2	2	49,65	48,8	25,8	25,5
Calçoene (Lourenço)	4,6	0,15	3,4	0,2	9,4	2	47,67	30,4	20,9	48,7
Calçoene (Carnot)	4,7	0,08	1,3	0,8	12,0	2	32,27	22,5	63,6	13,9
Laranjal do Jari	4,6	0,05	1,7	0,5	13,53	6	4	34	17	49
Porto Grande	4,1	0,03	0,15	0,9	4,79	<1	1,6	10	66	24
Mazagão	4,6	0,06	0,5	1,65	8,91	1	2,5	87	2	11

Tabela 5. Análise físico-química de solos de floresta de Terra Firme no estado do Amapá (Segóvia, 2012)

Local	pH (H ₂ O)	K ⁺ (Cmol _c /dm ³)	Ca ²⁺ +Mg ²⁺ (Cmol _c /dm ³)	Al ³⁺ (Cmol _c /dm ³)	H ⁺ +Al ³⁺ (Cmol _c /dm ³)	P (mg/dm ³)	M.O. (g/dm ³)	Silte (%)	Areia (%)	Argila (%)
Pedra Branca	5	0,04	0,9	1	4,29	1	2,3	20	33	47
Serra do Navio	4,6	0,06	0,5	1,65	8,91	1	2,5	37	22	41

O gleissolo háplico é característico de solos formados nas várzeas e planícies aluviais por sedimentação de colóides arrastados na rede hidrográfica da bacia Amazônica. Apresentam coloração variando de cinzento-azulado ou esverdeado,

característica de drenagem e aeração deficiente. São pouco profundos e de textura siltosa, bastante plásticos e pegajosos. Quanto à fertilidade, podem ser eutróficos, se a saturação de bases é maior que 50%, e distróficos se a saturação de bases é menor que 50% (SEGÓVIA, 2012).

Segóvia (2012) descreve que as amostras de gleissolos háplicos sob cobertura vegetal de Floresta de Várzea, apresentam valores da acidez variando de 5,7 a 6,5 (acidez média a baixa), conduzindo a boa disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento dos vegetais como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro e molibdênio (Tabela 5). Apresentam também baixa disponibilidade de alumínio e elevada disponibilidade de fósforo, o que permite boa atuação nos processos de fotossíntese e na respiração dos vegetais.

Tabela 6. Análise físico-química de solo de Campo de Várzea Graminóide no estado do Amapá (Segóvia, 2012)

Local	Ph	K ⁺	Ca ²⁺ +Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	P	M.O.	Silte	Areia	Argila
	H ₂ O	(cmol/dm ³)	(cmol/dm ³)	(cmol/dm ³)	(cmol/dm ³)	(mg/dm ³)	(g/dm ³)	(%)	(%)	(%)
Calçoene (Goiabal)	6,5	1,18	15,2	0,1	4,8	24	24,53	50,3	9	40,7
Macapá (Fazendinha)	5,7	0,38	8,3	0,5	6,8	14	19,36	77	1,5	21,5

Segundo Segóvia (2012), os dados também mostram que nos gleissolos háplicos, os teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio e matéria orgânica também são elevados, o que é indicativo de boa fertilidade e disponibilidade às plantas, permitindo bom crescimento da maioria das espécies aí ambientadas. O autor ainda cita que os ecossistemas de Várzea amapaense, a fertilização natural é uma constante. Isto está associado ao fenômeno da colmatagem, o qual consiste no depósito de colóides minerais e orgânicos nas terras baixas localizadas ao longo dos rios como o Amazonas e seus afluentes, arrastados pelas enchentes promovidas pelas marés, aumentando naturalmente a fertilidade dessas terras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do solo

As amostras de solo foram coletadas em diferentes áreas da região Amazônica no estado do Amapá, consistindo no total de 36 amostras. Todas as amostras foram coletadas de liteira (1kg de cada amostra com profundidade de aproximadamente 15cm da superfície) em área sombreada. Foram depositadas em sacos de polietileno limpos com lacre zipado devidamente etiquetados e identificados, encaminhados (sem refrigeração) ao Laboratório de Bioprospecção/UnB, para início dos experimentos de cultivo e isolamento de bactérias. Permaneceram a 4°C em geladeira até sua utilização.

3.2 Coleta de frutos e sementes de *Bertolletia excelsa* (castanha-do-pará)

A coleta dos frutos foi realizada na região Amazônica, no município de Manicoré, localizado no estado do Amazonas. Foram coletados 10 frutos caídos no solo, nas áreas de castanhais e armazenados em sacos de polipropileno estéril. As sementes foram obtidas do armazém da cooperativa de Manicoré, COVEMA.

3.3 Meios de cultura

Na preparação de todos os meios de cultura, foi utilizada água destilada como solvente e a esterilização foi realizada por autoclavação (autoclave PRISMATEC) a 121 °C por 15 minutos.

3.3.1 Caldo Lúria Bertani (Caldo LB- ACUMEDIA)

Este meio de cultura foi utilizado tanto para o isolamento de bactérias do solo como para conservação e manutenção das cepas. Seus componentes são: digerido enzimático de caseína (10g/L), extrato de levedura (5g/L) e cloreto de sódio (10g/L)- pH final 7,3± 0,2.

3.3.2 Ágar Mueller-Hinton (ACUMEDIA)

O ágar Mueller-Hinton foi utilizado para a realização do método de difusão em disco e para metodologia de teste de susceptibilidade bacteriana em “poços”. É

composto de: extrato de carne (2g/L), caseína ácida hidrolisada (17,5g/L), amido (1,5g/L) e ágar (17g/L)- pH final 7,3 ± 0,1.

3.3.3 Meio Fluido Tioglicolato (DIFCO)

O meio tioglicolato foi utilizado tanto para o semeio dos microorganismos do solo, frutos e sementes de castanha-do-pará como para a manutenção de algumas culturas mais exigentes.

3.3.4 Ágar MacConckey- (ACUMEDIA)

O meio ágar MacConckey foi utilizado para a manutenção dos bacilos gram-negativos da *American Type Culture Collection* (ATCC). Sua composição consiste em: peptona de gelatina (17g/L), peptona de caseína (1,5g/L), peptona de tecido animal (1,5g/L), lactose (10g/L), sais biliares (1,5g/L), cloreto de sódio (5g/L), vermelho neutro (0,03g), cristal violeta (0,001g/L) e ágar (13,5g/L)- pH final 7,1± 0,2.

3.3.5 Ágar extrato de solo

O meio ágar extrato de solo foi feito para o cultivo de microorganismos do solo, objetivando isolar maior quantidade de microorganismos não cultiváveis em meios convencionais, como citado nos ítems anteriores.

3.3.5.1 Preparo de extrato de solo

Para o preparo do extrato e ágar enriquecido de solo, seguiu-se a metodologia de Hamaki *et al.*, (2005). A quantidade de 1000g de cada solo foi misturado com 2L de solução de NaOH 50 mM e incubados *overnight* à temperatura ambiente. A mistura foi filtrada e centrifugada a 18.000 rpm durante 60 minutos. O sobrenadante foi esterilizado através de filtro de membrana com porosidade de 0,22 µm. Para o preparo de meio ágar extrato de solo, foi utilizada a proporção de 500 mL do extrato para 15g de ágar base.

3.4 Cepas de Bactéria- *American Type Culture Collection*

As cepas selecionadas para o teste foram: *Escherichia coli* 25922, *Escherichia coli* 35218, *Staphylococcus aureus* 25923, *Salmonella* Enteritidis 564, *Salmonella* Typhimurium 5190, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *Enterococcus*

faecalis 29212. As amostras bacterianas foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Ernesto Hoffer do Instituto Oswaldo Cruz.

As amostras bacterianas foram armazenadas a 4C° em criotubos contendo ágar nutriente até sua utilização.

3.5 Extratoteca (Extratos botânicos)

Os extratos utilizados fazem parte da extratoteca de plantas medicinais amazônicas do Laboratório de Bioprospecção da Universidade de Brasília. As plantas foram coletadas e processadas para preparo de extratos conforme descrito em Da Mata (2011).

O total de 19 extratos aquosos foram utilizados para o teste. De cada extrato foi utilizado 10 µL para impregnar discos para teste de difusão em ágar. Os ensaios foram realizados em triplicata contra as cepas ATCC. As famílias das plantas que das quais selecionaram-se espécies para preparo dos extratos foram: Família Fabaceae (membros da subfamília Caesalpiniaceae), Rubiaceae, Ochnaceae, Apocynaceae e Clusiaceae.

3.6 Cultivo de bactérias do solo e frutos/sementes de *Bertolletia excelsa*

O cultivo dos microorganismos do solo ocorreu a partir de duas metodologias: (1) semeio e isolamento em ágar Lúria Bertani (LB) e (2) enriquecimento em caldo Tioglicolato. Para as amostras de frutos e sementes utilizou-se somente o caldo Tioglicolato.

3.6.1 Semeio e isolamento em ágar Lúria Bertani

De cada uma das 36 amostras de solo coletadas foi utilizado 50mg diluídos em 9 mL de água destilada estéril, individualmente, para semeio em ágar LB em placas de petri de 90x15mm com auxílio de alça de platina de 1 µL e incubadas à 37°C por 24h. Após semeio primário, cada colônia isolada foi repicada para 4mL de caldo LB e incubada novamente sob as mesmas condições acima. Para confirmação de pureza, cada amostra isolada em caldo foi repicada para ágar LB.

