



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
INDUSTRIAL**

GLÊZIA RENATA DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE
Caesalpinia pyramidalis Tul. DO BIOMA CAATINGA**

**RECIFE
2013**

GLÊZIA RENATA DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE
Caesalpinia pyramidalis Tul. DO BIOMA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima.

**RECIFE
2013**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Glêzia Renata da
Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga/ Glêzia Renata da Silva– Recife: O Autor, 2013.

93 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Janete Magali de Araújo

Coorientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Caesalpiniaceae 2. Fermentação 3. Caatinga I. Araújo, Janete Magali de (orientadora) II. Lima, Gláucia Manoella de Souza (coorientadora) III. Título**

583.749

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 069

GLÊZIA RENATA DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE
Caesalpinia pyramidalis Tul. DO BIOMA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Leonor Alves de Oliveira da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 25 de Fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Antonio e Luiza, pela paciência,
dedicação e apoio nos momentos mais
difíceis desta jornada, e principalmente
por incentivar à construção da minha
carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ao longo destes dois anos de mestrado, me proporcionar perfeita saúde e disposição para executar minhas tarefas, e por me dar sabedoria, condições materiais e espirituais para que eu pudesse ter todas minhas expectativas consolidadas.

Aos meus pais Luiza e Antonio, que sempre procuraram colocar o estudo acima de tudo, e a minha irmã Graziela e meu cunhado Renan, pelo incentivo e apoio dado ao longo desta jornada. Agradeço por acreditarem tanto em mim. Tudo isso isto me serviu de combustível para gerar forças para eu chegar até aqui.

Ao meu namorado Jefferson, por estar sempre ao meu lado dando o apoio necessário, por entender todo meu esforço e por me ajudar a superar todos os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Agenor Tavares Jácome Júnior, por ter despertado em mim o interesse pela área acadêmica.

À Prof^a. Kêsia Xisto e a Prof^a. Dr^a. Norma Gusmão, por terem me acolhido no laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos, pelo apoio e confiança depositados em mim, para que aqui eu pudesse desenvolver meu projeto.

À Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo, por sem ao menos que conhecer ter me aceitado como orientanda e por ao longo do projeto ter se disponibilizado a me ajudar em qualquer circunstância.

À Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima, pelo apoio fornecido ao longo da construção desta dissertação.

À Evelyne Solidônio e Maria Cláudia, por terem me acolhido tão bem desde o primeiro dia que eu chequei no laboratório, por tantas vezes abrirem mão das suas atividades para me ajudar nos experimentos, pela confiança, afeto,

cumplicidade e principalmente pela amizade que construímos ao longo destes anos.

À minha segunda família, do Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos: Flávia, Pérsio, Nelânia, Maira, Erik, Robson, Jeanne, Talyce e Igor, pela amizade e pela descontração para ajudar a levar a rotina do dia a dia com mais alegria; Guilherme, Cecília, Dani Sá e Márcio, que apesar de não estarem presentes diariamente formaram um laço de amizade que jamais será desfeito; Rosilma, Luís, Patrícia, Paula, Júlia, Beth e Eduardo por todo o carinho.

Aos meus colegas de turma, pela união, por acreditar uns nos outros e por terem feito nosso convívio tão agradável. Em especial a Sandrine Arruda, Gustavo Pardal e Danilo Cavalcanti, pela amizade sincera e por dividir comigo os dias de luta e os dias de glória!

Às minhas amigas de apartamento: Sinara, por ter me acolhido e me ajudado a superar o desafio de sair da casa dos meus pais e a Alyne pela companhia tão agradável, por me escutar e por toda sua presteza. Sou grata à vocês, pelo apoio e incentivo que me dão diariamente.

A todos os amigos do Laboratório de Coleção de Culturas, em especial àqueles que me tiraram tantas dúvidas: Janaína, Emerson e Rodrigo.

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de antibióticos, pela atenção e serviços prestados e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não faças do amanhã o sinônimo do nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te”.

Charles Chaplin

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo estudar a diversidade microbiana da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Foram isoladas 68 linhagens, sendo 52,9% (36) na temperatura de 37°C e 47,05% (32) a 45°C. As linhagens identificadas pertencem ao gênero *Streptomyces*. O Teste de Difusão em Ágar das linhagens em estudo para bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos revelou que 11 (16%) apresentaram atividade antimicrobiana. As isoladas a 37°C, 25% (9/36), apresentaram atividade para *Fusarium moniliforme*, com halos de inibição entre 26 e 28 mm, e para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* MRSA, com halos de inibição de 19 a 22 mm. Dos isolados a 45°C apenas 3 (9,4%) apresentaram halos de inibição entre 16 a 23 mm para *F. moniliforme* e *Candida albicans*. O ensaio secundário selecionou duas linhagens com atividade antimicrobiana para Gram positivas com halos de inibição de 28 mm. A linhagem mais promissora foi identificada por técnicas moleculares como *Streptomyces gougeroti* com 95% de similaridade. A extração dos metabólitos bioativos da biomassa desta linhagem foi realizada com etanol e do líquido metabólico com acetato de etila. O extrato bruto etanólico apresentou CMI de 0,97 µg/mL para *S. aureus* MRSA e *B. subtilis*, enquanto o extrato bruto de acetato de etila apresentou CMI de 3,9 µg/mL para *S. aureus* e *S. aureus* MRSA. A prospecção química evidenciou presença de flavonóides, mono/sesquiterpenos, proantocianidina, triterpenos e esteróides nos extratos brutos. Deste modo, comprova-se que solos pouco férteis como o da Caatinga ocorrem microorganismos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

Palavras-chave: Actinobactéria; Atividade Antimicrobiana; Fermentação; Extração líquido-líquido; Cromatografia em Camada Delgada.

ABSTRACT

This work aims to study the microbial diversity of the rhizosphere of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Were isolated 68 strains, of which 52.9% (36) at 37 ° C and 47.05% (32) at 45 ° C. The strains identified belong to the genus *Streptomyces*. The Test Agar Diffusion of strains in study for Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and fungi revealed that 11 (16%) showed antimicrobial activity. The isolated at 37 ° C, 25% (9/36), had activity for *Fusarium moniliforme*, with inhibition zones between 26 and 28 mm, and for *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus aureus* MRSA, with inhibition zones 19 and 22 mm. Of the isolates at 45 °C only 3 (9,4%) showed zones of inhibition between 16 and 23 mm for *F. moniliforme* and *Candida albicans*. The secondary test selected two strains with antimicrobial activity against Gram positive bacteria with inhibition zones of 28 mm. The most promising strain was identified as *Streptomyces gougeroti* through molecular techniques with 95% similarity. The extraction of bioactive metabolites biomass of this strain was made with ethanol and of metabolic liquid with ethyl acetate. The crude ethanol extract showed MIC of 0,97mg/mL for *S. aureus* MRSA and *B. subtilis*, while the crude ethyl acetate extract showed MIC of 3,9 mg/mL for *S. aureus* and *S. aureus* MRSA. The chemical prospecting revealed the presence of flavonoids, mono/sesquiterpene, proanthocyanidin, triterpenes and steroids in crude extracts. Thus, it was proven that fertile little soils, like soils of Caatinga, occur as the microorganisms important for the development of new antimicrobial drugs.

Keywords: Actinobacteria; Antimicrobial Activity; Fermentation; Liquid-liquid Extraction; Cromatography Thin Layer.

