

## Prospecção de antimicrobianos de actinomicetos isolados do trato intestinal de besouros (Insecta: Coleoptera)

Antimicrobial prospecting of actinomycetes isolated from the intestinal tract of beetles (Insecta: Coleoptera)

Prospección antimicrobiana de actinomicetos aislados del tracto intestinal de escarabajos (Insecta: Coleoptera)

Recebido: 20/11/2022 | Revisado: 04/12/2022 | Aceitado: 05/12/2022 | Publicado: 14/12/2022

**Thaís Karoline de Sousa Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7982-7371>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [thaiskarolyne2522@gmail.com](mailto:thaiskarolyne2522@gmail.com)

**Maxwel Adriano Abegg**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0328-1122>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [maxabegg@gmail.com](mailto:maxabegg@gmail.com)

**João Lucas da Silva Rufino**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8547-5280>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [jjoão\\_lucas2018@outlook.com](mailto:jjoão_lucas2018@outlook.com)

**Monique Antunes Negreiros**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6428-1460>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [moniqueantunes39@gmail.com](mailto:moniqueantunes39@gmail.com)

### Resumo

A resistência microbiana é um problema global e conseqüentemente se faz necessário a busca intensiva por novos agentes antimicrobianos e antifúngicos de fontes naturais, através da exploração de novos nichos e habitats. Os besouros da família *Passalidae* vivem e se alimentam de madeira em decomposição e seus intestinos são ricamente colonizados por diferentes micro-organismos. Os actinomicetos representam uma das classes importantes de bactérias por sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários. Foi isolado 103 cepas de actinomicetos. Seguindo para os testes de atividade antimicrobiana preliminar com o método de difusão ágar sendo selecionados cinco melhores para testes posteriores. Foi realizado fermentações líquida com caldo de amido caseína e CZAPEC e meio sólido com ágar batata-dextrose e amido. Ao final dos processos fermentativos, os cultivos foram submetidos a extração em acetato de etila, com a obtenção dos extratos brutos, o material foi filtrado, concentrado e seco, e calculado os rendimentos. Os extratos foram analisados quanto a atividade antimicrobiana, antifúngica e quanto a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição. Foi realizada cromatografia em camada delgada CCD na proporção clorofórmio metanol (70:30) para avaliar a complexidade das amostras. Em seguida o extrato bruto da cepa BA16.2.1foi selecionado como mais promissor e seguiu para purificação e isolamento de frações ativas em HPLC preparativa em MS/MS. Através deste estudo espera-se obter frações ativas e identificadas quanto a sua atividade antimicrobiana e antifúngica.

**Palavras-chave:** Besouros *passalidae*; Actinomicetos; Atividade antimicrobiana.

### Abstract

Microbial resistance is a global problem and consequently it is necessary to intensively search for new antimicrobial and antifungal agents from natural sources, through the exploration of new niches and habitats. The beetles of the *Passalidae* family live and feed on decaying wood and their intestines are richly colonized by different microorganisms. Actinomycetes represent one of the important classes of bacteria for their ability to produce a wide range of secondary metabolites. 103 strains of actinomycetes were isolated. Moving on to the preliminary antimicrobial activity tests with the agar diffusion method, the top five being selected for further testing. Liquid fermentations were carried out with casein starch broth and CZAPEC and solid medium with potato-dextrose and starch agar. At the end of the fermentation processes, the cultures were subjected to extraction in ethyl acetate, obtaining the crude extracts, the material was filtered, concentrated and dried, and the yields were calculated. The extracts were analyzed for antimicrobial and antifungal activity and for the minimum inhibitory concentration using the microdilution technique. CCD thin layer chromatography was performed in the chloroform methanol ratio (70:30)

to assess the complexity of the samples. Then the crude extract of the BA16.2.1 strain was selected as the most promising and proceeded to purification and isolation of active fractions in preparative HPLC in MS/MS. Through this study it is expected to obtain active and identified fractions regarding their antimicrobial and antifungal activity.