3.6.2 Enriquecimento em caldo Tioglicolato

De cada uma das 36 amostras de solo utilizou-se 1g, as quais foram distribuídas e enriquecidas, individualmente, em tubos *falcon* de 50mL estéreis contendo 25 mL de Tioglicolato, onde permaneceram incubadas por 72h a 37 °C. Para as 20 amostras de frutos e sementes de castanha-do-pará, acrescentou-se 500 mL de caldo Tioglicolato para cada fruto e cada grupo de sementes em sacos de polipropileno estéreis. Estes permaneceram incubados por 72h a 37 °C. Em ambas as metodologias o procedimento foi realizado sob condições de esterilidade em câmara de fluxo laminar (ESCO) e os frascos incubados com a tampa levemente afrouxada.

3.7 Obtenção do sobrenadante das bactérias do solo para teste de difusão de disco em ágar e teste em placas de microtitulação.

Para a obtenção de meio estéril, livre de bactérias para o teste contra as cepas ATCC, cada um dos 90 isolados bacterianos obtidos de cultivo e isolamento em ágar Lúria Bertani foi cultivado isoladamente em 4mL de caldo LB em tubos *falcon* de 15mL e incubada à 37°C por 24h. Após o período de incubação, cada amostra foi centrifugada por 3min a 15.000 rpm e esterilizada por filtração em membrana para seringa de 0,22µm (Millipore) e transferidos novamente para tubos *falcon* estéreis. Todos os 90 filtrados de sobrenadante de cultivo bacteriano foram armazenados a 4°C até sua utilização.

3.8 Testes de atividade antimicrobiana

3.8.1 Teste em placa de microtitulação

Através desta metodologia pôde-se observar se os filtrados de cultivo bacteriano demonstraram atividade inibitória sobre as cepas ATCC, baseando-se nos valores de densidade ótica determinados pelo crescimento bacteriano e turbidez do meio em cada poço da placa de poliestireno. O teste foi realizado para todas as amostras de solo e para amostras de frutos e sementes de castanha-do-pará que apresentaram atividade antimicrobiana em “teste de difusão em meio sólido”.

Solo – Realizado com todos os 90 sobrenadantes de cultivos bacterianos obtidos isoladamente.

Frutos e sementes de castanha-do-pará – Realizado para todas as amostras que apresentaram atividade antimicrobiana em teste de difusão em meio sólido após filtradas (7 amostras), tanto sobrenadantes de cultivos bacterianos isolados como os de bactérias cultivadas em conjunto (bruto). O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo chato estéril. As 7 cepas ATCC, isoladamente, (carga microbiana de 26×10^3 UFC/mL) foram inoculadas horizontalmente em caldo LB mais o sobrenadante estéril. Cada uma das fileiras horizontais (com 12 poços cada) foi dividida em 3 grupos (4 poços cada grupo), constituindo dois controles, um positivo e um negativo e um grupo teste. O primeiro grupo (controle positivo), continha: 10 μ L da cepa ATCC + 90 μ L de caldo LB; o segundo, 40 μ L de filtrado bacteriano + 50 μ L de caldo LB + 10 μ L da cepa ATCC; e o terceiro (controle negativo), 50 μ L de caldo LB + 50 μ L de filtrado bacteriano. As placas permaneceram incubadas por 24h a 37°C. Para análise de atividade antimicrobiana, as placas foram analisadas por espectrofotometria (espectrofotômetro THERMO PLATE – Leitora de microplaca *Tp Reader*) em comprimento de onda de 630nm.

3.8.2 Teste de difusão de disco em ágar com sobrenadantes filtrados das bactérias do solo

Para este teste foram acrescentados 10 μ L de sobrenadante de cultivo de cada uma das 90 amostras bacterianas de solo filtradas, aos discos de filtro de 6mm, onde permaneceram por 18h em câmara de fluxo laminar até secagem para posterior teste. As amostras dessecadas foram distribuídas sobre as placas de petri de 140x15mm contendo 100mL de ágar Mueller-Hinton previamente inoculadas com a suspensão das cepas ATCC (carga microbiana de 1×10^3 UFC/mL) e semeadas com pérolas de vidro. O teste foi realizado em triplicata e a avaliação de atividade antimicrobiana foi determinada pela presença de halo de inibição ao redor dos discos (CORREIA *et al.*, 2008).

3.8.3 Teste de difusão de disco em ágar com extratos botânicos

Para este teste foram acrescentados 10 μ L de cada uma das 19 amostras botânicas aos discos de celulose (6mm), onde permaneceram em câmara de fluxo laminar até secagem para posterior teste. Dessecadas, as amostras foram

distribuídas sobre as placas de petri de 140x15mm contendo 100mL de ágar Mueller-Hinton previamente inoculadas com a suspensão das cepas ATCC (1×10^{-3} UFC/mL) e semeadas com pérolas de vidro. O teste foi realizado em triplicata e a avaliação de atividade antimicrobiana foi determinada pela presença de halo de inibição ao redor dos discos (CORREIA *et al.*, 2008).

3.8.4 Teste de difusão em meio sólido (cavidades)

Cada inóculo bacteriano (cepas ATCC com carga microbiana de 1×10^{-3} UFC/mL) foi semeado na superfície de placas de Petri (140 x 15 mm) contendo 30mL de ágar Mueller Hinton, com auxílio de pérolas de vidro estéreis. Em seguida foram realizadas perfurações de 7mm de diâmetro, com auxílio de perfurador circular contendo 9 tubos ocios de aço, estéril (Figura 1). Em cada cavidade, previamente identificada, foram depositados 40 μ L dos sobrenadantes em teste, tendo como controle positivo uma cavidade com ciprofloxacino. As placas foram incubadas a 37°C/24 h.

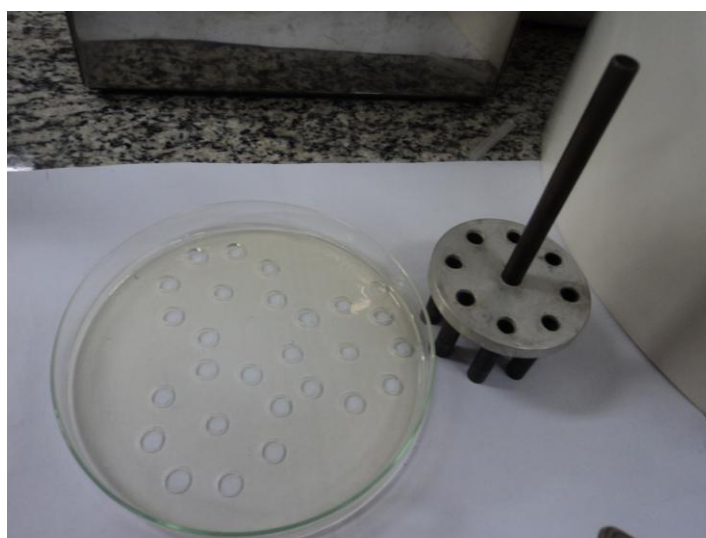


Figura 1. Placa com Agar Mueller Hinton com as cavidades para inoculação dos cultivos bacterianos.

A avaliação da atividade antimicrobiana determinada pelo método de difusão em meio sólido, foi realizada observando-se a formação de halos de inibição de crescimento ao redor das cavidades padronizadas. Foi considerado como produto

ativo, neste estudo, aquele que apresentou halo de inibição de crescimento das cepas ATCC.

As amostras que exibiram atividade antimicrobiana foram retiradas de suas respectivas cavidades da placa teste e repicadas para tubos contendo 4mL de caldo tioglicolato e incubadas a 37 °C por 24h. Após essa etapa, semeou-se cada amostra em placas de petri de 90x15mm com ágar BHI para reisolamento das colônias, as quais foram testadas novamente, individualmente, para avaliação de atividade antibacteriana.

3.9 Identificação de microorganismos que apresentaram atividade antimicrobiana

Todas as colônias que exibiram atividade antimicrobiana foram identificadas por métodos manual e automatizado (sistema de identificação automatizado VITEK 2), utilizando-se kits de identificação fenotípica da *Biomerieux*, no Laboratório de Microbiologia do Hospital da Universidade de Brasília.

3.10 Ensaio de citotoxicidade em células aderentes e em suspensão

Células de rim de gato, CrFK, estabelecidas e aderentes, foram tripsinizadas e adicionadas em meio fresco DMEM e sobrenadante filtrado de bactérias de solo e de frutos e sementes de castanha-do-pará, em placas de 96 cavidades. Periodicamente as células foram observadas quanto a presença de alterações morfológicas ou efeito citopático. O controle constou de células não tratadas com sobrenadante filtrado bacteriano. Analogamente, células HUT-78 estabelecidas, em suspensão, derivadas de linfoblastos humanos malignizados, cultivadas em meio RPMI, foram tratadas com sobrenadante filtrado de bactérias de solo e de frutos e sementes de castanha-do-pará, e periodicamente contadas utilizando-se o corante vital azul de trypan.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo em ágar extrato de solo

Comparando-se os cultivos de material de solo em ágar enriquecido com extrato de solo e não enriquecido, para isolamento de bactérias, não se observou diferenças quantitativas e qualitativas quanto ao crescimento e isolamento dos microorganismos em que suas colônias eram visíveis.

4.2 Teste de sobrenadantes filtrados de cultivos bacterianos em placas de microtitulação (espectrofotometria)

Nenhum dos sobrenadantes filtrados das amostras bacterianas cultivadas isoladamente do solo apresentou atividade antimicrobiana frente as cepas ATCC.

Todas as amostras que exibiram atividade antimicrobiana em teste de difusão em meio sólido foram confirmadas, conforme a tabela 6.