LISTA DE FIGURAS

Figura	3.1	Vegetação e Extensão do Bioma Caatinga.....	23
Figura	3.2	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul. (Catingueira), do Bioma Caatinga.....	26
Figura	4.1	Esquema do Isolamento das Actinobactérias.....	37
Figura	4.2	Esquema da metodologia usada no teste do bloco de gelose.....	38
Figura	4.3	Determinação da Concentração Mínima Inibitória dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico do <i>Streptomyces gougerotii</i> pela técnica de microdiluição. C1-C10 (microdiluição); C11 (controle positivo) e C12 (controle de esterilidade do meio).....	43
Figura	4.4	Determinação da Concentração Mínima Bacteriostática dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico de <i>Streptomyces gougerotii</i> , pela subcultura dos poços da microdiluição. Repique dos poços da C1-C6 e C11-C12 da linha A da microplaca.....	44
Figura	4.5	Técnica do microcultivo para identificação das Actinobactérias.....	47
Figura	5.1	Colônias de actinobactérias nas diluições 10^{-3} : (A) meio MC, (B) AYm e (C) ISP-4.....	51
Figura	5.2	A) Número de isolados a 37°C e 45°C; (B) Isolamento de actinobactéria em diferentes meios de cultura a 37°C e 45°C; (C) Percentual de actinobactérias identificadas em diferentes	51

	temperaturas.....	
Figura 5.3	Microcultivo da linhagem C1.52 no meio AY modificado.....	52
Figura 5.4	Porcentagem das diferentes colorações do micélio aéreo das actinobactérias isoladas.	53
Figura 5.5	Diferentes colorações do micélio aéreo das actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga.....	53
Figura 5.6	Micromorfologia dos gêneros investigados por microscopia óptica (40x). (A), (B), (C) e (D) indicam as diferentes morfologias em que <i>Streptomyces</i> sp. podem apresentar.....	54
Figura 5.7	Halo de inibição do bloco de gelose de algumas actinobactérias. (A) Halo de inibição de <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> para o <i>S. aureus</i> (UFPEDA-02), (B) <i>Streptomyces gougerotii</i> para <i>S.aureus</i> - <i>MRSA</i> (UFPEDA-700), (C) Actinobactéria C1.48 para <i>C. albicans</i> (UFPEDA-1007), (D) Actinobactéria C1.125 para <i>C. albicans</i> (UFPEDA-1007), (E) Actinobactéria C1.124 para <i>F. moniliforme</i> (UFPEDA-2456); (F) Actinobactéria C1.98 para <i>B. subtilis</i> (UFPEDA-86).....	58
Figura 5.8	(A) Porcentagem das actinobactérias com atividade antimicrobiana, (B) Porcentagem das actinobactérias com atividade antimicrobiana nas diferentes temperaturas de isolamento.....	59
Figura 5.9	Porcentagem de actinobactérias com atividade antimicrobiana.....	59
Figura 5.10	Halo de inibição do <i>Streptomyces gougerotii</i> após 72 horas de fermentação: <i>S. aureus</i> (UFPEDA-02) (A), <i>B. subitilis</i> (UFPEDA-	61

86) (B) e *S. aureus* MRSA (UFPEDA-700) (C).....

- Figura 5.11** Halos de inibição para *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B), *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C), da fermentação de *Streptomyces coeruleorubidus* em diferentes meios de cultura durante 120 horas. **63**
- Figura 5.12** Halos de inibição para *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B), *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C), da fermentação do *Streptomyces gougerotii* em diferentes meios de cultura durante 120 horas..... **64**
- Figura 5.13** Halo de inibição do extrato acetônico da biomassa do *Streptomyces coeruleorubidus* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A) e *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B). As setas indicam o halo do extrato em pH 7..... **66**
- Figura 5.14** Halo de inibição do extrato etanólico da biomassa do *Streptomyces gougerotii* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B) e *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C). As setas indicam o halo do extrato em pH 7..... **66**
- Figura 5.15** Halos de inibição do extrato acetato de etila da biomassa de *Streptomyces coeruleorubidus* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B) e *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C). As setas indicam o halo do extrato em pH 7..... **67**
- Figura 5.16** Halos de inibição do extrato de acetato de etila da biomassa de *Streptomyces gougerotii* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B) e *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C). As setas indicam o halo do extrato em pH 7..... **67**

Figura 5.17 Bioautografia dos extratos brutos da biomassa (B) e do líquido metabólico (LM) de *Streptomyces gougerotii*. As setas indicam os R_{fs} dos metabólitos bioativos..... **75**

LISTA DE TABELAS

Tabela	3.1	Principais constituintes da parede celular das actinobactérias e sua relação com a taxonomia (LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1965).	33
Tabela	3.2	Principais constituintes da parede celular das actinobactérias e sua relação com a taxonomia (HECHT e CAUSEY, 1976).....	33
Tabela	3.3	Principais constituintes da parede celular das actinobactérias e sua relação com a taxonomia (GOODFELLOW et al., 1976).....	34
Tabela	4.1	Micro-organismos testes utilizados para avaliação da Atividade Antimicrobiana.	39
Tabela	5.1	Condições cromatográficas da prospecção química dos metabólitos secundários produzidos pelo <i>Streptomyces gougerotii</i>	45
Tabela	5.2	Resultado da extração do metabólito ativo da biomassa de <i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	69
Tabela	5.3	Resultado da extração do metabólito ativo do líquido metabólico de <i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	69
Tabela	5.4	Resultado da extração do metabólito ativo da biomassa de <i>Streptomyces gougerotii</i>	70
Tabela	5.5	Resultado da extração do metabólito ativo do líquido metabólico de <i>Streptomyces gougerotii</i>	70

Tabela	5.6	Determinação da CMI dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico de <i>Streptomyces gougerotii</i> frente aos microorganismos testes.....	71
Tabela	5.7	Prospecção química por Cromatografia em Camada Delgada dos metabólitos secundários bioativos produzidos pela actinobactéria <i>Streptomyces gougerotii</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MC	- Meio Completo
AYm	- Arginina Levedura Agar Modified
ISP-4	- International Streptomyces Project Medium 4
MH	- Müeller Hinton Agar
M1	- Meio 1
MPE	- Meio de Produção de Euromicina
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
PBS	- Phosphate Buffered Saline
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA/	- Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos –
DAUFPE	UFPE
pH	- Potencial Hidrogeniônico
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
DAP	- Ácido Diaminopimérico
DAB	- Ácido Diaminobutírico
rpm	- Rotação por minuto
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
PCR	- Polymerase chain reaction
NCBI	- National Center for Biotechnology Information
MRSA	- Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CMI	- Concentração Mínima Inibitória
CMB	- Concentração Mínima Bactericida
TLC	- Thin Layer Chromatography
TTZ	- 2,3,5-trifeniltetrazólio
NEU	- Difenilboriloxietilamina 1% em EtOH

SUMÁRIO

Introdução.....	19
2. Objetivos	
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Revisão da literatura	
3.1. Caatinga.....	23
3.2. Rizosfera.....	24
3.3. <i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.....	26
3.4. O solo e sua biodiversidade.....	27
3.5. Actinobactérias.....	29
3.5.1. Morfologia dos <i>Streptomyces</i>	31
3.5.2. Parede celular das actinobactérias.....	32
3.5.3. Metabólitos secundários e atividade antimicrobiana	34
4. Material e métodos	
4.1. Isolamento de actinobactérias.....	37
4.2. Determinação da atividade antimicrobiana.....	38
4.2.1. Ensaio primário.....	38
4.2.2. Ensaio secundário.....	40
4.2.2.1. Fermentação.....	40
4.2.2.2. Atividade antimicrobiana.....	40
4.3. Extração do antibiótico.....	41
4.3.1. Separação da massa celular.....	41
4.3.2. Extração do antibiótico - biomassa.....	41
4.3.3. Extração do antibiótico – líquido metabólico.....	41