**Keywords:** Passalidae beetles; Actinomycetes; Antimicrobial activity.

### Resumen

La resistencia microbiana es un problema global y, en consecuencia, es necesario buscar intensamente nuevos agentes antimicrobianos y antifúngicos de fuentes naturales, mediante la exploración de nuevos nichos y hábitats. Los escarabajos de la familia Passalidae viven y se alimentan de madera en descomposición y sus intestinos están ricamente colonizados por diferentes microorganismos. Los actinomicetos representan una de las clases importantes de bacterias por su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios. Se aislaron 103 cepas de actinomicetos. Pasando a las pruebas preliminares de actividad antimicrobiana con el método de difusión en agar, se seleccionaron los cinco primeros para realizar más pruebas. Las fermentaciones líquidas se realizaron con caldo de caseína-almidón y CZAPEC y en medio sólido con patata-dextrosa y agar almidón. Al finalizar los procesos de fermentación, los cultivos se sometieron a extracción en acetato de etilo, obteniendo los extractos crudos, el material se filtró, concentró y secó, y se calcularon los rendimientos. Se analizó la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos y la concentración inhibitoria mínima mediante la técnica de microdilución. La cromatografía de capa fina CCD se realizó en la relación cloroformo metanol (70:30) para evaluar la complejidad de las muestras. Luego se seleccionó el extracto crudo de la cepa BA16.2.1 como el más prometedor y se procedió a la purificación y aislamiento de las fracciones activas en HPLC preparativa en MS/MS. A través de este estudio se espera obtener fracciones activas e identificadas en cuanto a su actividad antimicrobiana y antifúngica.

**Palabras clave:** Escarabajos passalidae; Actinomicetos; Actividad antimicrobiana.

## 1. Introdução

A resistência microbiana é um problema global e conseqüentemente se faz necessário a busca intensiva por novos agentes antimicrobianos de fontes naturais, através da exploração de novos nichos e habitats (Arora *et al.*, 2018).

As actinobactérias possuem um extenso metabolismo secundário e produzem uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo antivirais, antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, anti-helmínticos, imunossupressores e antioxidantes (Barka *et al.*, 2016; Ser *et al.*, 2017).

Entre os metabólitos secundários produzidos por actinomicetos estão os compostos com atividade antimicrobiana que podem atuar no tratamento de doenças infecciosas. O uso indiscriminado e excessivo desses antimicrobianos leva ao desenvolvimento de microrganismos resistentes, tornando-se uma ameaça à saúde pública, o que contribuem para efetivação de estudos que direcionem à descoberta de novos antimicrobianos (Alvan; *et al.*, 2011).

Na Amazônia brasileira há poucos estudos com actinomicetos isolados de plantas e de solo, podendo citar o trabalho realizado por (Suela Silva *et al.*, 2013) e (Silva *et al.*, 2016), não encontrando nenhum trabalho relacionado ao isolamento de actinomicetos do intestino de besouros, o que demonstra a importância de estudo com esses microrganismos amazônicos.

Pretende-se explorar particularmente essas bactérias associadas com conteúdo intestinal de besouros passalídeos (Coleoptera) que se alimentam principalmente de apodrecimento madeira e passam a maior parte de suas vidas dentro de troncos podres (Reyes-Castillo, 1970; Boucher, 2005). A prospecção de micro-organismos a partir de diferentes nichos biológicos pode favorecer o isolamento de novas cepas e que, eventualmente possam ser produtoras de antibióticos ainda não descritos.

Os micro-organismos apresentam uma grande vantagem para a produção de compostos de interesse comercial devido ao fato de serem cultivados em grandes escalas e seus compostos facilmente purificados. Embora na literatura já se tenha conhecido resultados realmente admiráveis envolvendo os actinomicetos, estes relatos não esgotam nem de longe frente aos benefícios científicos que estão por ser descobertos. É evidente que, no Brasil, um número maior de pesquisadores deve ser formado, não só para estudar as espécies já conhecidas, como também toda a biodiversidade ainda explorada, principalmente nas regiões de clima tropical como a Amazônia (De Oliveira Martins *et al.*, 2021).

A busca por novos antibióticos através de actinomicetos é promissora e a proposta deste trabalho é de investigar novos grupos de actinomicetos isolados a partir de novos habitats, como fontes de novos metabólitos secundários bioativos candidatos a fármacos.

## 2. Metodologia

O estudo foi realizado com a coleta de 35 besouros em três pontos da floresta amazônica: no Campus II da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no Km 260 da rodovia AM-010 (S03°05.654' W058°27.464'), no ramal da comunidade Sol Nascente (S03°01.045' W058°28.830' e no aeroporto (S3° 7' 35" W 58° 28' 54") ambos no município de Itacoatiara – AM. Com o isolamento 102 actinomicetos do trato intestinal de besouros.

