

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DO EXTRATO BRUTO DA FERMENTAÇÃO POR *Streptomyces viridosporus* T7A EM MEDICINA VETERINÁRIA

Luiz Rômulo Alberton
Luciana Porto Souza Vandenberghe
Mara Elisa Joineau
Lisiane Almeida Martins
José Ricardo Pachaly
Ricardo Assman
Elza Maria Galvão Ciffoni
Carlos Ricardo Soccol

ALBERTON¹, L.R.; VANDENBERGHE², L.P.S.; JOINEAU³, M.E.; MARTINS⁴, L.A.; PACHALY⁴, J.R.; ASSMAN², R.; CIFFONI^{2,4}, E.M.G.; SOCCOL², C.R. Avaliação do potencial de uso do extrato bruto da fermentação por *Streptomyces viridosporus* T7A em Medicina Veterinária. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.41-47, 2006

RESUMO: Desde a sua descoberta como produtoras de antibióticos, as bactérias do gênero *Streptomyces* têm sido muito estudadas, em função de seu grande interesse para a indústria. A maioria das cepas de *Streptomyces* sintetiza substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas, que têm empregos em medicina e agricultura, bem como em vários processos biotecnológicos. Neste trabalho estudou-se a aplicação do extrato bruto enzimático obtido da fermentação por *Streptomyces viridosporus* T7A para uso veterinário. O extrato bruto enzimático foi submetido a testes de atividade antimicrobiana e de inocuidade, em cultivo celular e em camundongos. Observou-se efeito inibidor sobre cepas patogênicas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), porém não sobre bactérias Gram negativas (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli*). Em cultivo celular, o extrato mostrou ausência de toxicidade e efeito citoprotetor, e em camundongos foi inócua, e teve influência positiva no peso final nos grupos tratados.

PALAVRAS-CHAVE: *Streptomyces*. Enzima. Compostos fenólicos. Antimicrobiano. Citotoxicidade.

EVALUATION OF THE POTENTIAL APPLICABILITY OF *Streptomyces viridosporus* T7A CRUDE FERMENTATION EXTRACT IN VETERINARY MEDICINE

ALBERTON, L.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; JOINEAU, M.E.; MARTINS, L.A.; PACHALY, J.R.; ASSMAN, R.; CIFFONI, E.M.G.; SOCCOL, C.R. Evaluation of the potential applicability of *Streptomyces viridosporus* T7A crude fermentation extract in Veterinary Medicine. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.41-47, 2006

ABSTRACT: Since discovered as antibiotics producers, *Streptomyces* genus bacteria had been studied to a great extent, because their great industrial interest. Most of the *Streptomyces* strains synthesize antibacterial, antifungal, antineoplastic, antiparasitic, and herbicide substances, as well as enzymes, which are used in medicine, agriculture and other biotechnological processes. We studied the potential applicability of *Streptomyces viridosporus* T7A crude fermentation extract in veterinary medicine. The antimicrobial properties of enzymatic crude extract were tested against pathogenic bacteria strains, and its innocuity was tested both in cellular cultives and mice. It was observed inhibitory effect against pathogenic Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*), but not against pathogenic Gram negative bacteria (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., and *Escherichia coli*). In cellular cultives, the extract showed citoprotector effect and absence of toxicity. In mice, it was innocuous and had positive influence on the final weight in the treated groups.

KEY WORDS: *Streptomyces*. Enzyme. Phenolic. Antimicrobial. Citotoxicity.

¹Médico Veterinário, Mestre, Doutor. Coordenador do Hospital Veterinário e Professor do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense - UNIPAR. Umuarama, PR, Brasil. E-mail: romulo@unipar.br

²Laboratório de Biotecnologia do Curso de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná - UFPR. Curitiba - PR.

³Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - CDME/SEAB. Curitiba - PR.

⁴Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense - UNIPAR. Umuarama - PR.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE USO DEL EXTRACTO BRUTO DE LA FERMENTACIÓN POR *Streptomyces viridosporus* T7A EN MEDICINA VETERINARIA

ALBERTON, L.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; JOINEAU, M.E.; MARTINS, L.A.; PACHALY, J.R.; ASSMAN, R.; CIFFONI, E.M.G.; SOCCOL, C.R. Evaluación del potencial de uso del extracto bruto de la fermentación por *Streptomyces viridosporus* T7A en Medicina Veterinaria. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.41-47, 2006