4.4. Atividade Antimicrobiana dos extratos.....	42
4.4.1. Determinação da Concentração Inibitória.....	42
4.4.2. Leitura da Microplaca.....	43
4.5. Prospecção Química dos Extratos.....	44
4.6. Bioautografia	46
4.7. Identificação das actinobactérias.....	46
4.7.1. Caracterização taxonômica.....	46
A) Análise micromorfológica.....	47
B) Hidrólise da parede celular.....	47
C) Cromatografia em camada delgada (CCD).....	48
4.7.2. Identificação molecular.....	48
5. Resultados e Discussão	
5.1. Isolamento das actinobactérias.....	50
5.2. Identificação das actinobactérias.....	52
5.2.1. Caracterização Morfológica.....	52
5.2.2. Avaliação da Parede Celular.....	55
5.2.3. Caracterização Molecular.....	55
5.3. Atividade antimicrobiana.....	57
5.3.1. Ensaio primário.....	57
5.3.2. Ensaio secundário.....	60
5.4. Extração	65
5.4.1. Extração do antibiótico – biomassa e líquido metabólico.....	65
5.5. Atividade Antimicrobiana dos Extratos.....	71
5.6. Prospecção Química dos Extratos Brutos	73

5.7. Bioautografia	75
6. Conclusões	77
7. Referências	78
8. Anexos	88
8.1. Meios de Cultura Utilizados.....	88
8.2. Tampão.....	89
9. Apêndices	90
Apêndice A.....	90
Apêndice B.....	91
Apêndice C.....	92
Apêndice D.....	93

INTRODUÇÃO

A caatinga é um bioma localizado no Nordeste do Brasil, que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais, que se destaca como um patrimônio biológico desta região que não existe em nenhum outro lugar do mundo. De todos os biomas brasileiros, a caatinga o menos protegido, sendo ao mesmo tempo a região que mais sofre com a deterioração ambiental. Por estes e outros fatores, o estudo e a conservação da biodiversidade tem se tornado um grande desafio para os pesquisadores brasileiros (GORLACH-LIRA e COUTINHO, 2007; LEAL et al., 2003).

As informações sobre a estrutura e funcionamento de ecossistemas florestais como a Caatinga ainda são escassas e investigações sobre a produção e decomposição de resíduos florestais, são fundamentais para o conhecimento das características funcionais deste ecossistema.

O solo é um ambiente complexo, caracterizado por processos químicos, físicos e biológicos, que é influenciado por fatores ambientais (DING et al., 2004), além da intensa atividade microbiológica deste habitat que abriga uma grande diversidade de seres vivos. Este ecossistema oferece grande suporte para a manutenção da microfauna, tendo diversidade microbiológica como sua principal característica (MICHEREFF et al., 2005). Gorlach-Lira e Coutinho (2007) relataram que bactérias heterotróficas mesófilicas e actinobactérias são significativamente mais abundantes do que termofílicos em regiões de clima seco, como no semiárido brasileiro, podendo ser encontradas numa proporção de cerca de 10^6 - 10^7 UFC g⁻¹ solo seco.

A rizosfera é considerada a região do solo bastante influenciada pelas raízes de plantas, com máxima atividade microbiana. Além disso, é uma região de abundante diversidade microbiana, que na maioria das vezes é enriquecida de substâncias provenientes do metabolismo das plantas. Bactérias, fungos, actinobactérias e as plantas, vivem em um processo constante de simbiose, onde todos se beneficiam. (RASCHE et al., 2006; MELO e AZEVEDO, 2008; BERG e SMALLA, 2009; EMBRAPA, 2012).

As actinobactérias ocorrem nos mais diversos ambientes, com maior predominância no solo (VASCONCELLOS et al., 2010). Foram inicialmente descritas por Ferdinando Cohn em 1875 e correspondem a um grupo de bactérias Gram positivas, caracterizado pelo alto conteúdo de G+C e por desenvolver esporos, sendo assim sua principal forma reprodutiva (KONEMAN, 2008; MADIGAN, 2010; PELCZAR JR, 1997).

De todas actinobactérias estudadas, o gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica por serem responsáveis pela produção de grande parte dos antibióticos já conhecidos e por serem produtores de enzimas de aplicação industrial (MADIGAN, 2010; DING, 2004; LIRAS e MARTIN, 2005).

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário microbiano que em baixas concentrações impedem o desenvolvimento de outros micro-organismos, patogênicos ou não. Lima e colaboradores (2001) afirmam que as actinobactérias são responsáveis pela produção de aproximadamente 4.600 antibióticos já conhecidos, e supera a produção de antibióticos por outros micro-organismos. *Streptomyces* é o maior produtor de antibióticos, sendo responsáveis pela produção de cerca de 500 antibióticos, onde 60 deles tem aplicação na medicina, agricultura, indústria e veterinária (TORTORA, 2011; MADIGAN, 2010).

Dentre os antibióticos produzidos pelas actinobactérias estão: as estreptomicinas, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, novobiocina, vancomicina, e até mesmo antifúngicos, como nistatina e anfotericina B (LACAZ, 1965).

Baseado neste contexto é importante investigar o potencial biotecnológico das actinobactérias da Caatinga, pois estes micro-organismos podem ser grandes produtores de metabólitos secundários bioativos de possível aplicação em diversos ramos da indústria.

O estudo dos micro-organismos da rizosfera de plantas da Caatinga é extremamente importante, uma vez que o solo pouco fértil pode transformar-se em uma poderosa fonte de micro-organismos produtores de metabólitos de importância biotecnológica. A busca por produtos que possam contribuir de maneira eficaz no combate a bactérias patogênicas resistentes constitui uma meta importante que tem como objetivo inibir o crescimento dessas no organismo humano. O surgimento

rápido e agressivo de bactérias patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos vem motivando os cientistas a pesquisar novas biomoléculas mais efetivas, se destacando os micro-organismos da rizosfera, especialmente actinobactérias, como uma fonte promissora de novos antibióticos de grande interesse para a indústria farmacêutica e biotecnológica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Isolar as actinobactérias da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Catingueira) do bioma Caatinga e avaliar a produção de substâncias bioativas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar actinobactérias do solo rizosférico em diferentes meios de cultura e condições de cultivo;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos isolados;
- Realizar fermentação e selecionar o melhor meio e tempo de produção do antibiótico;
- Identificar os isolados com maior produção de substâncias bioativas em nível de gênero através de técnicas clássicas e moleculares;
- Realizar prospecção química nos extratos brutos das actinobactérias bioativas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CAATINGA

O bioma da Caatinga compreende uma região do nordeste brasileiro, localizada na região semi-árida, com aproximadamente 844, 453 Km², o que corresponde a cerca de 50% do Nordeste brasileiro e 18% do território nacional. O termo Caatinga é originário do tupi-guarani e significa mata branca (IBGE, 2012; IBAMA; 2012).

A Caatinga é uma floresta sazonalmente seca e composta de arbustos espinhosos, gramíneas e por pequenas árvores xerófilas, que perdem a folhagem em época de seca, voltando a brotar e ficar verde nos curtos períodos de chuvas. Esta vegetação tropical seca compreende os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais com temperaturas elevadas e alto nível de insolação (Figura 3.1). Além disto, a escassez das chuvas, bem como de recursos hídricos, levam esta região a longos períodos de seca. As altas temperaturas associadas à alta intensidade luminosa provocam uma demanda evaporativa alta e conseqüentemente a dessecação do solo, justificando o déficit hídrico da região (GORLACH-LIRA e COUTINHO, 2007; TROVÃO et al., 2007; LEAL et al., 2003).