Tabela 7 Média dos valores de densidade ótica em placa de microtitulação. Teste realizado com filtrados bacterianos brutos e isolados de frutos e sementes de castanha-do-pará e do solo que apresentaram atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em meio sólido

Filtrados de *CDP e solo	Desidade ótica (630nm)	
	Grupo controle	Grupo teste (filtrados bacterianos)
Grupo G	618,5 ± 64,9	367,75 ± 39,9
Isolado G1	589,25 ± 110,7	203,5 ± 18,4
Isolado I1	584,75 ± 160,3	218,5 ± 8,7
Grupo J	548 ± 189,1	382,75 ± 59,6
Grupo K	571,5 ± 162,3	229 ± 27,6
Grupo L	619,5 ± 183,6	269,75 ± 16,2
Grupo N	610,75 ± 179,9	381,25 ± 64,2
Isolado 17	687,5 ± 111,3	412,75 ± 10,5

*CDP – castanha-do-pará

4.3. Teste de difusão de disco em ágar com sobrenadantes bacterianos do solo filtrados

Nenhum disco embebido com filtrados de sobrenadantes de cultivos bacterianos isolados apresentou halo de inibição frente as cepas ATCC.

4.4. Teste de difusão de disco em ágar com extratos botânicos

Demonstraram-se ativos extratos de *Hymenelobium petraeum* (angelim-pedra), *Vatairea guianensis* (faveira) e *Symphonia globulifera* (anani), sendo que o extrato de *H. petraeum* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Figura 2 **A** e **B**). Enquanto que os extratos de *V. guianensis* e *S. globulifera* inibiram o crescimento apenas de *Staphylococcus aureus* (Figura 2 **A**).

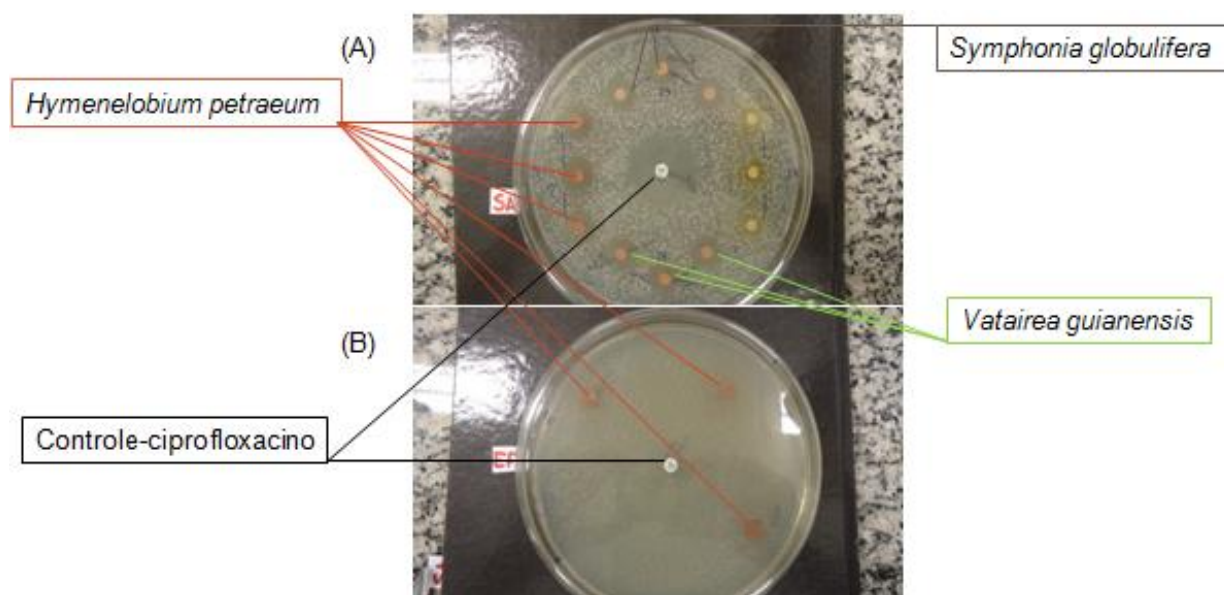


Figura 2. Extratos botânicos com atividade antimicrobiana. **(A)** Inibição de *Staphylococcus aureus* 25923; **(B)** Inibição de *Enterococcus faecalis* 29212.

4.5 Amostras de solo, frutos e sementes da castanha-do-pará enriquecidos com tioglicolato testados pelo método de difusão em meio sólido

Das 36 amostras de solo inoculadas em placas através do método de difusão em meio sólido, duas apresentaram atividade antimicrobiana, sendo *Burkholderia*

pseudomallei (figura 3) isolada de solo de área de várzea graminóide (acidez média a baixa, conforme tabela 5) e a outra colônia identificada como *Dermacoccus nishinomiyaenses*, isolada de solo de área de Cerrado (acidez média a elevada, conforme tabela 2). Ambas apresentaram atividade contra *S. aureus* 25923

Das 20 amostras de sementes (amêndoas) e frutos (ouriço) cultivadas, foram isoladas e identificadas as seguintes bactérias, em que seus sobrenadantes apresentaram atividade antimicrobiana: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Kocuria varians*, *Granulicatella elegans*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Oligella ureolytica*, *Bacillus cereus* e *Acinetobacter* spp. Todas apresentaram atividade antimicrobiana somente contra *S. aureus* (Figuras 4, 5 e 6). Para estas amostras bacterianas foi realizado o teste de difusão em meio sólido e confirmado em placas de microtitulação e análise espectrofotométrica com caráter confirmatório para a metodologia.

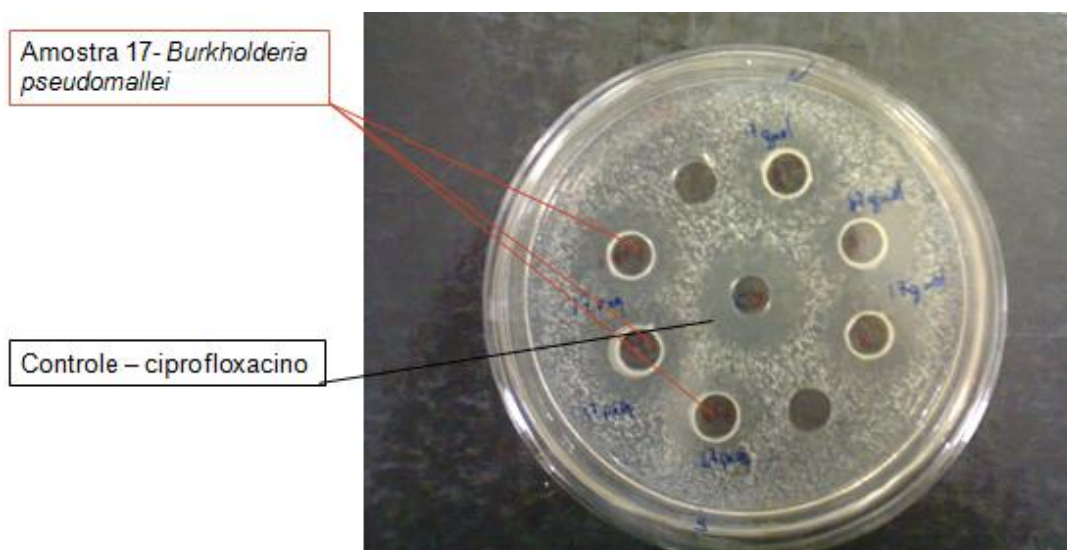


Figura 3. Filtrado bacteriano com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* 25923.

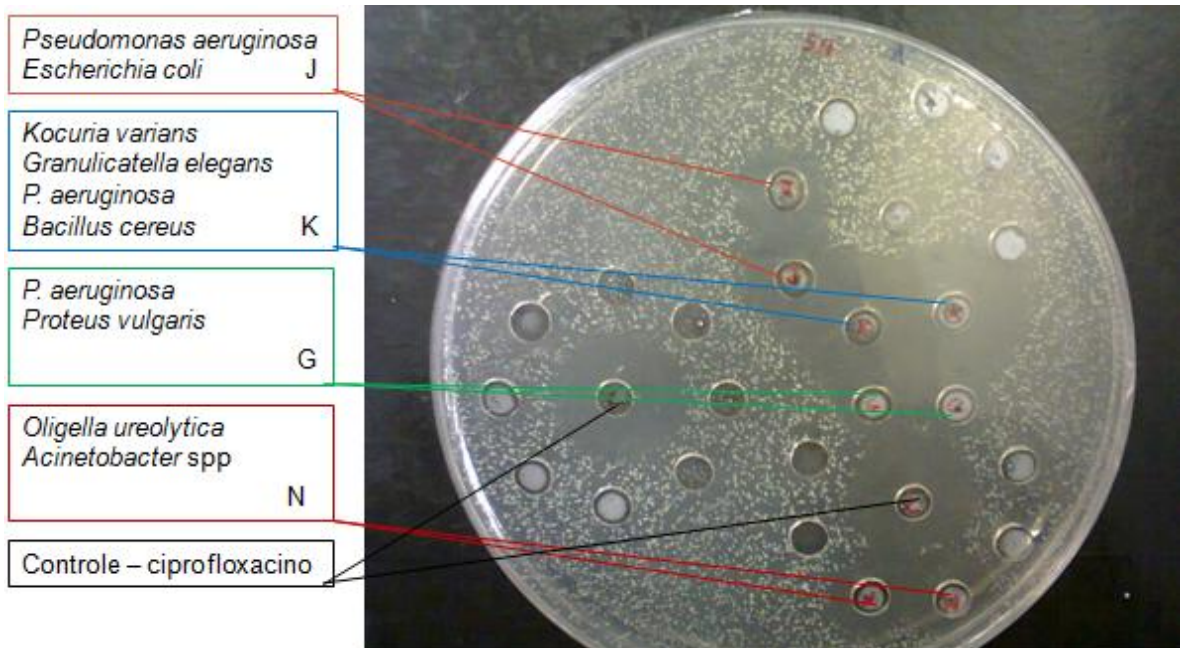


Figura 4. Filtrados bacterianos (brutos) com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* 25923.