### 2.1 Isolamento e conservação de actinomicetos

Os besouros foram mantidos em placas de petri estéreis por 3 dias, sem alimentação, depois congelados e submetidos a dissecação. Segundo (Suh & Blackwell, 2004), manter as espécies sem alimento auxilia na eliminação de alguns organismos contaminantes que possam ser eventualmente isolados do intestino. Em seguida, foi feita uma desinfecção superficial dos insetos por submersão em etanol 70% (5 min), água sanitária (5 min) e água estéril (10 min) antes da remoção do intestino. Uma alíquota de água estéril (100µL) foi semeada em meio ZSSE segundo (Zhang, 2011): (5g de amido solúvel, 1g KNO<sub>3</sub>, 1000mL de extrato de solo, 10g de ágar, acrescido de bifenil 50 mg/mL) como controle negativo.

Os intestinos foram removidos assepticamente com auxílio de estereomicroscópio em cabine de segurança biológica. Após a dissecação, o intestino grosso dos insetos foi cortado em três segmentos com bisturi estéril e esmagados com auxílio de uma pinça em microtubos de 2mL estéreis contendo 100µL de solução salina 0,9% e este macerado foi espalhado em meio ágar ZSSE. As culturas foram incubadas na estufa microbiológica à 30°C de 7 à 14 dias.

Em seguida as colônias foram purificadas pelo método de estrias por esgotamento em placas contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) com amido, sendo um ótimo meio de padrão de crescimento e conservação destes microrganismos.

Para a preservação, os actinomicetos isolados foram mantidos em tubos de ensaios contendo meio de cultivo BDA com amido e glicerol em uma temperatura de -4°C.

### 2.2 Atividade antimicrobiana preliminar

Foi realizado o teste de difusão em ágar seguindo a técnica de Kirby-Bauer modificado (Bauer *et al.*, 1966) para verificação da atividade antibacteriana e antifúngica dos isolados de actinomicetos. As bactérias foram cultivadas em meio Ágar Müeller-Hinton (AMH) a 37°C, e para os fungos o meio Levedura Peptona Dextrose (YPD) a 28°C, por 24 horas. As cepas testes foram fornecidas pela Laboratório de Diversidade e motilidade- ICET/UFAM. Inicialmente no cultivo do microrganismo isolado em meio de cultura BDA com amido. Após dez dias de incubação a 28° C, foi realizado blocos de ágar circulares de 6 mm de diâmetro nos isolados purificados, que foram transferidos para as placas contendo meio (AMH) e (YPD), previamente inoculadas com os microrganismos teste respectivamente: *Escherichia coli* ATTC25922, *Salmonella sp.* ATCC2890, *Staphylococcus aureus* ATCC9040, *Candida albicans* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22014.

Foi utilizada uma suspensão de células padronizadas dos microrganismos teste para bactérias e fungos. Foi realizada na determinação da densidade óptica (OD) de 600nm. A suspensão padrão para os microrganismos selecionados foi 0,02 para a suspensão de *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, 0,05 para suspensão de *Staphylococcus aureus*, e 0,02 para suspensão de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. O teste foi realizado em duplicata para todas as linhagens isoladas. As placas foram

incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição de cada bloco foram medidos (em mm) com auxílio de um paquímetro.

### 2.3 Cultivo em meio sólido

Com base na triagem primária foi realizada a fermentação em meio sólido para a detecção de atividade antimicrobiana. As cepas selecionadas ativas foram fermentadas em placa no meio de cultivo amido caseína (SCA) e incubado a 28 ° C por 15–20 dias. Após o período de incubação o meio foi cortado e filtrado em papel de filtro com um volume igual de acetato 1: 1 (w / v) foi misturado e agitado vigorosamente em 2 h para extração completa. A camada orgânica coletada foi incubada para a evaporação em rotaevaporador. Em seguida o extrato bruto foi pesado para demonstrar a concentração de massa final e seguir para investigação de atividade antimicrobiana em DMSO 2% (Iniyan, *et al.*, 2017 adaptado).

### 2.4 Atividade antimicrobiana de extratos brutos

Os extratos brutos foram testados para atividade antimicrobiana diante do teste de susceptibilidade em discos, seguindo protocolo de (Patel, J. B. *et al.*, 2015) adaptado. Inicialmente, foram preparadas placas de Petri contendo o meio Ágar Mueller Hinton (MHA) e (YPD). Após solidificação dos meios foram produzidas suspensões do micro-organismo teste as quais foram adicionadas sobre o meio de cultivo de maneira uniforme, visando a formação de um tapete de células. A suspensão foi realizada diante da determinação da densidade óptica (OD) a ser padronizada por meio do Espectrofotômetro com densidade óptica de 600nm. As suspensões produzidas foram inoculadas nas placas de MHA e YPD, de maneira uniforme formando um tapete dos micro-organismos no meio de cultivo. Após inóculo da suspensão, foram adicionados 3 discos de 7 mm de diâmetro contidos de 10µL (na concentração de 200mg/ml) dos extratos brutos. As placas foram submetidas a estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C. Após tempo decorrido, os testes foram interpretados com base na formação de halo de inibição dos extratos brutos sobre as suspensões dos microrganismos testes e foram medidos (em mm) com auxílio de um paquímetro.