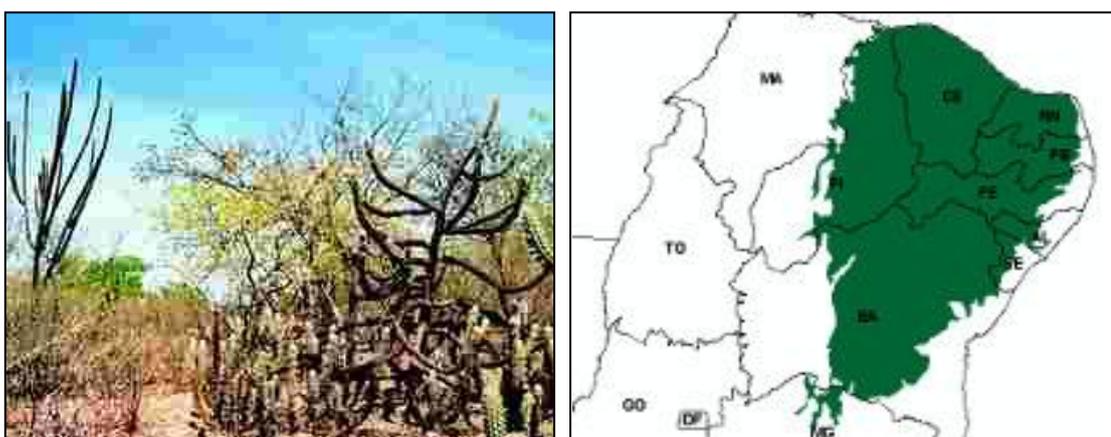


Figura 3.1 - Vegetação e Extensão do Bioma Caatinga. Fonte: <<http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/caatinga/caatinga.htm>> acesso em: 19/07/2012 às 22:12.

De acordo com o IBGE (2012) cerca de 27 milhões de pessoas, aproximadamente 15% da população do Brasil, vivem no polígono das secas. Em geral, a população que reside na zona rural da Caatinga possui baixa renda e os longos períodos de seca reduzem a produtividade da região, aumentando assim o sofrimento da população (SAMPAIO e BATISTA, 2004).

De acordo com Leal e colaboradores (2003) e Gorlach-Lira e Coutinho (2007), o bioma Caatinga enfrenta grandes desafios relacionados com a conservação da biodiversidade desta área. Comparando a Caatinga com os outros biomas existentes no Brasil, pode ser observado que esta região sofre graves consequências com a deterioração do meio ambiente por ser neste âmbito, a região menos protegida do país.

É importante ressaltar que o processo de desertificação tem-se acelerado nas últimas décadas devido às técnicas de irrigação aplicadas tanto na fruticultura quanto nas plantações de soja e outros grãos. A desertificação já atinge mais de 15% da área do bioma Caatinga e isto é resultado dos graves danos ambientais causados pelo uso inapropriado do solo (SILVA et al., 2004; CASTELETTI et al., 2004).

A desertificação é uma ameaça à biodiversidade da Caatinga, pois o solo é considerado um sistema natural de grande complexidade, pois nele ocorre uma diversidade de fenômenos físico-químicos, além de propiciar um ambiente rico e favorável para micro-organismos de solo. Diversas reações metabólicas podem ocorrer neste bioma, pela ação da mesofauna e macrofauna do solo. Estes micro-organismos simbióticos desempenham importante papel nos processos de ciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica do solo (ALEF e NANNIPIERI, 1995).

3.2. RIZOSFERA

O conceito “rizosfera” foi definido primeiramente por Hiltner em 1904 e compreende a região do solo que é influenciada pelas raízes de plantas superiores e por ser um ambiente dinâmico, possui máxima atividade microbiana (MELO e

AZEVEDO, 2008). As plantas têm um grande efeito sobre a diversidade, abundância e atividade de micro-organismos do solo que vivem em estreita proximidade com as suas raízes. A rizosfera, frequentemente é influenciada por vários parâmetros, que podem alterar a atividade e a estrutura da comunidade microbiana. O solo presente na região radicular controla o desenvolvimento e crescimento das plantas e a associação com a microbiota da rizosfera exerce diversas atividades benéficas para a planta. Além disso, a rizosfera é importante para processos relacionados com as trocas de O₂ e CO₂, mineralização, nutrição da planta, gradientes de unidades do solo, nitrificação, simbiose, entre outros (RASCHE et al., 2006; BERG e SMALLA, 2009; EMBRAPA, 2012).

Na rizosfera ocorre maior concentração de nutrientes orgânicos oriundos das raízes, que propiciam o desenvolvimento da microbiota. As raízes da planta exercem influência através da liberação de células mortas, mucilagens, exsudatos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, enzimas e outros compostos (MELO e AZEVEDO, 2008). Assim, as alterações promovidas pela planta surtem efeito direto sobre os micro-organismos presentes na rizosfera, de maneira que desempenham um importante papel no crescimento da planta hospedeira. Processos microbianos importantes que ocorrem na rizosfera incluem: patogênese, fitossanidade, produção de antibióticos, ciclo geoquímico de minerais e de colonização da planta (KENT e TRIPLETT, 2002).

As vias de sinalização permitem que as bactérias recebam uma grande diversidade de sinais das plantas, como por exemplo, responder a uma infecção bacteriana ou coordenar a expressão do gene de determinada bactéria (FAURE et al., 2009). Muitas dessas associações são espécie-específicas, portanto, cada espécie de planta pode mostrar uma diversidade microbiana (NIMNOI et al., 2011; TORRES-CORTÉS et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2010).

A diversidade microbiana em amostras ambientais não é totalmente conhecida e por este motivo, técnicas moleculares tem sido cada vez mais aplicadas em laboratórios no estudo destes micro-organismos (RANJARD et al., 2000).

3.3. *Caesalpinia pyramidalis* Tul.

A *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Figura 3.2) é uma espécie de planta pertencente à família Fabaceae, subfamília *Caesalpinioideae* e gênero *Caesalpinia* L. (POLHILL, 1994). É caracterizada pela ausência de espinhos, geralmente com 4-6 metros de altura, podendo atingir até 12 metros. Esta planta geralmente chega à esta altura quando localizada em ambientes onde ocorre um bom suprimento aquoso e solos profundos, apresentando caule retilíneo. Já em ambientes mais secos e solos rasos chegam a 0,80-1,00 m de altura e apresenta caule tortuoso. Sua casca, quando adulta, apresenta-se na cor cinza-clara, castanho com manchas de cor amarela ou verde e branca. (MAIA, 2004).

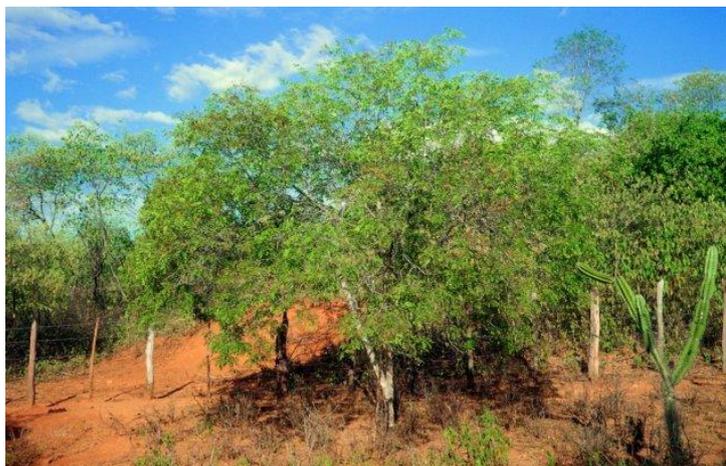


Figura 3.2 - *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Catingueira), do Bioma Caatinga.