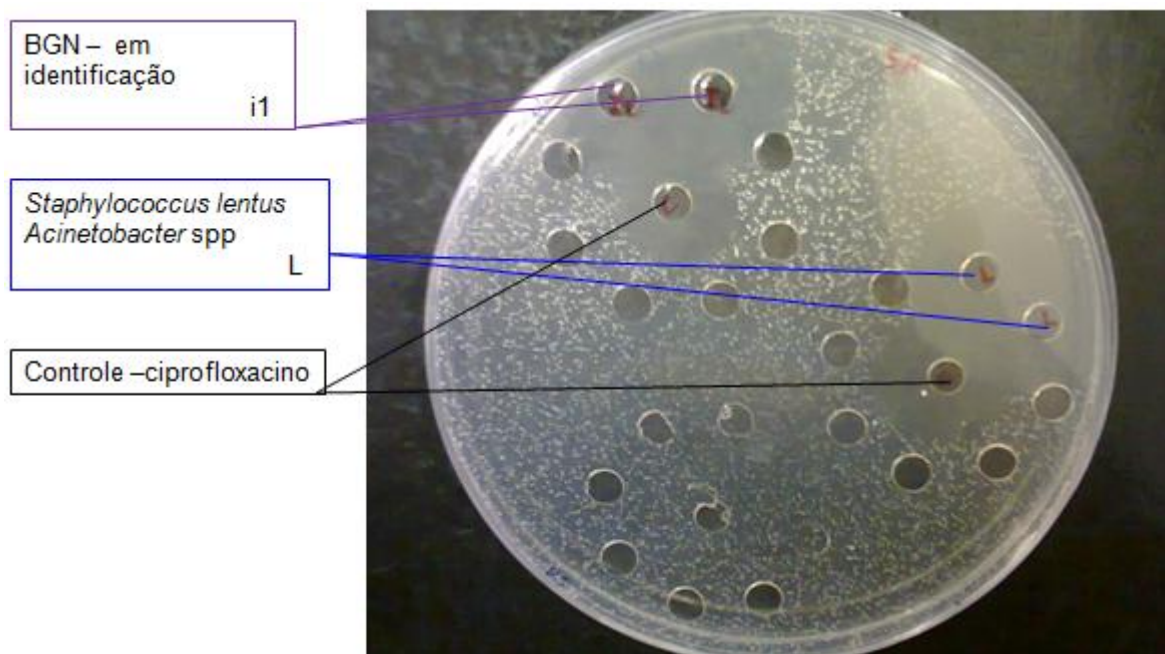


Figura 5. Filtrados bacterianos com atividade antimicrobiana contra *S. aureus* 25923.

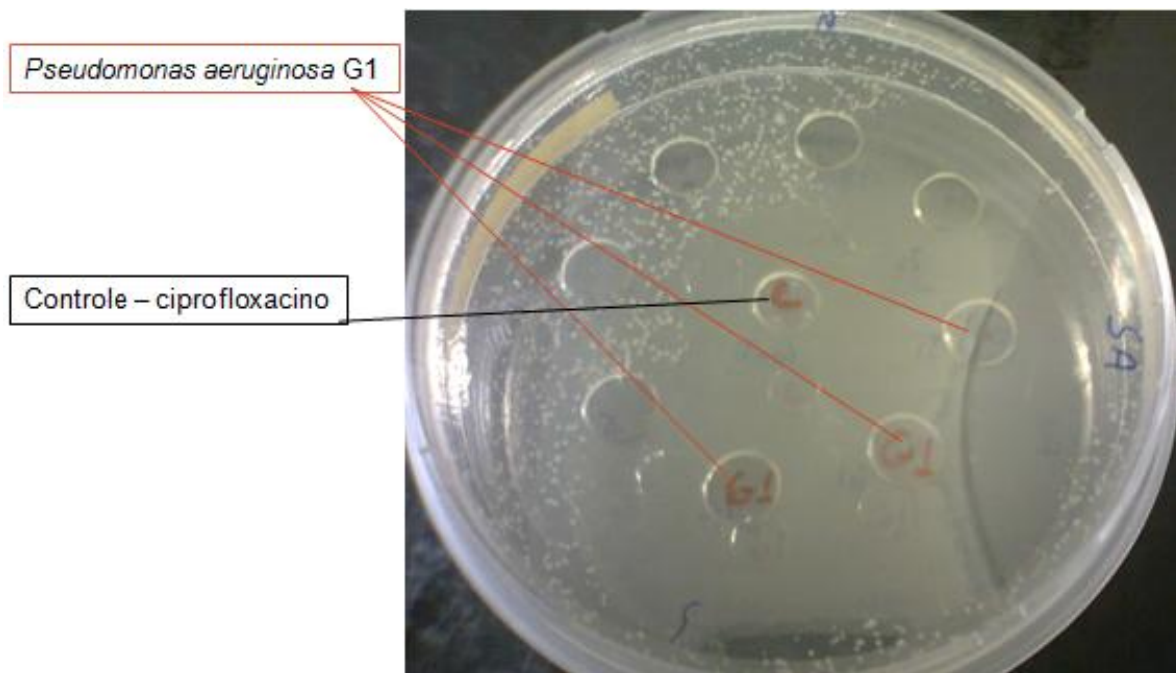


Figura 6. Filtrado bacteriano com atividade antimicrobiana contra *S. aureus* 25923.

4.6 Ensaio de citotoxicidade

Três filtrados de cultivos bacterianos apresentaram efeito citotóxico para células CrFK (Figura 7), sendo, o filtrado de i1 (BGN em identificação), o filtrado bruto do grupo (K) que continha *Kocuria varians*, *Granulicatella elegans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* e o filtrado bruto do grupo (N) que continha a bactéria *Oligella ureolytica* e *Acinetobacter* spp.

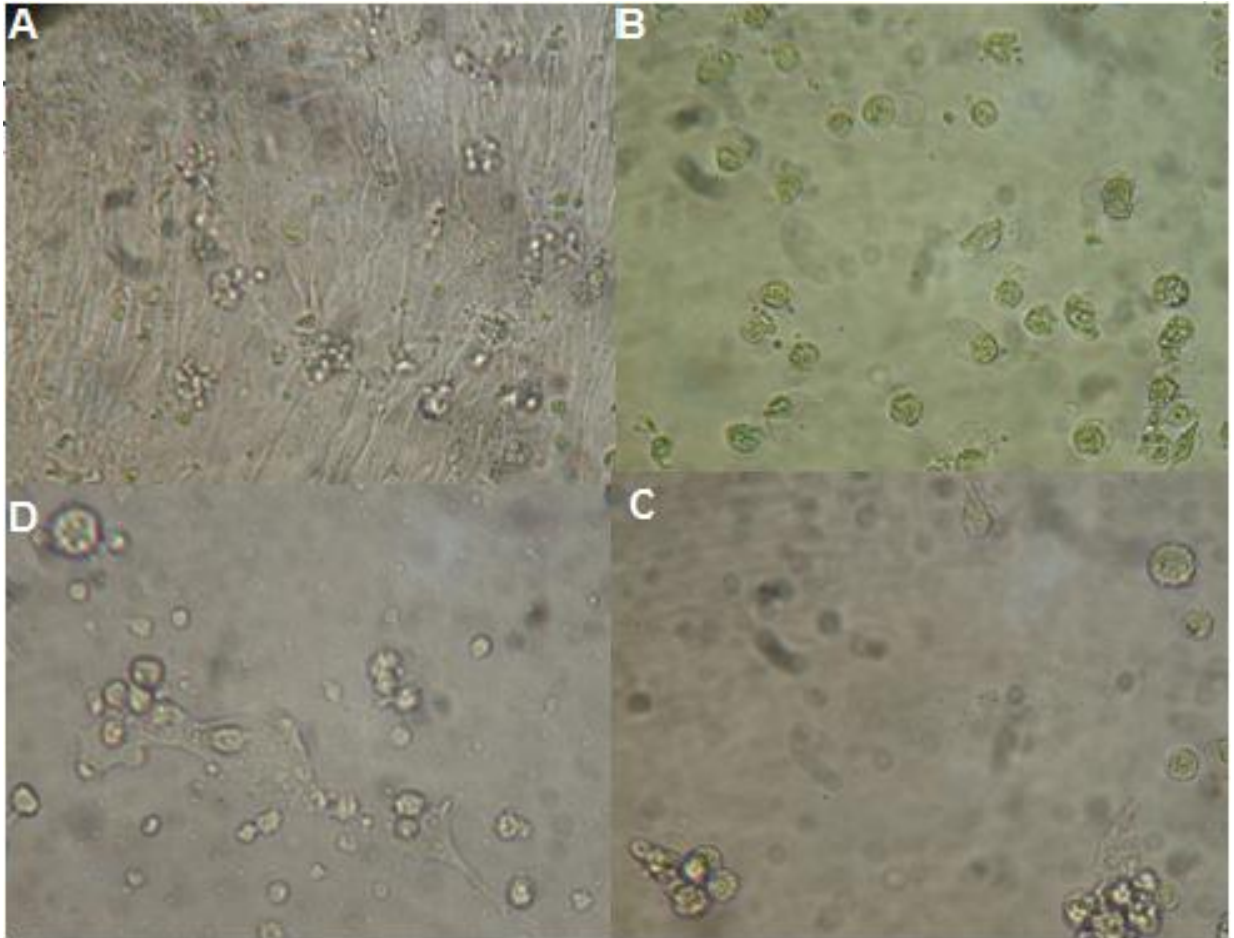


Figura 7. Efeito citotóxico observado pelo descolamento celular da monocamada. Células CrFK aderentes alteradas (A- controle– não tratadas); (B- grupo i1); (C- grupo K); (D- grupo N)

Para células HUT-78 nenhuma alteração foi observada com os filtrados bacterianos incluindo-se a densidade celular (figura 8).