### 2.5 Cromatografia em Camada Delgada CCD

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia preparativa em camada delgada com placas de cromatografia padrão revestidas com sílica gel 60, com indicador fluorescente F254, de acordo com a metodologia descrita em (Holkar *et al.*, 2013). Primeiramente, 1 mg das frações de interesse foram pesados e solubilizados em 1mL de metanol. A amostra solubilizada foi adicionada a 1cm da base inferior das placas e o inóculo foi adicionado através de um tubo capilar com a extremidade inferior cortada. Após a aplicação das frações, as placas foram colocadas em câmaras cromatográficas de vidro, eluídas com sistema clorofórmio: metanol 70:30 e observado em uma câmara de luz UV.

### 2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima dos extratos de actinomicetos com atividade antimicrobiana foi obtida pela técnica de microdiluição, utilizando microplacas estéreis de 96 poços. Para atividade antibacteriana, 100µL de caldo Luria-Bertani (LB) foram dispensados em todos os poços da placa e 100µL de cada extrato na concentração de 2mg/mL foram adicionados ao poço de teste para diluição em série, resultando em uma concentração inicial de 1mg/ml. O processo de diluição seriada foi realizado sete vezes, sendo homogeneizado e transferido 100µL para cada poço, e assim sucessivamente. A droga controle cloranfenicol 2mg/mL, foi aplicada a todos os poços de controle positivo de bactérias, assim como metanol PA para controle positivo de fungos. O controle negativo tinha solução de DMSO 2%. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35°C, após esse período foi adicionado em cada poço 20µL de reagente resazurina (0,15mg/mL) que indica crescimento microbiano

quando muda a coloração de azul para rosa (Riss *et al.*,2016). Para ambos os testes, verificou-se o efeito do solvente DMSO 2% sobre a cepa microbiana, sendo realizadas diluições seriadas nas mesmas condições dos extratos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Coleta de besouros

Neste estudo, foram realizadas quatro coletas em diferentes locais da UFAM, estrada do Aeroporto e Floresta Amazônica no Piquiá. Foram coletadas 35 espécies de besouros, e a identificação foi realizada levando em consideração as diferenças na morfologia, como cor, formato da cabeça, aparelhos orais, eles foram identificados no Laboratório de Entomologia do INPA e todos são pertencentes à família *Passalidae*.

**Tabela 1** -Identificação de besouros coletados.

Família	Gênero	Espécie	Número de espécimes
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>magdalenae</i>	6
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>sinuosus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>cephalotes</i>	1
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>paraenses</i>	1
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>latifrons</i>	12
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>coniferus</i>	3
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>variiphyllus</i>	3
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>abortivus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>amazonicus</i>	1
<i>Passalidae</i>	Popilius	<i>marginatus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Spasalus	<i>aquina</i>	2

Legenda: Identificação das espécie e quantidade de besouros encontrados na região amazônica. Fonte: autores (2022).

#### 3.2 Isolamento de actinomicetos

Um total de 103 colônias de actinomicetos foram isoladas do intestino de besouros, devido à dificuldade em identificar microrganismos somente a cepa mais promissora será realizada a identificação pela metodologia molecular. As colônias isoladas mostraram as características macroscópicas pelo aspecto de tamanho, consistência, micélio aéreo, micélio submerso, cor e pigmentos difusíveis típicos de actinomicetos como mostra a Figura 1.