RESUMEN: Desde que fueran descubiertas como productoras de antibióticos, las bacterias del género *Streptomyces* vienen siendo muy estudiadas, por tener gran interés para la industria. La mayoría de las variedades de *Streptomyces* sintetiza sustancias antibacterianas, antifúngicas, antitumorales, antiparasitarias y herbicidas, así como enzimas que se usan en medicina, agricultura y otros procesos biotecnológicos. En este trabajo, se estudió el potencial de uso del extracto bruto de la fermentación por *Streptomyces viridosporus* T7A en medicina veterinaria. Las propiedades antimicrobianas del extracto bruto enzimático fueron testadas contra bacterias patogénicas, así como se testó su inocuidad tanto en cultivos celulares cuanto en ratones. Se observó efecto inhibitorio sobre bacterias patogénicas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), pero no sobre bacterias Gram negativas (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. y *Escherichia coli*). En cultivo celular, el extracto mostró ausencia de toxicidad y efecto citoprotector, y en ratones fue inocuo, y ha influenciado positivamente el peso final de los grupos tratados.

PALABRAS-CLAVE: *Streptomyces*. Enzima. Compuestos fenólicos. Antimicrobiano. Citotoxicidad.

Introdução

Streptomyces viridosporus T7A

O solo é um importante hábitat dos estreptomicetos, e a maioria dos solos contém 10^4 a 10^7 unidades formadoras de colônia desses microrganismos por grama, representando de 1,0 a 20,0% ou mais do total de células viáveis. Vegetações de gramíneas ou solos ricos em matéria orgânica contêm maiores números de estreptomicetos, que são também encontrados em altas concentrações no intestino de diversos invertebrados, e algumas cepas altamente celulolíticas podem ser caracterizadas do intestino de cupins. A maioria das espécies de *Streptomyces* cresce em pH neutro ou medianamente alcalino. No entanto, muitos relatos mostram que algumas cepas crescem em pH ácido (3,5) ou alcalino (8,0 a 11,5) (SCHREMPF, 1999).

Quanto à morfologia, as cepas de *Streptomyces* sp. formam hifas aéreas e no substrato, cadeias compridas de artrosporos sobre as hifas aéreas, e às vezes sobre o micélio do substrato. As cadeias de esporos exógenos se formam por fragmentação das hifas (THEILLEUX, 2000).

Desde a sua descoberta como produtoras de antibióticos, as bactérias do gênero *Streptomyces* têm sido muito estudadas, em função de seu grande interesse para a indústria. A maioria das cepas de *Streptomyces* sintetiza substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas, que têm empregos em medicina e agricultura, bem como em vários processos biotecnológicos (MUTH *et al.*, 1999).

Os antibióticos são produzidos por bactérias, actinomicetos e fungos, e segundo Sato (2001), das substâncias antimicrobianas conhecidas, os actinomicetos produzem 4.600, enquanto fungos produzem 1.600, e outras bactérias produzem apenas 950. Somente 10 dos antibióticos fúngicos conhecidos são produzidos comercialmente, e somente penicilinas, cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico têm importância clínica. A maior variedade em estrutura e número de antibióticos é encontrada nas substâncias produzidas por actinomicetos, especialmente

os do gênero *Streptomyces*. Os *Streptomyces* sp. sintetizam várias substâncias usadas em medicina humana e veterinária, tais como tetraciclina, estreptomicina, avermectinas, ionóforos (monensina, salinomina), com efeitos sobre bactérias e endo e ectoparasitos. Outro importante grupo de substâncias são os antibióticos peptídicos, produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*. (SATO, 2001).

Revisão de Literatura

A lignina é um polímero complexo que consiste de unidades de fenilpropano interconectadas por uma variedade de ligações carbono-carbono e ligações éter. As gramíneas são ricas em material ligno-celulósico e, na natureza, a lignina está fisicamente incrustada à celulose, e é resistente à degradação por muitos microrganismos (CRAWFORD *et al.*, 1983).

Crawford (1978) foi o primeiro a comprovar a decomposição da lignina por cepas de *Streptomyces*. A degradação da lignina por estas bactérias inclui a oxidação dos anéis aromáticos e da cadeia lateral de propano a gás carbônico (CRAWFORD *et al.*, 1983).

Streptomyces viridosporus T7A (ATCC 39115) despolimeriza a lignina enquanto degrada a celulose e, como o principal produto da degradação da lignina, produz lignina polimérica ácido-precipitável (APPL), solúvel em água (RAMACHANDRA *et al.*, 1987).