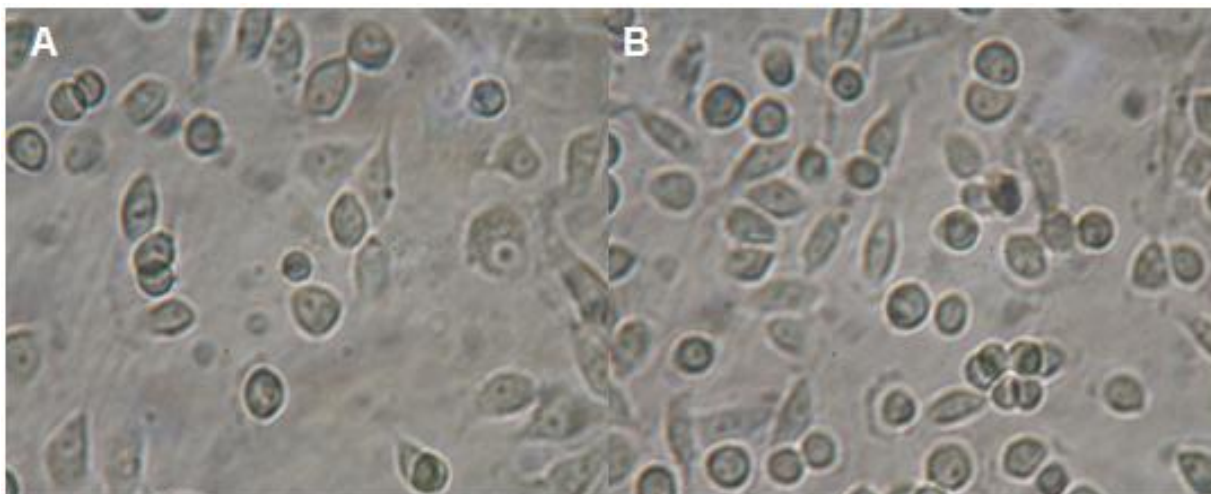


Figura 8. Células HUT-78 tratadas com filtrados de sobrenadantes de cultivo bacterianos. Ausência de efeito citotóxico. Densidade celular normal. (A) Células tratadas com filtrados bacterianos e (B) Controle– células não tratadas com os filtrados.

5 DISCUSSÃO

Visto que menos de 1% dos microorganismos no ambiente natural são cultiváveis em meios de cultura utilizados convencionalmente (HAMAKI *et al.*, 2005), o enriquecimento de ágar com extrato de solo, não demonstrou diferença quando comparado com crescimento em meio ágar base, o qual não apresenta quantidades significativas de nutrientes. Embora os ensaios tenham sido preliminares, pois a osmolaridade e potencial hidrogeniônico não foram considerados nestes preparados, estudos adicionais poderão permitir melhor rendimento, principalmente qualitativo em cultivos e isolamentos de microorganismos de solo.

Para a actinobactéria *Dermacoccus nishinomiyaensis*, componente da família Dermacoccaceae, estudo de Propísil *et al.* (1998) demonstrou que estes microorganismos são produtores de antibióticos monensina A e B, que são similares aos produzidos por bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Em nossos achados esta bactéria foi isolada de amostra de solo da área de Cerrado, que apresenta pH ácido (Tabela 2), embora cresçam melhor em pH neutro (pH=6) (PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2011). O sobrenadante desta bactéria exibiu efeito inibitório contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 e sua característica (desta) como produtora de antibióticos conforme reportado por outro grupo, poderia

explicar sua atividade antimicrobiana em nossos ensaios, além de poder demonstrar sua relação filogenética com as bactérias do gênero *Streptomyces*. No entanto, estudos adicionais são necessários para corroborar a natureza da molécula inibitória quanto a sua constituição(o) química, ou se é novo produto.

A outra bactéria isolada de solo, *Burkholderia pseudomallei*, que apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, é bacilo gram-negativo móvel não formador de esporos e saprófito, presente em água e solo contaminados. É agente causador de melioidose e é considerado como agente biológico utilizado para bioterrorismo, classificado como “agente de bioterrorismo de classe B” pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC, Estados Unidos). Esta classificação deve-se ao fato da utilização desta bactéria como agente biológico de guerra durante a primeira guerra mundial (PATHEMA, 2006).

Apesar do gênero *Burkholderia* abrigar agentes patogênicos para plantas, animais e humanos, abriga também espécies benéficas (por exemplo *B. vietnamiensis*, *B. unamae*, e *B. tropica*) associadas às plantas, realizando a fixação de nitrogênio atmosférico e conseqüentemente promoção do crescimento do vegetal. Em relação ao seu efeito inibitório contra as cepas de *S. aureus*, este pode ser explicado pela grande versatilidade e capacidade das bactérias do gênero *Burkholderia* de produzir diversos compostos antimicrobianos e outros metabólitos secundários, além de toxinas, enzimas extracelulares e sideróforos (VIAL *et al.*, 2007).

Em relação à *Oligella ureolytica*, bactéria isolada de sobrenadante de cultivo bacteriano que apresentou efeito inibitório para cepa de *S. aureus* ATCC 25923, esta é bacilo gram-negativo, urease positivo, que pode acometer pacientes utilizando catéter urinário, porém são raramente isolados, e a maioria apresenta sensibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos (BAGI e MAZZULLI, 1996). Não há relatos destas bactérias como produtoras de substâncias antimicrobianas. Nesta pesquisa, porém, o sobrenadante de cultivo que inibiu o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, foi proveniente de cultivo bruto, ou seja, apresentava-se em conjunto com outras bactérias.

A bactéria *Kocuria varians* é coco gram-positivo, comensal de humanos e animais, não patogênico, que coloniza a pele e mucosas, porém, pode ser patógeno

oportunista em indivíduos imunocomprometidos (TSAI *et al.*, 2010). Tem a capacidade de produzir variacina, que é um tipo de bacteriocina (PRIDMORE *et al.*, 1996), as quais são peptídeos sintetizados por ribossomos que tem função de matar bactérias do mesmo gênero, ou outros membros da mesma família, favorecendo a bactéria produtora melhor acesso a recursos limitados no ambiente (FONTOURA, 2008; MAJEED *et al.*, 2011).

Neste estudo *K. varians* foi isolada do grupo bacteriano cultivado em conjunto que apresentou atividade antimicrobiana quando testado seu sobrenadante de cultivo. A inibição de crescimento de *S. aureus* demonstrada nos testes (testes de difusão em meio sólido e em placa de microtitulação) pode estar relacionada com a presença de bacteriocina, visto que, do mesmo meio de cultivo que a *K. varians*, também foram identificadas outras bactérias (gram-positivas e gram-negativas), provavelmente competindo por nutrientes, sofrendo a ação destes peptídeos e também produzindo outras substâncias bioativas.

Além de *K. varians* o bacilo gram-positivo formador de esporos, *Bacillus cereus*, foi identificado de cultivo bruto exibindo antibiose também contra *S. aureus*. O gênero *Bacillus* contém várias espécies produtoras de bacteriocinas, denominadas como coagulina, cereína, subtilosina, turicina (sendo algumas com amplo espectro de ação) e outras substâncias também com ação antimicrobiana (BIZANI *et al.*, 2005). Em estudo realizado por Bizani *et al.*, (2005) o isolado bacteriano (isolado de solo de floresta nativa do sul do Brasil) denominado *Bacillus cereus* 8A produziu bacteriocina denominada como “careína A”. Esta bacteriocina apresentou atividade antimicrobiana contra outra cepa de *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis. Visto que algumas bacteriocinas produzidas apresentam amplo espectro de ação, o efeito inibitório das cepas de *S. aureus* em nosso estudo poderia ocorrer de modo similar.

Demonstrando atividade antimicrobiana, também foram identificadas as seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris*, todas provenientes de sobrenadantes de cultivos bacterianos brutos com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. As bactérias da família Enterobacteriaceae também são produtoras de bacteriocinas, denominadas colicinas, produzidas por *E. coli*; piocinas por *P. aeruginosa*; e proticinas produzidas por *Proteus vulgaris* (CURSINO, 2002; FONTOURA, 2008; ROZALSKI *et al.*, 1997).

Visto que os sobrenadantes testados foram provenientes de cultivos bacterianos brutos, nos quais se encontravam outras bactérias (tanto de bactérias gram-positivas como gram-negativas), a competição por nutrientes pode ter estimulado a produção de bacteriocinas e outras substâncias ativas, que foram responsáveis pela inibição de cepas de *S. aureus*.

A ação antagônica exercida pelas bactérias produtoras de bacteriocinas em outras bactérias inseridas no mesmo ambiente é definida como antibiose. A antibiose ocorre quando dois ou mais microorganismos presentes no ambiente podem adversamente interferir no crescimento e sobrevivência de outros. A competição por nutrientes essenciais, acúmulo de *D*-aminoácidos, redução do potencial de óxido-redução podem causar o antagonismo (FONTOURA, 2008). O mesmo autor ainda relata que diferentemente dos antibióticos utilizados atualmente, as bacteriocinas apresentam espectro reduzido de atividade antagônica. Sua especificidade para determinados patógenos exerce menor pressão seletiva sobre as comunidades bacterianas (patogênicas ou comensais), porém sua aplicação como antimicrobianos para terapia em humanos e em animais ainda necessita de mais estudos.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* foram identificadas de sobrenadantes de cultivos bacterianos de frutos de *Bertolletia excelsa* com atividade antimicrobiana (também contra *S. aureus*). Estas são cocobacilos gram-negativos não móveis, catalase e oxidase negativas reconhecidas como patógenos oportunistas, envolvidas em infecções do trato urinário, bacteremia, de ferimentos e queimaduras, principalmente acometendo pacientes imunocomprometidos (LOOVEREN *et al.*, 2004). Em relação a sua atividade antimicrobiana não foram encontrados trabalhos na literatura.