Fonte: <<http://belezadacaatinga.blogspot.com.br/2011/08/catingueira-caesalpinia-pyramidalis-tul.html>>

É um espécie com ampla dispersão no semi-árido nordestino, com ocorrência nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte, Alagoas, Piauí, Bahia, Paraíba, Ceará e Sergipe (SILVA et al., 2009).

Esta planta, que é considerada uma das mais endêmicas na caatinga, é conhecida popularmente como catingueira, farinha-seca ou catinga-de-porco, tem sido utilizada para diversos fins, como para a produção de lenha e carvão pela população de Serra Talhada e Sertânia, em Pernambuco (MAIA, 2004; OLIVEIRA e SCOLFORO, 2008; GIULIETTI et al., 2004).

As cascas da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. vem sendo cada vez mais explorada por populações locais, para o tratamento de processos diarreicos e em disenterias, enquanto que as flores, amarelas e dispostas em cachos, é popularmente utilizada no tratamento de infecções respiratórias (BRAGA, 1960). Diversos estudos comprovam que esta espécie ainda possui ação anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (SANTANA et al., 2012; DA SILVA et al., 2011; SALVAT et al., 2004).

3.4. O SOLO E SUA BIODIVERSIDADE

O solo é considerado um ambiente bastante importante tanto para a natureza quanto para os seres humanos, pois é ele que fornece boa parte dos alimentos e atua como sistema natural, cumprindo um importante papel no ciclo da água e dos nutrientes. Além disto, o solo é o habitat natural de plantas, animais, seres humanos e uma série de outros organismos (MELO e AZEVEDO, 2008).

Este sistema é altamente complexo e caracterizado por uma variedade de processos físicos, químicos e biológicos, que são frequentemente influenciados por fatores ambientais. Os micro-organismos que habitam o solo e, em conjunto com as enzimas extracelulares, a mesofauna e macrofauna do solo conduzem todas as reações metabólicas conhecidas (ALEF E NANNIPIERRI, 1995). O solo é um ambiente de intensa atividade microbiológica, constituindo um habitat com intensa variedade de espécies. É neste local que se encontra diferentes funções, interações, fisiologia e nutrição, onde se destaca uma grande diversidade microbiológica que se apresenta com maior intensidade em condições tropicais. Nos trópicos, várias espécies de micro-organismos são de ocorrência geral, sendo encontradas em todas as amostras de solos, enquanto muitas espécies são restritas a ambientes específicos (MICHEREFF et al., 2005).

Alguns estudos relatam que em apenas uma grama de solo pode ocorrer cerca de 2000 a 8,3 milhões de bactérias, das quais uma parcela significativa corresponde a bactérias não cultiváveis (GANS et al., 2005; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2006; MELO e AZEVEDO, 2008).

É evidente que os processos biológicos são de extrema importância na função dos agroecossistemas, pois os micro-organismos além de contribuir de forma eficaz na complexa estrutura do solo, auxiliam no crescimento da planta atuando como competidores contra micro-organismos exógenos, patógenos e predadores. Essa microbiota também desempenha um papel importante na decomposição da matéria orgânica do solo e nos ciclos de nutrientes, e, desse modo, a atividade microbiana torna-se fator crucial na manutenção da fertilidade do solo (MELO e AZEVEDO, 2008; ALEF E NANNIPIERRI, 1995).

Michereff e colaboradores (2005) descrevem as bactérias, actinobactérias e fungos como consumidores primários, ao mesmo tempo que servem de alimentos para diversos animais. Dos micro-organismos que habitam o solo, é possível observar algumas características, como por exemplo, os fungos ocorrem mais facilmente em ambientes ácidos; algumas bactérias fixadoras do nitrogênio só são encontradas em solos com pH acima de 6,0, enquanto bactérias como *Beijerinckia* só ocorrem em solos tropicais úmidos e sujeitos a alagamentos, sendo favorecidas pela presença de ferro solúvel e de alumínio neste local. Já as actinobactérias são mais predominantes em solos orgânicos com pH neutro a ligeiramente alcalinos. Além disso, as actinobactérias podem ser encontradas em solos bem drenados (como solos calcários arenosos, ou recoberto por rochedos calcários), onde possivelmente as condições sejam mais aeróbias do que em solos alagadiços (MADIGAN et al., 2010).

As Actinobactérias produzem uma grande variedade e diversidade de compostos bioativos que inibem o desenvolvimento de patógenos no solo (SHARMA et al., 2005). Os gêneros de actinobactérias mais comuns e mais importantes na microbiologia do solo são: *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Nocardia*, *Nocardiosis*, *Micromonospora* e *Thermoactinomyces* (LECHEVALIER, 1981). Como as actinobactérias são encontradas facilmente no solo, elas produzem substâncias que atuam na degradação de moléculas complexas, como as substâncias recalcitrantes principalmente lignocelulose, celulose, hemiceluloses e lignina, que desempenham um papel importante no processo de decomposição da matéria orgânica do solo (PETROSYAN et al., 2003; DING et al., 2004).

Entre as actinobactérias, o gênero *Streptomyces* é o de maior ocorrência no solo e corresponde aproximadamente a 90% dos isolados. Além disso, são potentes produtores de moléculas bioativas como enzimas, anti-inflamatórios, antibióticos e antitumorais. No entanto, outros gêneros também são significativos, pois diversas outras espécies já foram isoladas confirmando que não só os *Streptomyces* são capazes de produzir novos metabólitos secundários (BIBB, 2005).

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do planeta, sendo, portanto, um foco de grande interesse internacional. Para impedir a “biopirataria”, uma série de discussões sobre a implementação de regras que possibilitem sua utilização econômica da forma mais apropriada vem surgindo a fim de assegurar o controle da exploração de forma sustentável. Esse tema deve ser avaliado com grande atenção pela comunidade científica, pelos órgãos governamentais e pela sociedade, para que seja preservado o direito a propriedade intelectual e que a bioprospecção de micro-organismos realmente traga benefícios sociais e econômicos para o país (MELO e AZEVEDO, 2008).

3.5. ACTINOBACTÉRIAS

Segundo Williams (1989), Ferdinando Cohn, em 1875, foi quem primeiro descreveu o micro-organismo que hoje nós conhecemos como *Streptomyces*. Aquele pesquisador observou células filamentosas que denominou de *Streptotrix* o que significa “cabelo enrolado” e em 1916 o grupo de Actinomycetes foi reconhecido oficialmente como *Actinomycetales* por Buchaman (1916). Entretanto foi Waksman e Henrice em 1943 quem primeiro classificou os *Actinomycetales* em três grupos principais: 1) *Mycobacterium*; 2) *Actinomyces* anaeróbio; *Nocardia* aeróbia e 3) *Streptomyces* e *Micromonospora* os quais são aeróbios oxidativos de grande importância para a biotecnologia. Waksman, em 1943, sugeriu o nome *Streptomyces* que significa “fungo enrolado” e favorecia a idéia de actinobactéria como um grupo intermediário entre fungo e bactéria, sendo atualmente o gênero de maior importância para a biotecnologia que é responsável por 70% dos antibióticos de uso clínico (DEMAIN, 1999).