APPLs são polifenólicos e podem ser obtidos em alta concentração a partir de resíduos lignocelulósicos, tendo considerável potencial para uso industrial. Algumas das principais aplicações industriais incluem seu uso como surfactantes, na produção de poliuretano ou precursor adesivo. Os dados disponíveis mostram que material lignocelulósico de gramíneas produz mais APPLs que outras fontes. A produção de APPL parece estar correlacionada à biodegradabilidade da lignocelulose utilizada (CRAWFORD *et al.*, 1983).

Nos estudos de Antai & Crawford (1981) sobre os efeitos da fermentação pelo *S. viridosporus* T7A em substrato lignocelulósico de gramíneas, os resultados apontaram que,

após três meses de fermentação, houve degradação de 68% e 44% do carboidrato e lignina respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Crawford *et al.* (1983), estudando o *S. viridosporus* T7A, em fermentação no estado sólido, usando material lignocelulósico de milho, sendo que após oito semanas de incubação, houve degradação de 36,2% do material. Deste, o conteúdo em carboidrato e lignina foi reduzido em 44,4 e 19,7% respectivamente.

Pomato III & Crawford (1986) verificaram que a cepa de *S. viridosporus* T7A decompõe melhor o material em meio alcalino, atingindo a máxima degradação da lignina na faixa de pH entre 8,4 a 8,8.

ADHI *et al.* (1989), estudando a produção de enzimas por *S. viridosporus* e *S. badius*, em cultivo submerso, verificou que há uma interação entre as enzimas chave, que atuam sinergicamente na degradação do substrato lignocelulósico, pois lignina-peroxidase (0,11 U/mL), endoglucanase (0,1 U/mL) e xilanase (0,3 U/mL) alcançaram a máxima atividade simultaneamente após quatro dias de fermentação.

Propriedades dos Polifenóis

Os polifenóis são uma grande e diversa classe de compostos, muitos dos quais ocorrem naturalmente em muitos alimentos vegetais. O grupo dos flavonóides é maior e melhor estudado. Esses compostos possuem importantes propriedades antioxidantes, anti-mutagênicas, anti-estrogênicas, anti-neoplásicas e anti-inflamatórias, efeitos que podem ser potencialmente benéficos na prevenção de doenças e proteção da estabilidade genômica (FERGUSON, 2001).

A hidrólise da hemicelulose das plantas é limitada pela esterificação da hemicelulose para compostos fenólicos, tais como ácido ferúlico. Garcia *et al.* (1997) estudaram a relação da atividade da xilanase com a esterase de ácido ferúlico em *Streptomyces avermitilis*, detectando maior atividade desta enzima na presença de altos níveis de xilanase.

Os ácidos diferúlicos são abundantes componentes estruturais das paredes celulares das plantas, especialmente de cereais, e potentes antioxidantes. Contudo, esses compostos fenólicos estão ligados aos polissacarídeos da parede celular por ligações éster, forma em que não podem ser absorvidos no intestino (ANDREASEN, 2001).

Em substrato lignocelulósico, a cepa *Streptomyces viridosporus* T7A é capaz de produzir compostos fenólicos derivados da lignina, tais como ácido cumárico e ferúlico (RAMACHANDRA *et al.*, 1987). Esses compostos fenólicos têm grande importância biotecnológica para produção de antioxidantes industriais (CRAWFORD, 1984), e também para uso médico, combatendo a radicais livres e protegendo assim as células de lipoperoxidação, envelhecimento e doenças degenerativas (FERGUSON, 2001).

Cultivo de Células Animais para Testes de Toxicidade

O cultivo de células foi iniciado por Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912, como um método para estudar o comportamento das células animais livres frente às variações sistêmicas que podem ocorrer em estados homeostáticos ou de estresse (FRESHNEY, 1994). Para o cultivo de células animais, é preciso manter a temperatura a 37°C em meio com pH 7,0-7,2. A natureza dos subprodutos do metabolismo

celular tende a converter o pH do meio para a acidez, portanto deve-se usar um tampão. O mais utilizado é um sistema bicarbonato/CO₂ que requer aporte de CO₂ na estufa e bicarbonato no meio de cultivo. Usa-se comumente o meio de cultivo basal de Eagle (BME), que contém sais minerais, aminoácidos, vitaminas e glicose (MORGAN & DARLING, 1993).