A *Granulicatella elegans* é coco gram-positivo pertencente à microbiota normal oral, podendo estar envolvido em casos de endocardite (KANAMOTO *et al.*, 2007). Segundo Kanamoto *et al.*, (2007) em sua pesquisa, foi relatado efeito inibidor da proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC's) por sobrenadantes filtrados de cultura de *Granulicatella elegans*, demonstrando atividade semelhante à atividade de arginina deaminase (ADI), enzima responsável pela hidrólise de arginina em dois compostos, citrulina e amônia. Gong *et al.*, (1999) demonstrou que ADI de *Mycoplasma* induziu à apoptose diferentes células

neoplásicas humanas *in vitro* e exibiu potente efeito antineoplásico *in vivo*. O efeito antineoplásico da enzima provavelmente ocorre pela privação de arginina como fonte nutricional das células, visto que a restituição exógena de arginina restaura o crescimento celular (KOMADA *et al.*, 1997).

Em nossa pesquisa, o sobrenadante de cultivo bruto que inibiu a cepa de *S. aureus* que continha a *G. elegans*, não apresentou efeitos sobre células HUT-78 (células em suspensão estabelecidas e malignizadas) em relação a sua densidade, assim como efeito citopático. Para células CrFK (células aderentes estabelecidas) este sobrenadante se apresentou tóxico em cultivo, causando descolamento celular da monocamada. Porém, não se pode afirmar que o efeito citotóxico foi causado por metabólitos excretados por *G. elegans*, pois o sobrenadante de cultivo foi proveniente de bactérias cultivadas em conjunto (bruto), havendo a necessidade de estudos subsequentes, cultivar *G. elegans* isoladamente, analisando-se novamente o sobrenadante de cultivo desta bactéria em células CrFK para esclarecer a origem do efeito citopático.

Foram identificados também *Staphylococcus lentus*, de amostra de frutos de castanha-do-pará e *S. intermedius*, de amostra de solo com atividade antibacteriana. Estes são cocos catalase positivos e constituem parte da microbiota normal da pele de vários mamíferos, dentre estes, ruminantes, carnívoros e também de pássaros (LUZ, 2008). Não há relatos na literatura destes microorganismos como produtores de substâncias antibacterianas.

Os achados iniciais apontavam para a inexistência entre as amostras de solo, coletadas em diferentes áreas do estado do Amapá, de bactérias produtoras de substâncias com ação inibitória sobre bactérias patogênicas ao homem e animais. A estratégia utilizada, então, partia de microorganismos individualizados, cultivados isoladamente, que certamente influenciaram os resultados obtidos.

A utilização de sobrenadante do cultivo de solo, resultante da interação entre diferentes microorganismos, exibiu a presença de substâncias com atividade antibacteriana e, ao se utilizar estes sobrenadantes sem prévia filtração nos ensaios em busca de atividade, foi possível isolar as bactérias que cresceram nos extratos brutos ou sobrenadantes de cultivo, concluindo-se que dentre os inúmeros microorganismos cultivados das amostras de solo, apenas algumas bactérias foram capazes de crescer, provavelmente após produzirem substâncias que inibiram

outros microorganismos presentes nas amostras. Provavelmente a indução da resposta antimicrobiana só foi possível em presença de outros microorganismos, que competiam por nutrientes e microambiente para expandirem suas colônias

Neste estudo foram implementadas metodologias adicionais, como a utilização de perfurações no ágar de crescimento dos microorganismos, em que se adicionava os sobrenadantes de cultivo de solo. A difusão da(s) substância(s) no ágar fornece informações sobre a natureza química das moléculas constituintes, possivelmente peptídeos de baixo peso molecular e relativamente iônico. Além disso, a confirmação da atividade antimicrobiana em ágar nutriente utilizando-se ensaios em placas de poliestireno, em que se permite avaliar a densidade ótica determinada pela turbidez no meio de cultivo por maior ou menor proliferação das bactérias alvo frente as moléculas inibitórias dos sobrenadantes de cultivos de microorganismos de solo e de frutos e sementes de castanha-do-pará. Para esta última metodologia citada não se encontrou relatos na literatura.

A utilização de microorganismos isolados de frutos e sementes de castanha-do-pará, *Bertolletia excelsa*, em busca de bactérias produtoras de antimicrobianos, tem implicações tanto na proteção destas sementes, assim como aproveitamento dos resíduos de frutos e sementes desta espécie como substratos ricos em nutrientes para isolamento e cultivo dos organismos de interesse biotecnológico (MARTINS JÚNIOR. *et al.*, 2011).

Além das bactérias de solo e de frutos e sementes da castanha-do-pará, buscou-se atividade antimicrobiana entre plantas amazônicas medicinais, das quais anteriormente já se tinha conhecimento de atividade antimicrobiana.

Em relação aos extratos botânicos das plantas que exibiram atividade inibitória (contra as cepas bacterianas ATCC) encontradas neste estudo, há poucos relatos na literatura. As plantas foram: *Vatairea guianensis* e *Symphonia globulifera* ativas contra a cepa de *S. aureus* e extrato de *Hymenelobium petraeum* inibindo tanto *Staphylococcus aureus* como *Enterococcus faecalis*.

Resultados similares foram encontrados em estudo realizado por Araújo (2010). Neste, os extratos etanólicos de *V. guianensis* (conhecida como faveira) e *S. globulifera* (anani) demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com mucosite oral, sendo que o extrato de *S. globulifera* teve destaque por ter apresentado elevada eficiência e eficácia na

inibição (além de *Staphylococcus aureus*) de todas as espécies de bactérias do gênero *Streptococcus* e fungos do gênero *Candida* testados no mesmo estudo.

Para *Hymenelobium petraeum* (angelim-pedra), também não foram encontrados trabalhos referentes às suas propriedades antimicrobianas. O estudo realizado por Oliveira *et al.*, (2010) voltou-se para os aspectos morfológicos de seus frutos, sementes e plântulas, além do aspecto germinativo das sementes, que são importantes para o entendimento do processo reprodutivo dos vegetais, principalmente no que se refere aos estágios iniciais de desenvolvimento, desta forma sendo essencial para a compreensão do processo de estabelecimento da planta em condições naturais da floresta (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos utilizados para terapia, tanto em humanos como em animais, desde as décadas iniciais da utilização destes instiga a prospecção de novas substâncias com propriedades antimicrobianas. Para os extratos botânicos que apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* utilizados neste estudo, poucos trabalhos são relatados. Em relação às bactérias ambientais obtidas de frutos e sementes de *Bertolletia excelsa*, assim como as obtidas dos solos de diferentes áreas do estado do Amapá (floresta Amazônica e de transição Amazônico-guianense) que se apresentaram produtoras de determinada substância ativa contra outras bactérias, dentre estas, a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, estudos mais detalhados são necessários para elucidar a natureza das moléculas. Embora nem todas as bactérias identificadas sejam reconhecidamente produtoras de substâncias com propriedades antimicrobianas, o conhecimento da microbiota residente de frutos/sementes de castanha-do-pará é indispensável em relação a segurança no consumo destes e importante do ponto de vista econômico, visto que é produto de exportação. A correlação entre as bactérias isoladas do solo e as propriedades físico-químicas destes solos poderão ser de bastante utilidade para indicação de cultivos vegetais, no entanto, o objetivo principal neste estudo, foi a busca de bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas. Estudos futuros,

embora que demandem altos investimentos, principalmente levando em conta a utilização da metagenômica, poderão fornecer o perfil de fertilidade do solo decorrente da microbiota residente. Dessa forma, detectamos bactérias do solo amazônico e de frutos e sementes de castanha-do-pará exibindo atividade frente a patógenos de interesse humano e animal, abrindo novos horizontes para a exploração biotecnológica, com amplas possibilidades, tal como a manipulação destas moléculas em sua estrutura química com vistas a potencializar sua ação antimicrobiana.

7 REFERÊNCIAS

AHMED, A.M., SHIMABUKURO, H., SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and Salmonella from retail chicken meat in Japan. **J. Food Sci.**, v.74(7), p. 405–410, 2009.

ALCAMO, I. E. Fundamentals of Microbiology, 4^a ed. Editora Benjamin Cummings, p.695, 1994.

ARAÚJO, N.R.R. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microorganismos relacionados a lesão de mucosite oral. Belém: Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 2010, 87 p. Dissertação de mestrado.

ARMSTRONG, S., YATES, S.P.; MERILL, A.R. Insight into the catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. **J. Biol. Chem.**, v.277(48), p. 46669–46675, 2002.

BAGI, M.,MAZZULLI, T., Oligella infections: Case report and review of the literature. **Can. J. Infect. Dis.** v.7(6), p.377–379, 1996.

BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **Int. J. Food Microbiol.**,v. 61 (1), p. 1–10, 2000.

BANDI, A. K. R., LEE, D.U., TIH, R. G., GUNASEKAR, D., BODO, B. Phytochemical and Biological Studies of *Ochna* Species. **Chem. Biodivers.**, v. 9(2), p. 251–271, 2012.

BEATTIE, B.K., MERRILL, A.R. A Fluorescence Investigation of the Active Site of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. **J. Biol. Chem.**, v.274(22), p. 15646–15654, 1999.

BIAVASCO, F., FOGLIA, G., PAOLETTI, C., ZANDRI, G., MAGI, G., GUAGLIANONE, E., SUNDSFJORD, A., PRUZZO, C., DONELLI, G., FACINELI, B. VanA-Type Enterococci from humans, animals and food: species, distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73(10), p. 3307–3319, 2007.