**Figura 1** - Colônias isoladas do trato intestinal do besouro no meio ZSSE.



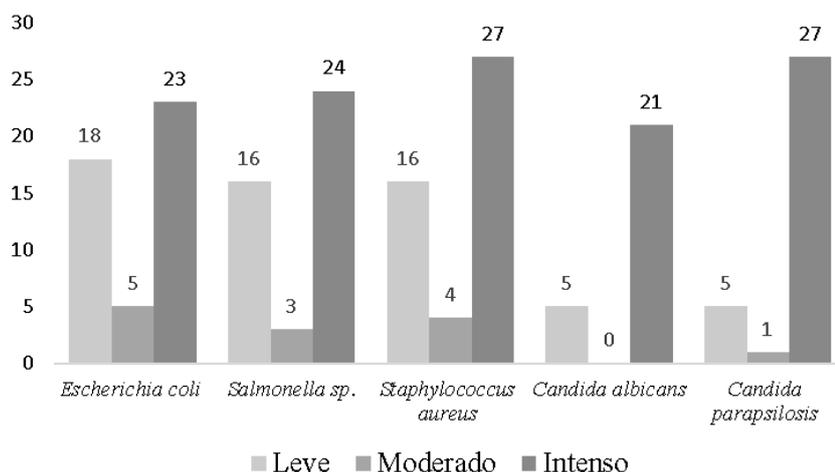
Legenda: Placa de petri após a semeadura do trato intestinal dos besouros com diversidade de colônias. Fonte. autores (2022).

#### 3.3 Atividade antimicrobiana preliminar

O teste de difusão em ágar foi realizado para detectar a inibição das bactérias e fungos em todas as 103 colônias isoladas. Os resultados positivos foram medidos os halos de inibição e classificados quanto ao nível de intensidade, leve, moderado e intenso. Leve (+): diâmetro do halo de inibição entre 5 a 12 mm; Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição

entre 13 a 19 mm; Intenso (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 20 mm e negativo (-): ausência de halo. Todos os microrganismos testados obtiveram resultados satisfatórios se destacando *Staphylococcus aureus* e *C. parapsilosis* que tiveram 27 linhagens com inibição intensa como mostra a Figura 2 abaixo.

**Figura 2** - Inibição dos microrganismos testados no método de difusão em ágar.



Legenda: Classificação dos isolados testados quanto a intensidade do halo em leve (+): diâmetro de inibição entre 5 a 12 mm; moderada (++) : diâmetro inibição entre 13 a 19 mm; intenso (+++): diâmetro de inibição superior a 20 mm e negativo (-): ausência de halo. Fonte: autores (2022)

No estudo de (De Oliveira, 2018) ele avaliou o potencial antimicrobiano de actinomicetos do solo amazônico e obteve um total de 153 extratos de actinomicetos, onde doze (7,84%) demonstraram atividade antimicrobiana, nove morfoespécies com atividade antibacteriana contra bactérias positivas, cinco contra *C. albicans* e nenhuma contra bactérias Gram negativas, sendo o principal gênero produtor de antimicrobiano *Streptomyces*. Contribuindo significativamente para este trabalho, mostrando que a biodiversidade amazônica é rica de fontes exploráveis e com potencial para produzir diferentes metabólitos ativos.

No entanto, apenas as cinco cepas que demonstraram atividade antimicrobiana superior foram selecionados para seguirem para os testes posteriores, como podemos observar na Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2** - Atividade antimicrobiana medida pelos halos de inibição: +++> 20mm / ++ >13-19mm/ + > 5-12mm / -sem zona de inibição.

Linhagem de Actinomicetos	Atividade antibacteriana	Atividade antifúngica
BA16.2.1	++++	+++
BU11.3.1	++	-
BU33.2.1	++	++
BU6.1.5	+++	-
BU6.2.3	++	-

Legenda: Cinco isolados que se destacaram quanto a atividade antimicrobiana. Fonte: autores (2022).

Esses achados corroboram com trabalhos de outros autores, como de (Santamaría,2020) os autores isolaram actinomicetos do intestino e fezes de besouros *C. welensii* larvas. O isolamento de vários actinomicetos permitiu estudar sua capacidade de produzir enzimas como: celulases, hemicelulases, amilases e proteases em condições de laboratório além de produção de antibióticos e antifúngicos que também foi examinada, e os resultados mostraram que cerca de 58% das cepas

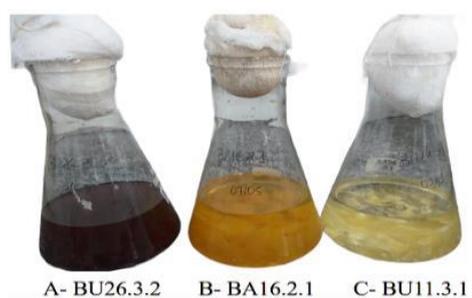
tinham a capacidade de produzir diferentes moléculas ativas contra bactérias Gram-positivas, contribuindo de forma significativa para este trabalho, mostrando a potencialidade desse micro-organismo isolado de uma fonte pouco explorada.