Testes de toxicidade com animais são freqüentemente utilizados na investigação dos efeitos da contaminação do meio ambiente. Alguns testes são limitados pelo número de animais que podem ser econômica e convenientemente estudados, por problemas em obter animais de linhagens puras e em perfeito estado fisiológico, e dificuldade de extrapolar resultados de uma espécie para outra. Um método utilizado para superar essas dificuldades é a utilização do cultivo de células, que permite a análise de grande quantidade de amostras e determina com maior especificidade a atividade do agente tóxico (KOCAN *et al.*, *apud* SALVO *et al.*, 1999).

A citotoxicidade é um complexo evento *in vivo*, e pode ser manifestada por amplo espectro de efeitos, como a morte celular ou diversos eventos tóxicos causados por drogas anti-neoplásicas, tanto em células tumorais quanto em células normais de medula óssea, pele ou intestino. A definição de citotoxicidade é variável, e dependendo da natureza do estudo, as células podem morrer, ou simplesmente sofrer alterações metabólicas. Não é possível definir todas as necessidades dos ensaios de citotoxicidade, sendo então o estudo centrado nos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular. No entanto, muitas substâncias não tóxicas se tornam tóxicas após o metabolismo hepático. Da mesma forma, muitas substâncias que são tóxicas *in vitro* podem ser detoxificadas pelas enzimas hepáticas (FRESHNEY, 1994).

Material e Métodos

A cepa utilizada para o desenvolvimento deste trabalho, *Streptomyces viridosporus* T7A (ATCC 39115), foi adquirida na *American Type Culture Collection*, sendo mantida em tubos de ensaio contendo ágar Y/M (*yeast extract malt agar*), a 4,0°C. Antes do início da fermentação a cepa foi repicada em frascos *Erlenmeyer* contendo milho (planta integral).

O extrato bruto enzimático foi obtido por fermentação submersa (FES) conduzida em frascos *Erlenmeyer*, utilizando o seguinte substrato: bagaço de cana (70%), capim Napier (20%) e farelo de soja (10%).

Atividade Antimicrobiana

Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana

O extrato enzimático testado foi obtido por fermentação no estado sólido, e o pH do extrato bruto enzimático foi neutralizado com HCl 0,1M.

Para o experimento foram utilizadas cepas de bactérias Gram negativas causadoras de intoxicação alimentar em humanos (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli*), e cepas de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus* sp.) causadoras de mastite contagiosa em

bovinos e intoxicação alimentar em humanos.

Após serem repicadas em ágar sangue, as bactérias foram diluídas em solução salina, seguindo o padrão da escala de *Mc Farland* (1×10^9 células/mL). Com um *swab*, as cepas foram semeadas sobre toda a superfície do ágar contendo meio de Mueller-Hinton. O produto da fermentação foi colocado em orifícios de 0,5 cm feitos no ágar. Ao mesmo tempo, discos comerciais com antimicrobianos, usados para avaliação de antibiograma (doxiciclina, cefalosporina, gentamicina, sulfa, norfloxacin e penicilina) foram colocados na mesma placa, para estudo comparativo.

As placas foram incubadas por um período de 12 a 24 horas, para avaliação do halo de inibição sobre o crescimento bacteriano.

Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana

Para este estudo foi utilizada uma cepa de *S. aureus* em suspensão bacteriana a 1×10^9 UFC/mL. As placas para avaliar o efeito inibitório foram preenchidas com agar-manitol, e o extrato bruto enzimático foi obtido pela fermentação por *S. viridosporus*, nas seguintes proporções: 21,6 g de meio manitol, 200 mL de água destilada e 0,216 g de extrato bruto enzimático seco. Preparou-se um controle contendo as mesmas proporções de meio, porém sem o extrato bruto enzimático. As placas, com diâmetro de 9,0 cm, foram semeadas com 100 μ L do inóculo de *S. aureus*, nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . A contagem de colônias foi feita após 24 horas de incubação em estufa, a 37^o C.

Testes de inocuidade em cultivo celular

Os testes de citotoxicidade foram feitos para avaliar se o extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A poderia apresentar efeitos tóxicos indesejáveis, já que o objetivo é aplicá-lo em dietas para animais. Para realizar este estudo, testou-se o extrato bruto enzimático em três tipos de células: MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney* – ATCC-CCL-22); PK15 (*Porcine Kidney* – 15-ATCC-CCL-33) e células VERO (*Cercopithecus aethiops*, Monkey, African Green – ATCC-CCL-81).

As células foram mantidas em meio F10+ 199 (Sigma®), enriquecido com soro fetal bovino. A esta solução foi adicionada uma combinação de antibióticos (1,25 μ g/mL de anfotericina B, 200 μ g/mL de sulfato de estreptomicina e 10 μ g/mL de enrofloxacin) e uma solução contendo o extrato bruto enzimático, em quantidade que variou em função da diluição testada.