BIZANI, D., MOTTA, A.S., MORRISSY, TERRA, R.M.S., SOUTO, A.A., BRANDELLI, A. Antibacterial activity of carein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **Int. Microbiol.** v.

BOROWSKY, L.M., BESSA, M.C., CARDOSO, M.I., AVANCINI, C.A.M. Sensibilidade e resistência de *Salmonella typhimurium* isolados de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternários de amônio e iodofo. **Cien. Rural**, v.36(5), p.1474–1479, 2006.

BOUKHORS, K., PRADEL N., GIRARDEAU, J.P., LIVRELLI, V., OU SAÏD, A.M., CONTREPOIS, M., MARTIN, C. Effect of diet on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) growth and survival in rumen and abomasum fluids. **Vet. Res.**, v..33(4), p.405–412, 2002.

BRADEN, C.R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. **Clin Infect. Dis.**, v.43(4), p.512–517, 2006.

BURVENICH, C., VAN MERRIS, V., MEHRZAD, J., DIEZ-FRAILE, A., DUCHATEAU, L. Severity of *Escherichia coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Vet. Res.**, v.34(5), p.521–564., 2003.

CALDWELL, D.R., Microbial Physiology & Metabolism, Ed. WCB, p.266, 1995.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (2011). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing (STEC) *Escherichia coli*. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/ecoli_o157h7/. Acesso em: 10 set. 2011.

CHALLIS, G.L., HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **PNAS**, v. 100(2), p.1455 – 14561, 2003.

CHEN, G., ZHU H., ZHANG Y. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. **Res. Microbiol.**, v.154(6): p.393–398, 2003.

CHENG, A.X., LOU, Y.G., MAO, Y.B., LU, S., WANG, L.J., CHEN, X.Y. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **J. Integ. Plant Biol.**, v.49(2), p.179 – 186, 2007.

CORBIA, A.C.G., NASCIMENTO, M.G.F., OLIVEIRA, C.Z.F., NASCIMENTO, E.R. *Staphylococcus aureus*: importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos. **Seropédica**, v.114, 15p., 2000.

CORREIA, A. F; SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; OLIVEIRA, L. O.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C. T.; KANZAKI, L. I. B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.**, v. 12, p. 369–380, 2008.

COSTA, E.O., LEITE, D.S., LANGONI, H., GARINO, F.J., VICTÓRIA, C., LISTONI F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58(5), p. 724–731, 2006.

COSTA, V.M.D., GRIFFITHS, E., WRIGHT, G.D. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.10(5), p. 481 –489, 2007.

CUNHA, A.Z., CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente em Revista**, v.2(1), 105–114, 2007.

CURSINO, L., ŠMARDA, J., SOUZA, E.C., NASCIMENTO, A.M.A. Recent updates aspects of colicins of Enterobacteriaceae. **Braz. J. Microbiol.**, v.33(3), 185–195, 2002.

DA MATA, E.C.G. Avaliação de Atividade Antiretroviral de Plantas Amazônicas Utilizando Como Modelo o Vírus da Imunodeficiência Símia. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 90 p. Dissertação de Mestrado.

DEL PAPA, M.F., HANCOCK, L.E., THOMAS, V.C., PEREGO, M. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. **J. Bacteriol.**, v.189(24), p. 8835 – 8843, 2007.

DONABEDIAN, S.M., PERRI, M.B., ABDUJAMILOVA, N., GORDONCILLO, M.J., NAQVI, A., REYES, K.C., ZERVOS, M.J., BARTLETT, P. Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Swine in Three Michigan Counties **J. Clin. Microbiol.**, v.48(11), p.4156–4161, 2010.

DZIDIC, S., BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 24(6), p. 519–526, 2003.

FERNANDES, M.C., RIBEIRO, M.G., SIQUEIRA, A.K., SALERNO, T., LARA, G.H.B., LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61(3), p.745–748, 2009.

FONTOURA, R. Purificação parcial e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Porto Alegre: Instituto de Ciências básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008, 125p. Dissertação de Mestrado.

FRANSSON, B.A., RAGLE, C.A. Canine piometra: an update on pathogenesis and treatment. **Vet. Learn**, v.25(8), p. 602–612, 2003.

FURUMURA, M., T., CARBONELL, G. V., LEMES-MARQUES, E. G., DARINI, A. L. C., YANO, T. Características de hemolisina termo-estável produzida por

Enterococcus faecalis provenientes de infecção hospitalar. IN: Congresso Brasileiro de Microbiologia, XXI, Foz do Iguaçu, Brasil, Outubro, 2001.p.113, MH-226.

GANTOIS, I., DUCATELLE, R., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F., GAST, R., HUMPHREY, T.J., IMMERSEEL, F.V. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.33(4), p.718–738, 2009.

GOMES, N.M., REZENDE, C.M., FONTES, S.P., MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of amazonian copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109(3), p. 486–92, 2007.

GONÇALVES, M. C. A. Efeitos da Antropização sobre a Estrutura Físico-Química do Solo de Ecossistema de Floresta de Várzea em Macapá – Amapá. Rio de Janeiro: Curso de Especialização em Perícia Ambiental, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009. Trabalho de conclusão de curso.

GONG, H., ZOLZER, F., RECKLINGHAUSEN, G.V., ROSSLER, J., BREIT, S., HAVERS, W. Arginine deiminase inhibits cell proliferation by arresting cell cycle and inducing apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.261(1), p.10–4, 1999.

GRAETZ, H. A. Suelos y Fertilización. Ed. Trillas, 80 p., 1983.

GUASTALLI, E.A.L., GAMA, N.M.S.Q., BUIM, M.R., OLIVEIRA, R.A., FERREIRA, A.J.P. , LEITE, D.S. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arq. Inst. Biol.**, v.77(1), p.153–157, 2010.

GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Anim. Health Res. Rev.**, v.9(2), p. 149–158, 2008.

HAMAKI, T., SUZUKI, M., FUDOU, R., JOJIMA, Y., KAJIURA, T., TABUCHI, A., SEM, K., SHIBAI, H. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. **J. Biosci. Bioeng.** v.99(5), p. 485–492, 2005.

HOELZER, K., SWITT, A.I.M., WIEDMANN, M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Vet. Res.**, v.42(34), p. 1–28, 2011.

HÖRNER, R., LISCANO, M.G.H., MARASCHIN, M.M., SALLA, A., MENEGHETTI, B., FORNO, N.L.F.D., RIGHI, R.A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**,v.41(6), p.391–395, 2005.

HUSSEIN, H.S. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of beef cattle and their products. **J. An. Scien.**,v.8,p. 62–73., 2011.

KANAMOTO, T., SATO, S., NAKASHIMA, H., INOUE, M. Proliferation of mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells is inhibited by extracellular arginine deiminase of *Granulicatella elegans* isolated from the human mouth. **J. Infect. Chemoter.**, v.13, p.353–355, 2007.

KELLER, N.P, TURNER, G., BENNET, J.W. Fungal secondary metabolism – From biochemistry to genomics. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, p.937–947, 2005.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agric. Agroec. Envir.**, v.74(1-3), p.65 – 76, 1999.

KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C., WEESE, J.S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Vet. Microbiol.**,v.128, p. 298–303, 2008.

KICK, J.D. Desenvolvimento de um teste de ELISA-LPS para *Salmonella* e sua aplicação em rebanhos suínos na identificação de fatores de riscos associados à infecção. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004, 114 p. Dissertação de doutorado.

KOMADA, Y., ZHANG, X.L., ZHOU, Y.W., IDO, M., AZUMA, E. Apoptotic cell death of human T lymphoblastoid cells induced by arginine deiminase. **Int. J. Hematol.**, v. 65(2), p. 129–41, 1997.

KRAKAUER, T. Immune response to staphylococcal superantigens. **Immunol. Res.**, v.20(2), p.163–73, 1999.

LEE, K.E., PANKHURST, C.E. Soil organisms and sustainable productivity. **Aust. J. Soil Res.**, v.30(6), p. 855–892, 1992.

LEVY, S.B., MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: cause, challenges and responses. **Nat. Med.**, v. 10(12), p.122–129, 2004.

LOOVEREN, M.V., GOOSSENS, H., ARPAC STEERING GROUP. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10(8), 684–704, 2004.

LUZ, I.S. Caracterização molecular das toxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco. Recife: Centro de Pesquisa Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008, 125p. Dissertação de Mestrado.

MAJEED, H., GILLOR, O., KERR, B., RILEY, M.A. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. **The ISME J.**, v.5, p.71–81, 2011.

MARTINS JÚNIOR, P.O., SOUSA, V.Y.K., CORREIA, A.F., MATA, E.C.G., KANZAKI, L. I. B. Fontes de contaminação microbiana da castanha-do-pará. **Amazônia** (Banco da Amazônia) v. 6, p. 21–30, 2011.

MASSINI, K.C. Bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos em DNA metagenômico de solo de mata atlântica. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2009, 114 p. Dissertação de Doutorado.

MICHAELSEN, R., CARDOSO, F.M., SCHNEIDER, R.N., MELLO, F.A., ESTEVES, R.M.G., VILANOVA M.S., SCHMIDT, V. *Salmonella* Typhimurium em linfonodos mesentéricos de ovinos ao abate. **Arq. Inst. Biol.**, v.78(1), p. 97–102, 2011.

MÖLLER, M., SUSCHKE, U., NOLKEMPER, S., SCHNEELE, J., DISTL, M., SPORER, F., REICHLING, J., WINK, M. Antibacterial, antiviral, antiproliferative and apoptosis-inducing properties of *Brackenridgea zanguebarica* (Ochnaceae). **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58(8), p. 1131–1138, 2006.