Outro importante trabalho foi de (Chevrette *et.al.*,2019) que afirma que o trato gastrointestinal dos insetos permanece um habitat amplamente inexplorado, em seus ensaios de bioatividade destaca que cepas de *Streptomyces* associadas a insetos tiveram atividade antifúngica significativamente maior comparado a cepas de *Streptomyces* de solo e cepas associadas a plantas. E a partir de uma fração positiva em seu estudo com camundongos, descreveu um novo composto antifúngico a cifomicina, de um *Streptomyces* brasileiro (ISID311) isolado do microbiota da formiga *Cyphomyrmex sp.*

### 3.4 Fermentação em meio sólido

Foi selecionado 3 linhagens que se destacaram na produção de pigmentos e seguiram para fermentação em meio sólido. Sendo elas BU26.3.2 (vermelho), BA16.2.1 (amarelo) e BU11.3.1 (amarelo) como podemos observar na Figura 3. As amostras selecionadas foram concentradas, onde amostra BA16.2.1 obteve o maior rendimento com 5,7mg, seguido de BU26.3.2 com 4mg e BU11.3.1 com 1,3mg como mostra a tabela 3. As cepas também foram testadas quanto a atividade antibacteriana e antifúngica com podemos observar os diâmetros de inibição na Tabela 4.

**Figura 3** - Amostras selecionadas A-BU26.3.2, B- BA16.3.1 e C-BU11.3.1 para fermentação e atividade antimicrobiana e antifúngica.



Legenda: Extração com acetato de etila das fermentações em meio sólido. Fonte: autores (2022).

**Tabela 3** - Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido.

Código da amostra	Peso seco (mg)
BA16.2.1 (amarelo)	5,7mg
BU26.3.2 (vermelho)	4mg
BU11.3.1 (amarelo)	1,3mg

Legenda: Extratos brutos das amostras selecionadas com pigmentos. Fonte: autores (2022)

**Tabela 4** - Resultado da atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos obtidos.

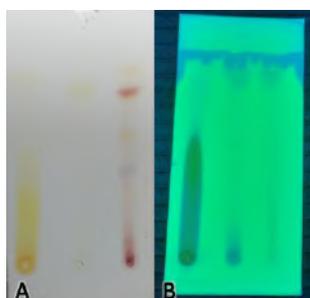
Código da amostra	Atividade antimicrobiana (diâmetro de inibição)	Atividade antifúngica (diâmetro de inibição)
BA16.2.1 (amarelo)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 9mm	<i>C. albicans</i> -7mm
	<i>E.coli</i> - 8mm	<i>C. parapsilosis</i> - 7mm
	<i>Salmonella</i> - negativo	
BU26.3.2 (vermelho)	<i>Staphylococcus aureus</i> negativo	<i>C. albicans</i> - negativo
	<i>E.coli</i> - negativo	<i>C. parapsilosis</i> - negativo
	<i>Salmonella</i> - negativo	
BU11.3.1 (amarelo)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 6mm	<i>C. albicans</i> - negativo
	<i>E.coli</i> - 6mm	<i>C. parapsilosis</i> - negativo
	<i>Salmonella</i> - negativo	

Legenda: Bactérias e fungos selecionados para teste de atividade antimicrobiana. Fonte: autores (2022).

### 3.5 Cromatografia em camada delgada CCD

Com a finalidade de estimar a composição química dos extratos, as amostras selecionadas BA16.2.1 (amarelo), BU11.3.1 (amarelo) e BU26.3.2 (vermelho) foram alocadas para câmaras cromatográficas e eluídas em sistema clorofórmio: metanol na proporção de 70:30, porem como é possível observar na figura 4, ocorreu um arraste na amostra A, não obtendo uma boa separação para avaliar a pureza das substâncias isoladas.

**Figura 4** - Perfil cromatográfico em CCD.



Legenda: A- sem revelação na ordem BA16.2.1, BU11.3.1 e BU26.3.2, e B- com revelação em UV. Fonte: autores (2022).

### 3.6 Avaliação da atividade biológica em função dos meios de cultivo

A cepa selecionada para a avaliação de atividade biológica em função dos meios foi a BU16.2.1. Foi cultivada em três meios para avaliar a atividade inibitória, sendo eles: Caldo CZAPEC, caldo amido caseína e placas em meio BDA amido. Foi extraída com solvente metanol e a biomassa foi ressuspensa em 2% de DMSO para teste de atividade inibitória. A cepa se destacou na fermentação em placas de BDA com amido, seus pigmentos foram produzidos e bactérias patogênicas e fungos foram inibidos. Os parâmetros para a fermentação tais como tempo de crescimento, agitação e temperatura foram os mesmos, porém o comportamento do microrganismo é diferente em cada meio de cultivo devido a fonte de nutrientes de cada um, não apresentou produção de pigmentos nos caldos selecionados e as zonas de inibição podem ser observadas na Tabela 5 e os rendimentos obtidos foram diferente em cada meio utilizado como mostra a Tabela 6.