As Actinobactérias correspondem a um importante grupo de bactérias Gram-positivas, caracterizadas por um alto conteúdo de Guanina e Citosina (G+C). São capazes de formar hifas, que se ramificam formando o micélio. Estas hifas podem se diferenciar e formar cadeia de esporos, como ocorre no gênero *Streptomyces*. (KONEMAN et al., 2008; PELCZAR JR et al., 1997; MADIGAN et al., 2010). É possível que estes micro-organismos tenham desenvolvido estas estruturas com a finalidade de obter suprimentos nutricionais a partir de vegetais rígidos. As actinobactérias produzem micélio aéreo e utilizam esta estrutura para fixação e penetração em tecidos vegetais, podendo liberar enzimas que degradam compostos essenciais para sua nutrição (CHARTER, 2006).

As Actinobactérias desenvolvem esporos, que consiste na principal forma de multiplicação, onde em cada esporo produzido é possível germinar e crescer um novo organismo (PELCZAR JR et al., 1997). Outra forma de reprodução seria a fragmentação dos filamentos bacilares e cocóides ou pela combinação de ambos os métodos. Os esporos quando presentes podem ser encontrados formando cadeias, aglomerados isolados ou no interior de esporângios (LACAZ et al., 2002).

Bactérias pertencentes a este filo são encontradas nos mais diversos ambientes como sedimentos oceânicos, plantas, associados com líquens e no solo (MINCER et al., 2002; VERMA et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 2005; VASCONCELLOS et al., 2010). As actinobactérias são caracterizadas pela ampla produção de metabólitos secundários, dentre eles enzimas, inibidores enzimáticos, e principalmente antibióticos, que frequentemente são utilizados na Agricultura, Medicina e Veterinária (INBAR et al., 2005).

De acordo com o banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2012), o gênero *Streptomyces* pertence à família *Streptomycetaceae*; subordem *Streptomyicineae*; ordem *Actinomycetales* e subclasse *Actinobacteridae*.

O gênero *Streptomyces* é o mais conhecido dentre as actinobactérias, pois abriga mais de 500 espécies já identificadas. Eles são comumente encontrados no solo, embora também possam ocorrer em ambientes aquáticos. São organismos aeróbios obrigatórios, que sintetizam compostos voláteis como a geosmina, que

confere ao solo o odor característico de terra molhada (TORTORA et al., 2011; MADIGAN et al., 2010). Seus filamentos possuem geralmente 0,5 – 1,2 µm de diâmetro, mais estreitas que as hifas de fungos, com comprimento indefinido e frequentemente sem septos. O crescimento ocorre nas extremidades da hifas, acompanhado de ramificações (MADIGAN et al., 2010; KONEMAN et al., 2008).

Inbar e colaboradores (2005) relatam que o gênero *Streptomyces*, com relação ao controle biológico de fitopatógenos, vem sendo o mais estudado pela grande diversidade de metabólitos secundários produzidos e também por sua capacidade competitiva por substratos.

3.5.1. MORFOLOGIA DOS *STREPTOMYCES* sp.

De acordo com o banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2012), o gênero *Streptomyces* pertence à família *Streptomycetaceae*; subordem *Streptomycineae*; ordem *Actinomycetales*; subclasse *Actinobacteridae* e classe *Actinobacteria*.

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (WILLIAMS et al., 1989), a morfologia é um fator importante na distinção entre *Streptomyces* e outras actinobactérias e na caracterização de espécies de *Streptomyces*. A caracterização microscópica deste gênero pode ser realizada através da microscopia do micélio aéreo, que forma cadeia de esporos, denominado esporóforos e/ou conidióforos, que podem ser retos, flexuosos, em forma de espirais com uma ou duas voltas ou longos espirais.

Algumas espécies de *Streptomyces* podem até serem confundidas com o gênero *Actinomadura* devido à presença de cadeias de esporos em pequenos espirais pouco desenvolvidos e pelo lento crescimento do micélio aéreo. A análise da parede celular por cromatografia em camada delgada determina a presença do ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP e L-DAP) (WILLIAMS et al., 1989).

O microcultivo permite a observação de uma série de características micromorfológicas tais como: ramificação, formação e arranjo da cadeia de esporos, permitindo a identificação em nível de gênero. Os esporos podem ser únicos, como

os encontrados em *Micromonospora* e *Thermomonospora*, em pares longitudinais como em *Microbispora*, e em cadeias de esporos como *Nocardia* e *Streptomyces* ou contidos dentro de um esporângio, como em *Actinoplanes* e *Streptosporangium* (BULL, 2004). Os isolados foram cultivados durante vinte dias, no mesmo meio e temperatura do isolamento.

Além da microscopia, a macromorfologia também tem considerável importância na identificação das actinobactérias. Características macroscópicas, tais como a pigmentação de esporos, micélio substratal e exopigmentos difusíveis, juntamente com a morfologia das colônias e textura do micélio aéreo, tem sido amplamente utilizado na classificação, identificação e muitas vezes estas variáveis tem valor taxonômico (WILLIAMS et al., 1989).

3.5.2. PAREDE CELULAR DAS ACTINOBACTÉRIAS

Estas bactérias filamentosas não possuem núcleo delimitado por membrana, não possuem organelas celulares, pois não são eucarióticas, e a parede celular é constituída por ácido murâmico, ácido diaminopimélico ou lisina (KONEMAN et al., 2008).

Para que se pudesse chegar à classificação atual das actinobactérias, diversos trabalhos foram realizados alguns deles servem como base sólida para este tema. O estudo foi inicialmente realizado pelo casal Lechevalier, que avaliaram a parede celular das actinobactérias através da hidrólise ácida e posterior análise cromatográfica. Este processo permitiu caracterizar os ácidos dicarboxílicos, bem como seus constituintes e ficou comprovado que cada actinobactéria contém o ácido diaminopimélico nas formas ácido L-diaminopimélico (L-DAP) ou ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), que são isômeros, ou seja, possuem a mesma fórmula estrutural (LACAZ, 2002).

Outros trabalhos como os realizados por Goodfellow e colaboradores (1976) e Hecht e Causey (1976), seguiram os mesmos parâmetros propostos por Lechevalier para também avaliar a composição da parede celular das actinobactérias. Todos eles relatam que além da presença do aminoácido dibásico, a parede celular

também é constituída por determinados açúcares. Baseado nisto, cada um destes autores agrupam as actinobactérias em diferentes tipos, como pode ser visto nas tabelas 3.1, 3.2 e 3.3.

Tabela 3.1 – Principais constituintes da parede celular das actinobactérias e sua relação com a taxonomia (LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1965).

Tipos da parede celular	Espécies	Principais constituintes detectados
I	<i>Streptomyces</i>	L-DAP, glicina
II	<i>Glycomyces</i>	Meso-DAP, glicina
III	<i>Actinomadura</i>	Meso-DAP, madurose
IV	<i>Nocardia</i>	Meso-DAP, arabinose, galactose

Tabela 3.2 – Principais constituintes da parede celular das actinobactérias e sua relação com a taxonomia (HECHT e CAUSEY, 1976).