O cultivo celular foi lavado com solução salina (PBS), e em seguida com solução de tripsina a 0,02%, para suspender o cultivo celular. Depois disso, com o meio F10+199 (Sigma®), as células foram colocadas em microplaca de poliestireno para cultivo celular, composta por 96 poços. Em cada poço foram colocados 100 μ L do meio, contendo 15 a 30×10^3 células. O cultivo foi mantido em estufa por 30 dias, a 37^oC, com 5% de CO₂ e umidade relativa maior que 80%. Nessas condições, foram avaliadas uma vez ao dia, sob microscopia óptica, alterações da morfologia celular, viabilidade celular, estado da monocamada, longevidade celular e morte celular.

Testes de inocuidade em camundongos

Para este teste foram utilizados 60 camundongos machos, da mesma idade e com peso uniforme, divididos em três lotes com 10 animais cada, com uma repetição. Os animais foram mantidos por 30 dias em uma mesma sala e em condições ambientais similares, alojados em gaiolas especiais, com cama de maravalha, ração especial para camundongos e água. Todos foram tatuados na cauda, e pesados individualmente a cada sete dias. Os lotes foram distribuídos da seguinte forma:

Lote 1 - controle (não recebeu extrato bruto de fermentação sólida);

Lote 2 - recebeu extrato bruto de fermentação sólida a 1/ 100, na água de bebida;

Lote 3 - recebeu extrato de bruto fermentação sólida a 1/1000, na água de bebida.

Para análise estatística dos efeitos do extrato bruto enzimático na dieta dos camundongos, foi utilizado o teste de Bonferroni.

Resultados e Discussão

Atividade antimicrobiana do extrato bruto enzimático

O extrato enzimático obtido da fermentação por *S. viridosporus* T7A não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram negativas (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp.e *Escherichia coli*). No entanto, o produto promoveu um halo de inibição nas culturas de *Staphylococcus aureus*, tanto as causadoras de intoxicação alimentar quanto de mastite. Apesar do halo de inibição ter sido modesto, acredita-se que utilizando um processo de separação ou de purificação, os resultados possam ser mais consistentes. O efeito do extrato bruto enzimático sobre o crescimento de *S. aureus* está apresentado na Figura 1, e após o período de incubação dos meios contendo o extrato bruto enzimático, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 1.



Figura 1 - Halo de inibição do crescimento de cultura de *Staphylococcus aureus*, pela ação do extrato bruto enzimático obtido a partir de fermentação por *Streptomyces viridosporus* T7A

Tabela 1 - Resultados da inibição do crescimento de cultura de *Staphylococcus aureus* em ágar manitol, pela ação do extrato bruto enzimático obtido a partir de fermentação por *Streptomyces viridosporus* T7A

Diluição	Controle	Meio Manitol + Extrato bruto enzimático	Diferença
Sem diluição	0,9 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁵	10 ⁴
10 ⁻¹	1,1 x 10 ⁸	1,05 x 10 ⁴	10 ⁴
10 ⁻²	1,2 x 10 ⁷	1,08 x 10 ³	10 ⁴
10 ⁻³	1,04 x 10 ⁶	1,3 x 10 ²	10 ⁴
10 ⁻⁴	0,9 x 10 ⁵	10 ¹	10 ⁴

Conforme os resultados obtidos neste estudo, observou-se que o extrato bruto enzimático obtido a partir de fermentação por *Streptomyces viridosporus* T7A, quando adicionado ao meio manitol, inibiu o crescimento do *S. aureus*. Em todas as diluições a diferença entre os valores obtidos nas placas contendo extrato e controle foram de menos quatro ciclos logarítmicos.

Sugere-se que a atividade antimicrobiana possa ser determinada por algum metabólito secundário excretado pelo *S. viridosporus* T7A, durante o processo fermentativo. Tal fato não foi relatado na literatura. Também pode se sugerir que os compostos polifenólicos provenientes da degradação da cadeia da lignina, exercida pelo microrganismo, possam ter efeitos antimicrobianos. Quanto ao espectro de inibição, é necessário verificar se a substância inibe somente o

crescimento de bactérias Gram positivas, ou se é preciso uma quantidade maior para que haja também a inibição do crescimento das bactérias Gram negativas.

Sugere-se que estudos de separação e purificação sejam feitos para caracterizar a substância antimicrobiana liberada durante o processo fermentativo do *S. viridosporus* T7A, em meio sólido.