NORMARK, B.H., NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **J. Intern. Med.**, v. 252(2), p. 91–106, 2002.

NWOSU, V.C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. **Res. Microbiol.**, v.152(5), p. 421–430, 2001.

OLIVEIRA, L.Z., CESARINO, F., PANTOJA, T.F., MÔRO, F.V., Aspectos morfológicos de frutos, sementes, germinação e plântulas de *Hymenolobium petraeum*. **Cienc. Rural**, v.40(8), p.1732–1740, 2010.

PALMA, C.C., FONSECA, A.L.A., CAPUTTO, L.Z., AZZALIS, L.A., SILVA, E.F., FONSECA, F.L.A. A importância da prevenção de *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes portadores de fibrose cística. **News Lab.**, v.104, p. 110–114, 2011.

PARADELLA, T.C., KOGA-ITO, C.Y., JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Rev. Od. UNESP**, v.36(2), p. 163–168, 2007.

PATHEMA – Bioinformatics Resource Center (2006). *Burkholderia pseudomallei*. Disponível em: http://pathema.icvi.org/pathema/b_pseudomallei.shtml. Acesso em 24 de maio de 2012.

PEGNYEMB, D.E., MBING, J.N., ATCHADE, A.T., TIH, R.G., SONDEGAM, B.L., BLOND, A., BODO, B. Antimicrobial biflavonóides de partes aéreas de *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry**, v.66(16), p.1922–1926, 2005.

PERRON, G.G., QUESSY, S., BELL, G. A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. **PLoS One**, v.3(11), p. 1–5, 2008.

PETTER, J.G. The chicken, the eggs and *Salmonella enteritidis*. **Environ. Microbiol.**, v.3(7), p. 421–430, 2001.

PIATTI, R.M., BALDASSI, L. Prevalência de *Escherichia coli* O78:K80 na microbiota de aves da região oeste do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, v.4 (4), p.357–359, 2007.

POOLE, K., & SRIKUMAR, R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.1, p. 59–71, 2001.

POTTER, C.S., MEYER, R.E. The role of soil biodiversity in sustainable dryland farming systems. **Adv. Soil Sci.**, v.13(60), p. 241–251, 1990.

PRIDMORE, D., REKHIF, N., PITTET, A.C., SURI, B., MOLLET, B. Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to laticin 481 of *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62(5), p.1799–1802, 1996.

PROPÍSIL, S., BENADA, O.,KOFRONOVÁ, Ó., PETRÍČEK, L., JANDA, L., HAVLÍČEK, V. Kytococcus sedentarius (formerly Micrococcus sedentarius) and Dermacoccus nishinomiyaensis (formerly Micrococcus nishinomiyaensis) produce monensins, typical Streptomyces cinnamonensis metabolites. **Can. J. Microbiol.** v.44(10), p.1007–1011, 1998.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA (2011). *Micrococcus*. Pathogen Safety Data Sheet – Infectious Substances. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>. Acesso em: 18 de maio de 2012.

RAPINI, L.S., TEXEIRA, J.P., MARTINS, N.E., CERQUEIRA, M.M.O.P., SOUZA, M.R., PENNA, C.R.F.M. Perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* sp. isoladas do queijo tipo qualho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56(1), p. 130–133, 2004.

RASOARIVELO, S. T. R., GROUGNET, R., VÉRITÉ, P., LECSÖ, M., BUTEL, M.J., TILLEQUIN, F., GUILLOU, C. R., DEGUIN, B. Chemical Composition and Antimicrobial activity of the essential oils of *Anthospermum emirnense* and *Anthospermum perrieri* (Rubiaceae). **Chem. Biodivers.**, v.8(1), p. 145–154, 2011.

RIBEIRO, M.G., COSTA, E.O., LEITE, D.S., LANGONI, H., GARINO JUNIOR, F., VICTÓRIA, C., LISTONI, F.J.P. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58(5), p. 724–731, 2006.

RIZK, M.A.J., MEILLER, T.F., JAMES, C.E., SHIRTLIFF, M.E. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and microbial susceptibility. **Antimicrob. Agents. Chemoter.**, v.50(4), p.1463–1469, 2006.

RIZZOTTI, L., GIOIA, F.L., DELLAGLIO, F., TORRIANI, S. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene *tet(M)* carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. **Antonie Van. Leeuwenhoec**, v.96(1), p.43 – 52, 2009.

ROZALSKI, A., SIDORCZYK, Z., KOTEŁKO, K. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.61(1), p.65–89, 1997.

SÁ, M.E.P., CUNHA, M.L.R.S., ELIAS, A.O., VICTÓRIA, C., LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Braz. J. Vet. Res. Ani. Scien.**,v.41, p. 320–326, 2004.

SAINDERBERG, A.B.S. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008, 76p. Dissertação de mestrado.

SANT`ANA, P.J.P. Bioprospecção no Brasil, Contribuições para um gestão ética. Brasília: Editora Paralelo, p.15, 2002.

SANTOS, A.L., SANTOS, D.O., FREITAS, C.C., FERREIRA, B.L.A., AFONSO, I.F., RODRIGUES C.R., CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.43(6), p. 413–423, 2007.

SANTOS, A.O., NAKAMURA, T.N., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of brazilian copaíba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103(3), p. 277–281, 2008.

SANTOS, V.L., SOUZA, M.F.V., BATISTA, L.M., SILVA, B.A., LIMA, M.S., SOUZA, A.M.F., BARBOSA, F.C., CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13(1): p.68–72, 2011.

SCHWARZ, S., DANCLA, E.C. Use of antimicrobial in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Vet. Res.**, v.32, p.201–225, 2001.

SEAGHDHA, M.O., SCHOOTEN, C.J.V., KERRIGAN, S.W., EMSLEY, J., SILVERMAN, G.J. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. **FEBS J.**, v.273(21), p. 4831–4841, 2006.

SEGOVIA, J. F. O. Dimensão sistêmica, espacial e fisiológica do processo do desenvolvimento de base agrícola no Estado do Amapá. Amapá: NAEA, Universidade Federal do Pará, 2012, 96 p. Tese de Doutorado.

SHANKAR, V., BAGHDAYAN, A. S., GILMORE, M. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v.417 (6890), p.746–750, 2002.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos, 2ª ed., Editora Varela, p. 149–150, 2001.

SILVEIRA, G.P., NOME, F., GESSER, J.C., SÁ, M.M. Recent achievements to combat bacterial resistance. **Quim. Nova**, v.29(4), p. 844–855, 2006.

SIQUEIRA, A.K. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecções do trato urinário, piometra e fezes de cães. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2006, 120p. Dissertação de mestrado.

SORUM, H., SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. **Vet. Res.** v.32 (3-4), p. 227–241, 2001.

STARK, N.M., JORDAN, C.F. Nutrient retention by the root mat of an Amazonian rain forest. **Ecology**, v.59(3): 434–437. 1978.

SUTRA, L., POULTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v.40, p. 79–89, 1994.

THURLOW, L.R., THOMAS, V.C., NARAYANAN, S., OLSON, S., FLEMING, S.D., HANCOCK, L.E. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infect. Immun.**, v.78(11), p. 4936–4943, 2010.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. Microbiologia, 4ª ed., Editora Atheneu, p.257, 2004.

TSAI, C.Y., SU, S.H., CHENG, Y.H., CHOU, Y.L., TSAI, T.H., LIEU, A.S. Kocuria varians infection associated with brain abscess: A case report. **BMC Infect Dis.**, v.10, p.1–4, 2010.

TUCHSCHERR, L.P.N., BUZZOLA, F.R., ALVAREZ, L.P., CACCURI, L.R., LEE, J.C.; SORDELLI, D.O. Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. **Infect. Immun.**, v.73(12), p. 7932–7937, 2005.

VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L.. **Quím. Nova**, v.25(2), p. 273–286, 2002.

VIAL, L., GROLEAU, M.C., DEKIMPE, V., DÉZIEL, E. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17(9), 1407–1429, 2007.

VITAL, P.G., RIVERA, W.L. antimicrobial activity, cytotoxicity and phytochemical screening of *Voacanga globosa* (Blanco) Merr. Leaf extract (Apocynaceae). **Asian. Pac. J. trop. Med.**,v.4(10), 824–828, 2011.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v.406, p.775–781, 2000.

WEESE, J.S., DICK, H., WILLEY, B.M., MC GEER, A., KREISWIRTH, B.N., INNIS, B., LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Vet. Microbiol.**, v.115, p.148–155, 2006.

WENZEL, S.C., MULLER, R. Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: deviations from textbook biosynthetic logic. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.9, p. 447–458, 2005.

WERCKENTHIN, C., CARDOSO, M., MARTEL, J.L., SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Vet. Res.**,v.32(3–4), p.341–362, 2001.

WITTE, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.16(4), p.19–24, 2000.

YU, J.H., KELLER, N.P. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **An. Rev.**, v.43, p.437–458, 2005.

ZAVASCKI, A.P., GASPARETO P.B., MARTINS, A.F., GONÇALVES, A.L., BARTH, A.L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **J. Antimicrob. Chemoter.** v.56, p.1148–1151, 2005.

ZEE/AP – Macrodiagnóstico do Estado do Amapá: primeira aproximação do ZEE. Equipe técnica do ZEE- AP. 3 ed. rev. ampl., 138p. Macapá: IEPA, 2008. Disponível em: <http://www.iepa.ap.gov.br/arquivopdf/macrodiagnostico.pdf>. Acesso em: 14 de maio de 2008.

ZHANG, L., XU, Z. Assessing Bacterial diversity in soil. **J. Soil Sediments.**, v.8(6), p. 379–388, 2008.