Tipos da parede celular	Principais constituintes da parede celular	Principais constituintes (células totais)	Gênero
I	L-DAP(*), glicina	glicina	<i>Streptomyces</i>
			<i>Nocardiopsis</i>
II	Meso-DAP, glicina	Xilose, arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Meso-DAP (*)	Madurose (**)	<i>Actinomadura</i>
			<i>Dermatophilus</i>
			<i>Microbiospora</i>
			<i>Nocardiopsis</i>
			<i>Thermoactinomyces</i>
IV	Meso-DAP	Arabinose, galactose	<i>Geodermatophilus</i>
			<i>Nocardia</i>
			<i>Rhodococcus</i>
			<i>Corynebacterium</i>
			<i>Mycobacterium</i>
V	Lisina, ornitina	Ácido aspártico	<i>Actinomyces</i>
VI	Lisina, ácido aspártico, galactose		<i>Oerskovia</i>

(*) ácido diaminopimélico.

(**) 3-O-metil-D-galactose.

Tabela 3.3 – Principais constituintes da parede celular das actinobactérias e sua relação com a taxonomia (GOODFELLOW et al., 1976).

Tipos da parede celular	Espécies	Principais constituintes detectados
I	<i>Streptomyces</i>	L-DAP, glicina
II	<i>Micromonospora</i>	Meso-DAP, glicina; hidrox-DAP pode estar presente
III	<i>Actinomadura</i>	Meso-DAP
IV	<i>Nocardia</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Corynebacterium</i> (tipo-diphtheriae)	Meso-DAP, arabinose, galactose
V	<i>Actinomyces israelii</i>	Lisina, ornitina
VI	<i>Actinomyces bovis</i> <i>Rothia</i>	Lisina, ácido aspártico
VI + Gal.	<i>Oerskovia</i>	Lisina, galactose, ácido aspártico
VII	<i>Agromyces</i>	DAB, glicina
–	<i>Mycoplana</i>	Meso-DAP, numerosos aminoácidos

DAP: 2,6-ácido diaminopimélico.

DAB: 2,4-ácido diaminobutírico.

3.5.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As actinobactérias são micro-organismos produtores de inúmeros metabólitos secundários, dos quais muitos já foram isolados com sucesso, tendo como características a produção de importantes antibióticos com ampla aplicação médica, veterinária e farmacológica (NEVES e GAVA, 2008; RAJA e PRABAKARANA, 2011).

Alguns produtos do metabolismo secundário, como os antibióticos, são capazes de impedir o desenvolvimento de outros micro-organismos mesmo em pequenas concentrações. Estima-se que o grupo das actinobactérias seja responsável pela produção de cerca de 4.600 antibióticos já conhecidos, superando a produção de antibióticos por fungos e outras bactérias (LIMA et al., 2001). As vias biossintéticas de produção dos antibióticos foram evoluindo nas actinobactérias por cerca de um bilhão de anos (BALTZ, 2007).

De acordo com Williams e colaboradores (1989), metabólitos secundários são produzidos por determinados micro-organismos e não são essenciais para a multiplicação celular. Estes metabólitos são formados por rotas biossintéticas particulares decorrentes de produtos do metabolismo primário, originando uma grande variedade estrutural e ampla atividade biológica.

Ainda não está totalmente esclarecida a forma como ocorre esta biossíntese de metabólitos secundários, mas supostamente trata-se de um tipo de metabolismo alternativo como forma de defesa do organismo a um ambiente hostil, de caráter evolutivo e como estratégia de sobrevivência. Uma hipótese que explicaria a produção de antibióticos pelas actinobactérias seria que este mecanismo inibe o crescimento de outros organismos por competição pelos nutrientes limitados em determinado ambiente. Este fato permitiriam as actinobactérias completarem o processo de esporulação, formando uma estrutura dormente com maiores chances de sobrevivência (WILLIAMS et al., 1989; MADIGAN, 2010).

Os relatos do primeiro antibiótico produzido por um *Streptomyces* foi a estreptomicina, que foi publicado em 1945, por Waksman, Schatz e Bugie. Este antibiótico mostrou-se bastante eficaz contra a bactéria da tuberculose e também contra a meningite bacteriana. Em seguida, no ano de 1948, Lechevalier e Waksman, descobriram mais um novo antibiótico, a neomicina, e em 1953 a candicidina (DEMAIN, 2006).

Atualmente, mais de 500 antibióticos diferentes são produzidos por estreptomicetos, estimando-se que este número possa ser ainda maior. Destes, mais de 60 tem aplicação prática na indústria, agricultura, medicina e veterinária. O gênero *Streptomyces* é o mais conhecido entre as actinobactérias, é uma das bactérias mais facilmente isoladas do solo. As espécies de *Streptomyces* são muito valiosas, pois produzem a maioria dos antibióticos comerciais, dentre eles a estreptomicina (TORTORA, 2011; MADIGAN, 2010). Além das estreptomicinas, os *Streptomyces* são produtores de antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, novobiocina, vancomicina, e até mesmo antifúngicos, como nistatina e anfotericina B (LACAZ, 1965).

Estudos comprovam a atividade antibacteriana de *Streptomyces* frente a bactérias Gram-positivas como *S. aureus* e *Bacillus subtilis* e Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de leveduras como *Candida albicans* (THAKUR et al., 2007; LAIDI et al., 2008; SUTHINDHIRAN e KANNABIRAN, 2009) e até mesmo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (HIGGINBOTHAM e MURPHY, 2010). Estas bactérias estão frequentemente envolvidas em infecções nosocomiais ocorridas em diversas partes do mundo (VAN DER KOOI et al., 2010; LISBOA et al., 2007; HO et al., 2007).

Além de produzir diversos antibióticos, o gênero *Streptomyces* também produz enzimas como celulasas e xilanases, que atuam na degradação de matéria orgânica e de moléculas complexas, bem como em substâncias recalcitrantes, principalmente celulose, lignocelulose, hemicelulose e lignina. Além disso, todas as reações metabólicas conhecidas são realizadas a partir enzimas exocelulares, juntamente com auxílio da mesofauna e macrofauna do solo (DING et al., 2004). Charter (2006) relata que a capacidade dos *Streptomyces* se defenderem de concorrentes fúngicos através da liberação de quitinases, que agem prontamente na degradação de quitina, um dos principais constituintes da parede celular fúngica.

Sendo assim, faz-se necessário o estudo dos metabólitos bioativos de actinobactérias isoladas da Caatinga, pois se acredita se as condições extremas sejam ideais para produção de novas biomoléculas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO DE ACTINOBACTÉRIAS

A amostra de solo rizosférico (10 g) foi ressuspensa em 90 mL de tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) (ver Anexo), homogeneizada em vórtex por 20 minutos e incubada em Banho-maria a 50° C por 15 minutos. Em seguida a amostra foi submetida a diluições seriadas em solução de cloreto de sódio (até 10⁻⁵), seguido da inoculação de 0,1 mL das diluições de 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ na superfície de cada placa contendo 20 mL dos meios: AY modificado (AYm) (NOMOMURA e OHARA, 1969a); meio MC (NOMOMURA e OHARA, 1969b); e ISP-4 (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966) (Figura 4.1). Em todos os meios de cultura foi adicionado 100 µg/mL do antifúngico Nistatina. As placas foram incubadas em estufa BOD a temperatura de 37° C e 45° C durante 20 dias. A purificação das colônias foi realizada através do semeio em estrias no mesmo meio de cultura e condições de cultivo do isolamento.