Testes de inocuidade em cultivo celular

Durante 30 dias, o desenvolvimento celular foi acompanhado diariamente, sob microscopia óptica, avaliando-se integridade da monocamada, viabilidade celular (conformação e coloração), morte celular e longevidade. Os resultados deste estudo estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudo da influência do extrato bruto enzimático obtido a partir de fermentação sólida por *Streptomyces viridosporus* T7A, em cultivo celular

Diluição	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2.560	1:5120	Controle
MDBK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
PK-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
VERO	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-
CONT.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MDBK: *Madin Darby Bovine Kidney*

PK-15: *Porcine Kidney*

VERO: *Cercopithecus aethiops*, *Monkey*, *African Green*

* Viabilidade celular superior ao grupo controle, maior longevidade, monocamada confluenta - ausência de toxicidade.

Na presença do extrato bruto enzimático as células apresentaram crescimento e longevidade superiores às células de controle. A Figura 2 ilustra a imagem microscópica do cultivo celular com linhagem PK-15, observando-se que as células tratadas com extrato bruto enzimático em diluições de 1:2.560 mantiveram estas características por mais tempo, cerca de 20 dias a mais (o dobro) que as células não tratadas (controle).

O extrato bruto enzimático não apresentou toxicidade para as linhagens de células testadas. Ao contrário, nas diluições de 1:2.560, para as linhagens MDBK e PK-15, observou-se maior crescimento e maior longevidade. O mesmo efeito foi verificado em cultivo de células VERO, na diluição de 1:160.

Após 30 dias, nos cultivos celulares onde o extrato bruto enzimático estava presente, as células apresentavam viabilidade, com monocamada confluenta e sem deslocamento. Nos cultivos controle, ao 20º dia, todas as células já estavam mortas.

Esses resultados sugerem que o extrato bruto enzimático obtido por fermentação sólida tenha propriedades citoprotetoras. Acredita-se que isso se deva aos compostos fenólicos presentes no extrato bruto enzimático, liberados durante a fermentação (ácidos cumárico e ferúlico) (RAMACHANDRA, 1997), que possuem atividades antioxidantes, bloqueando os radicais livres e protegendo as células da lipoperoxidação e do envelhecimento (FERGUSON, 2001; ANDREASEN *et al.*, 2001). Embora, esta afirmação seja prematura, sugere-se que estudos mais aprofundados sejam feitos para elucidar e validar o efeito citoprotetor do extrato bruto enzimático obtido pela fermentação por *S. viridosporus* T7A. A morte celular e o descolamento da monocamada estão ilustrados na Figura 3, onde se observa que as células que não receberam o extrato bruto enzimático obtido pela fermentação por *Streptomyces viridosporus*, o descolamento evento ocorreu mais cedo, entre o 7º e 10º dias, e a morte de todas as células no 20º dia. No entanto para as células em presença do extrato bruto

enzimático (em diluição de 1:2.560) este evento iniciou somente a partir do 30º dia.

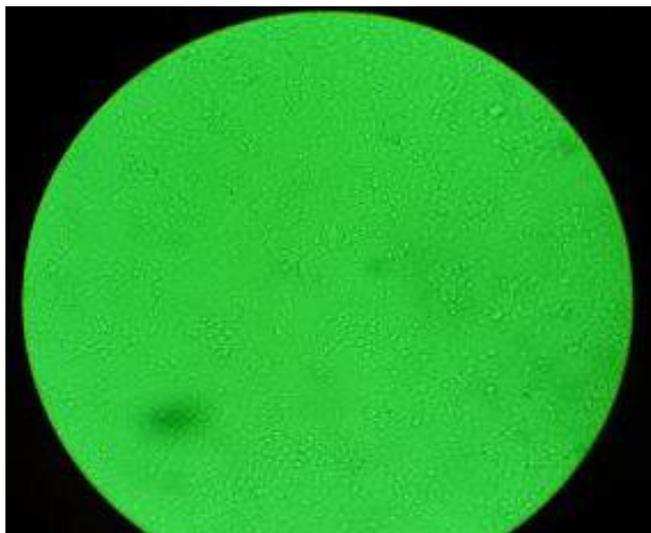


Figura 2 - Imagem, sob microscopia óptica (200x), de cultivo de células PK-15 tratadas com extrato bruto enzimático, com quatro dias de incubação, revelando monocamada confluenta e intacta