**Tabela 5** - Inibição dos microrganismos testados no método difusão em disco.

Meios de cultivo	Zonas de inibição do extrato BU16.2.1
Caldo CZAPEC	Negativo
Caldo amido caseína	Negativo
Placas em BDA amido	<i>S.aureus</i> -6mm intensa inibição/ <i>E.coli</i> - 5mm intensa inibição/ <i>Salmonella</i> - 7mm intensa inibição/ <i>Cândida albicans</i> - 6mm moderado/ <i>Cândida parapsilosi</i> - negativo

Legenda: Avaliação de atividade biológica em função dos meios de cultivo do extrato bruto BA16.2.1 com inibição somente em placas de BDA amido. Fonte: autores (2022).

**Tabela 6** - Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido e líquido.

Meios de cultivo	Peso seco (mg)
Caldo CZAPEC	36,4mg
Caldo amido caseína	74mg
Placas em BDA amido	11516,6mg

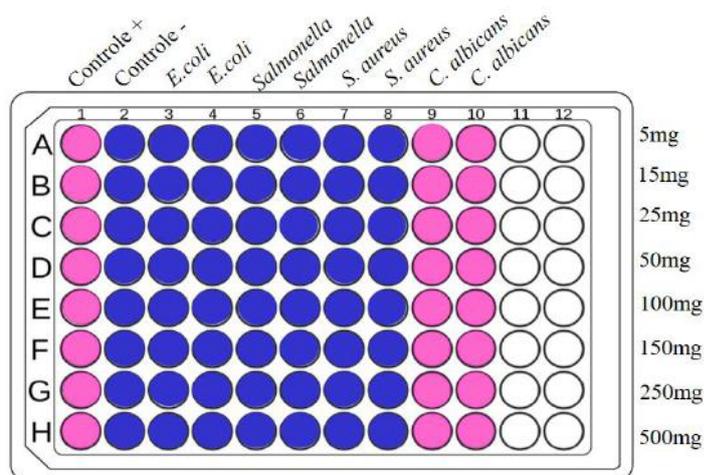
Legenda: Extrato bruto BA16.2.1 com rendimento maior em placas de BDA amido. Fonte: autores (2022).

No trabalho de (Ouchari L. *et al.*, 2019) os autores isolaram 163 actinomicetos do deserto de Merzouga, realizaram análise comparativa da atividade antimicrobiana dos isolados e dividiram em 15 grupos. Relataram que 58% desses isolados apresentaram atividade antibacteriana com inibição dos patógenos testados e mostraram o quanto é importante meio de cultura para a expressão da atividade antimicrobiana. Este fato observado colabora com os resultados apresentados nesse trabalho, mostrando que a escolha do meio de cultivo deve ser realizada de forma criteriosa para alcance de bons resultados. Já que os microrganismos se comportam diferente em cada meio de cultura.

### 3.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em duplicata com o extrato bruto da cepa BU16.2.1 em DMSO 2%, que variou de 5mg à 500mg. Houve resposta inibitória somente para o fungo *candida albicans* em todas as concentrações testadas, e sem inibição dos patógenos para as bactérias selecionadas como mostra a Figura 5.

**Figura 5** - Resultado da concentração Inibitória Mínima (CIM).



Legenda: Demonstração do processo de microdiluição e diluição seriada. As bactérias foram testadas no caldo LB e o fungo no caldo YPD nas seguintes concentrações, 5mg, 15mg, 25mg, 50mg, 100mg, 150mg, 250mg. Fonte: autores (2022).

A CIM demonstra um potencial para produção de antifúngico por apresentar concentrações relativamente boa para extrato bruto, impedindo crescimento e a multiplicação dos microrganismos testados. A partir dos resultados das análises biológicas, a cepa BA16.2.1 foi selecionada como a mais promissora para dar seguimento com análise de características químicas detalhadas usando técnicas de cromatografia e espectroscopia.