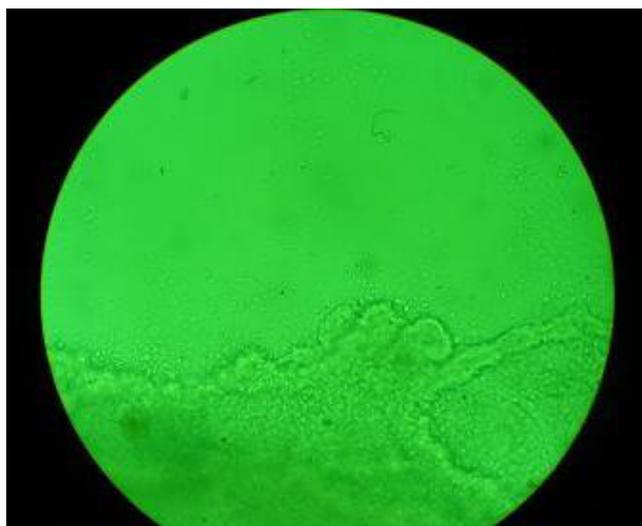


Figura 3 - Imagem, sob microscopia óptica (200x), de cultivo de células PK-15, com quatro dias de incubação, revelando descolamento da monocamada do cultivo celular. As células descoladas já estão mortas, e formam um agregado na parte inferior da imagem

Testes de inocuidade em camundongos

Todos os animais que fizeram parte do experimento sobreviveram, e não se observou nenhuma alteração que pudesse ser atribuída à possível toxicidade do extrato bruto enzimático.

Os camundongos que receberam o extrato bruto enzimático na água de bebida, em diluição de 1/100, apresentaram peso médio final de 21,5 g, superior à média do

grupo controle, que foi de 20,21 g, diferença estatisticamente significativa, em nível de 5%. Já para o grupo que recebeu o extrato em proporção de 1/1000, na água de bebida, embora tenha tido média de peso final superior à do grupo controle, esta diferença não foi significativa estatisticamente.

A Tabela 3 sumariza os resultados obtidos no experimento, bem como a análise estatística empregada.

Tabela 3 - Resultado da análise de inocuidade em camundongos, para o extrato bruto enzimático obtido a partir de fermentação sólida por *Streptomyces viridosporus* T7A

Doses	Controle		1/100 (D1)		1/1000 (D2)	
Média	20,21		21,95		21,17	
Teste	Bonferroni	P	Bonferroni	P	Bonferroni	P
Controle	-	-	-	-	-	-
1/100 (D1)	3,982	0,0002*	-	-	-	-
1/1000 (D2)	2,248	0,0285	-1,777	0,081	-	-

* existe diferença significativa entre o grupo 1/100 e o controle.

O objetivo deste experimento era apenas avaliar se o extrato bruto enzimático poderia apresentar algum tipo de toxicidade para os animais. No entanto, além de não ser tóxico para os animais, o extrato melhorou o desempenho em termos de peso final. Sugere-se que novos estudos sejam conduzidos para avaliar detalhadamente os compostos presentes no extrato bruto enzimático proveniente da fermentação no estado sólido por *Streptomyces viridosporus* T7A que influenciam a microbiota intestinal, a digestão e a absorção de nutrientes.

A Tabela 4 sumariza os resultados obtidos no experimento, bem como a análise estatística empregada.

Conclusões

O extrato bruto enzimático obtido por fermentação no estado sólido inibiu o crescimento de cepas patogênicas de *Staphylococcus aureus*. No entanto não foi capaz de inibir o crescimento de cepas Gram negativas tais como *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli*.

Em cultivo de células PK-15, MDBK e VERO, o extrato bruto enzimático não apresentou efeitos citotóxicos nas diluições testadas (1:5 a 1:5.120). Foram observadas evidências de propriedades citoprotetoras do extrato bruto enzimático, já que em células MDBK e PK-15, na diluição

Tabela 4 - Resultado da análise de inocuidade do extrato bruto enzimático, em camundongos, obtido pela fermentação por *S. viridosporus* T7A, no estado sólido

Doses	Controle		1/100 (D1)		1/1000 (D2)	
Média	20,21		21,95		21,17	
Teste	Bonferroni	P	Bonferroni	P	Bonferroni	P
Controle	-	-	-	-	-	-
1/100 (D1)	3,982	0,0002*	-	-	-	-
1/1000 (D2)	2,248	0,0285	-1,777	0,081	-	-

* existe diferença significativa entre o grupo 1/100 e o controle.

de 1:2.560, houve maior viabilidade e longevidade celular.