Um importante trabalho foi de (Ibnouf *et al.*, 2022) que encontrou dez compostos antimicrobianos com outras atividades biológicas, como anticâncer, antioxidante e cosmética, que foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas GC-MS, sendo alguns desses compostos de natureza de ácidos graxos e outros hidrocarbonetos

Os resultados apresentados neste trabalho são preliminares e reforçam a expectativa desse estudo pois nos mostra o quanto é importante realizar a separação e identificação química da substância ativa, podendo ser identificado um novo composto antimicrobiano ou antifúngico de uso seguro e com diferentes propriedades

#### 4. Considerações Finais

Neste estudo, observou-se que meios sólidos podem garantir rendimentos de extrato satisfatórios para o isolamento de compostos biologicamente ativos. O extrato obtido da cepa BA16.2.1 se mostrou promissor para a dá seguimento para a purificação e identificação das substancias ativas, bem como a identificação molecular do actinomiceto isolado. Ressalto ainda a importância deste trabalho para a Amazônia, que possui uma rica e pouco conhecida biodiversidade que facilita a busca de novos microrganismos voltados à produção de antimicrobianos industrialmente significativos, o que pode levar à descoberta de novas substâncias.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao PROCAD-Programa Amazônia e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA) do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET).

## Referências

- Alvan, G., Edlund, C., & Heddini, A. (2011). The global need for effective antibiotics—a summary of plenary presentations. *Drug Resistance Updates*, 14(2), 70-76.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Bauer, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*, 45, 149-158.
- Boucher, S. (2005, January). Évolution et phylogénie des coléoptères Passalidae (Scarabaeoidea) Les taxons du groupe famille la tribu néotropical des Proculini et son complexe Veturius. In *Annales de la Société entomologique de France* (41(3-4), 239-604).
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., & Currie, C. R. (2019). The antimicrobial potential of Streptomyces from insect microbiomes. *Nature communications*, 10(1), 1-11.
- De Oliveira Martins, S. D. S., de Mendonça, J. L. V., do Nascimento, A. P., Neto, P. D. Q. C., & Barbosa, A. M. (2021). Ação antimicrobiana de actinomicetos rizosféricos de guaranazeiro. *Nature and Conservation*, 14(1), 83-89.
- De Oliveira, R. C., & Branco-AC, R. I. O. (2018). Potencial antimicrobiano de actinomicetos de solos amazônicos.
- Holkar, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2013). Análogos de rodomicina de Streptomyces purpurascens: isolamento, caracterização e atividades biológicas. *SpringerPlus*, 2 (1), 1-13.
- Ibnouf, E. O., Aldawsari, M. F., & Waggiallah, H. A. (2022). Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(8), 103352.
- Iniyana, A. M., Kannan, R. R., & Vincent, S. G. P. (2017). Characterization of culturable actinomycetes associated with halophytic rhizosphere as potential source of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(1), 233-242.
- Patel, J. B., Cockerill, F. R., Bradford, P. A., Eliopoulos, G. M., Hindler, J. A., Jenkins, S. G., & Limbago, B. (2015). M02-A12: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—.
- Ouchari, L., Boukeskase, A., Bouizgarne, B., & Ouhdouch, Y. (2019). Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. *Biology open*, 8(2), bio035410.
- Reyes-Castillo, P. (1970). Coleoptera, Passalidae: morfología y división en grandes grupos; géneros americanos. *Folia ent. Mex.*, 20, 1-240.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*.
- Santamaría, R. I., Martínez-Carrasco, A., Sánchez de la Nieta, R., Torres-Vila, L. M., Bonal, R., Martín, J., & Díaz, M. (2020). Characterization of actinomycetes strains isolated from the intestinal tract and feces of the larvae of the longhorn beetle *Cerambyx welensii*. *Microorganisms*, 8(12), 2013.
- Ser, H. L., Tan, L. T. H., Law, J. W. F., Chan, K. G., Duangjai, A., Saokaew, S., & Lee, L. H. (2017). Focused review: cytotoxic and antioxidant potentials of mangrove-derived Streptomyces. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2065.
- Silva, J. M., Clementino, E. L., Cunha, M. N., Porfírio, K. P., Mota, R. A., Teixeira, M. F., & Porto, C. S. (2016). Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por Streptomyces parvulus DPUA 1573 frente a Staphylococcus spp. multirresistentes de mastite bubalina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36, 805-810.
- Suela Silva, M., Naves Sales, A., Teixeira Magalhães-Guedes, K., Ribeiro Dias, D., & Schwan, R. F. (2013). Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. *BioMed Research International*, 2013.
- Suh, S. O., & Blackwell, M. (2004). Three new beetle-associated yeast species in the Pichia guilliermondii clade. *FEMS Yeast Research*, 5(1), 87-95.
- Zhang, J., & Zhang, L. (2011). Improvement of an isolation medium for actinomycetes. *Modern Applied Science*, 5(2), 124.