Em camundongos, a adição do extrato bruto enzimático à água de bebida, em diluição de 1:100, não causou efeitos tóxicos, e além disso observou-se aumento do peso final dos animais tratados, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Outros trabalhos deverão ser conduzidos, para separar e caracterizar as substâncias produzidas pelo *Streptomyces viridosporus* T7A em decorrência da degradação da lignina, e testá-las isoladamente em cultivos de células de animais e em testes de inibição de crescimento de bactérias patogênicas, avaliar a aplicabilidade de seu potencial antioxidante com finalidades farmacológicas e nutricionais, e avaliar sua eficácia em animais desafiados com agentes patogênicos.

Referências

ADHI, T. P.; KORUS, R. A.; CRAWFORD, D. L. Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two Streptomyces in agitated submerged culture. *Applied environmental microbiology*, p. 1165-1168, May, 1989.

ANDREASEN, M. F. *et al.* Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free radical biology & medicine*, v. 31, n. 3, p. 304-314, 2001.

ANTAI, S. P.; CRAWFORD, D. L. Decomposition of softwood, hardwood and grass lignocelluloses by two *Streptomyces* strains. *Applied environmental microbiology*, v. 42, p. 378-380, 1981.

CRAWFORD, D. L. Lignocellulose decomposition by select *Streptomyces* strains. *Applied environmental microbiology*, v. 35, n. 6, p. 1041-1045, 1978.

CRAWFORD, D. L.; POMETTO III, A. L.; CRAWFORD, R. L. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation Intermediate. *Applied environmental microbiology*, v. 45, n. 3, p. 898-904, Mar. 1983.

_____. Production of useful modified lignin polymers by bioconversion of lignocellulose with *Streptomyces*. *Biotechnology advances*, v. 2, p. 217-232, 1984.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation research*, v. 475, p. 89-111, 2001.

FRESHNEY, I. R. *Culture of animal cells*. 3. ed. New York: Wiley-Liss. 1994.

MORGAN, S. J.; DARLING, D. C. *Cultivo de células animais*. Zaragoza: Acribia. 1993.

MUTH, G.; BROLLE, D. F.; WOHLLEBEN, W. Genetics of *Streptomyces* In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. 2. ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 353.

POMETTO III, A. L.; CRAWFORD, D. L. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Applied environmental microbiology*, p. 246-250, Aug. 1986.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D. L.; POMETTO III, A. L. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: A comparative study of wild type and genetically manipulated strains. *Applied environmental microbiology*, p. 2754-2760, Dec. 1987.

SALVO, L. M. *et al.* Citotoxicidade *in vitro* de clorofenoxiacetato com células hepáticas de *Metynnis roosevelti* (PISCES, CHARACIDAE) em cultivo. *Archives of veterinary science*, v. 4, n.1, p. 45-49, 1999.

SATO, S. Produção de antibióticos. In: AQUARONE, E. *et al.* *Biotecnologia industrial*. São Paulo, 1999. p.101-124.

THEILLEUX, J. Los actinomicetos In: LEVEAU, J. Y.; BOUIX, M. *Microbiología industrial*. Zaragoza: Acribia. 2000. p. 418-471.

Recebido para publicação em 26/10/2005
 Received for publication on 26 October 2005
 Recibido para publicación en 26/10/2005
 Aceito para publicação em 30/03/2006
 Accepted for publication on 30 March 2006
 Acepto para publicación en 30/03/2006

PÓS-GRADUAÇÃO UNIPAR

2006

CIÊNCIAS HUMANAS

Campus Umuarama

- Especialização em Docência do Ensino Superior: Fundamentos e Práticas Educativas
- Especialização em Educação Especial
- Especialização em Educação Física Escolar
- Especialização em Língua Inglesa com Ênfase em TESOL
- Especialização em Língua Portuguesa e Literatura Brasileira
- Especialização em Práticas de Laboratório para o Ensino de Ciências: Níveis Fundamental e Médio

Campus Toledo

- Especialização em Pedagogia da Educação Física e do Esporte na Escola
- Especialização em Psicopedagogia

Campus Guaíra

- Especialização em Educação Especial: Formação Integrada
- Especialização em Psicopedagogia Clínica e Institucional

Campus Cascavel

- Especialização em História Regional: Olhares Sobre o Paraná
- Especialização em Língua Inglesa com Ênfase em TESOL
- Especialização em Língua Portuguesa e Literatura Brasileira

Campus Francisco Beltrão

- Especialização em História do Brasil



QUEM PENSA FAZ.

www.unipar.br