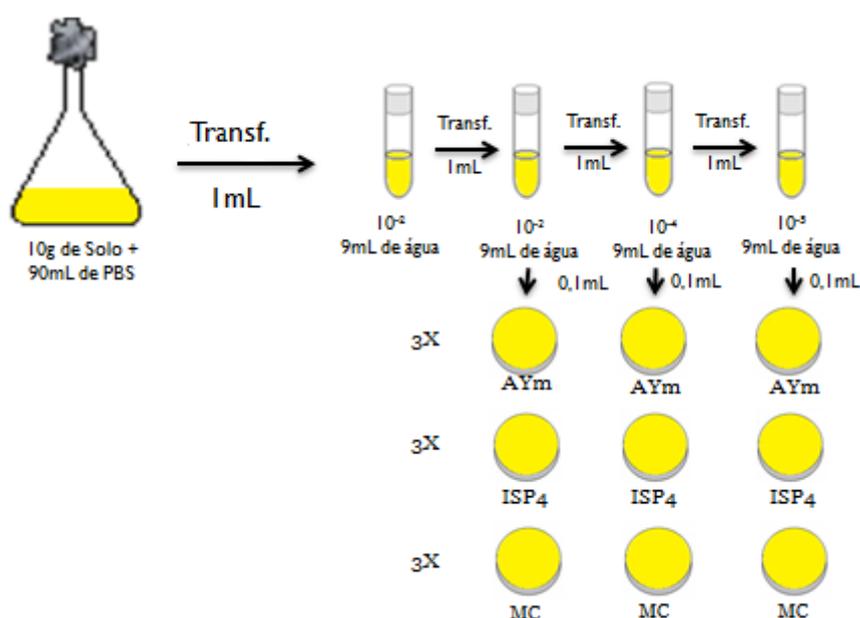


Figura 4.1 - Esquema do Isolamento das Actinobactérias. Fonte: O autor.

4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.2.1. ENSAIO PRIMÁRIO

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados, foi realizada a seleção primária segundo metodologia de Ichikawa e colaboradores (1971), conhecida como “Método do Bloco de Gelose” ou “Teste de difusão em Ágar” (Figura 4.2) onde o composto bioativo se difunde no ágar. Inicialmente suspensões de esporos das actinobactérias em soro fisiológico esterilizado, contendo 0,1% de Tween 80 foram submetidas à agitação em vórtex e 0,1 mL desta suspensão foi espalhada com alça de Drigalsky em cada placa de Petri contendo os meios AY modificado; meio MC ou ISP-4. O cultivo foi realizado durante cinco dias nas diferentes temperaturas (37° C e 45° C) para obtenção de um crescimento em forma de tapete. Após o crescimento, foram retirados blocos circulares de 8 mm de diâmetro com o auxílio de um perfurador esterilizado e transferidos para as placas contendo meio Müller Hinton (MH) (para bactérias) e Sabouraud (para fungos), dependendo do micro-organismo teste que foi previamente inoculado.

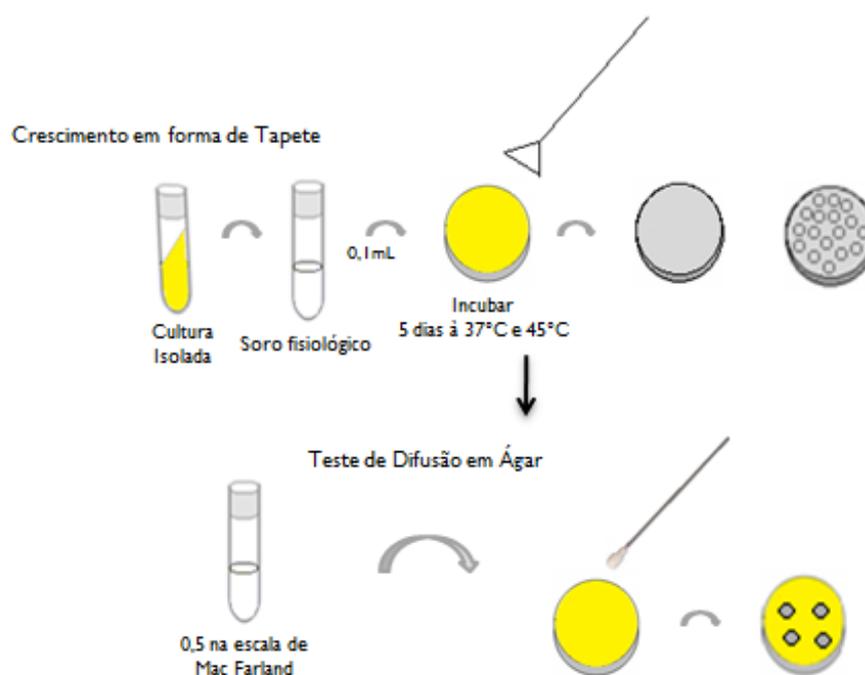


Figura 4.2 - Esquema da metodologia usada no teste do bloco de gelose. Fonte: O autor.

Para a atividade antimicrobiana, foram preparadas suspensões das bactérias com densidade de 0,5 da escala de McFarland e realizado o teste de difusão em Ágar, segundo Kirby e colaboradores (1966), utilizando os micro-organismos da Coleção de Microorganismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos (Tabela 4.1). O teste foi realizado em triplicata para todas as actinobactérias isoladas. As placas foram cultivadas a 37 °C por 24/48 horas para bactérias e leveduras e a 30 °C por 120 horas para fungo filamentoso. Após o período de cultivo o diâmetro dos halos foi medido (mm).

Tabela 4.1 - Micro-organismos testes utilizados para avaliação da Atividade Antimicrobiana.

Micro-organismos teste		
Fungos Filamentosos	<i>Fusarium moniliforme</i>	UFPEDA-2456
	<i>Malassezia furfur</i>	UFPEDA-1320
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	UFPEDA-1007
Bactérias Gram-positivas	<i>Bacillus subtilis</i>	UFPEDA-86
	<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA-02
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Resistente à meticilina)	UFPEDA-700
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	UFPEDA-224
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFPEDA-416
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFPEDA-396

4.2.2. ENSAIO SECUNDÁRIO

4.2.2.1. FERMENTAÇÃO

O pré-inóculo foi realizado através da transferência de blocos de gelose da actinobactéria para cada Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de diferentes meios de cultura líquido: ISP-4 (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966), AV modificado (NONOMURA e OHARA, 1969a), M1 e MPE (KAWAMURA, 1976), permanecendo sob agitação a 180 rpm por 48 horas à temperatura ambiente (LYRA et al., 1964).

A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 95 mL dos diferentes meios de cultura: ISP-4, AV modificado, M1 e MPE, os quais foram inoculados com 10% do pré-inóculo, seguido da agitação a 180 rpm, durante 120 h. A atividade antimicrobiana, pH, e peso da biomassa foi acompanhado a cada 24 horas. (LYRA et al., 1964).

4.2.2.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi realizada através do teste de difusão em ágar (item 4.2.1.), a cada 24 horas, utilizando discos de papel de 8 mm contendo 50 µL do líquido fermentado. As placas foram incubadas a 37° C, por 24/48 horas para bactérias e leveduras e durante 120 horas para fungos filamentosos (LYRA et al., 1964).

4.3. EXTRAÇÃO DO ANTIBIÓTICO

4.3.1. SEPARAÇÃO DA MASSA CELULAR

Após determinação das melhores condições de produção do antibiótico, foi realizada a extração do princípio ativo da biomassa e do líquido metabólico. Inicialmente, o líquido metabólico foi separado da massa celular por centrifugação a 10.000 rpm e posteriormente, filtrado á vácuo (LYRA et al., 1964).

4.3.2. EXTRAÇÃO DO ANTIBIÓTICO – BIOMASSA

A extração do princípio ativo da biomassa foi realizada com solventes miscíveis em água (etanol, metanol e acetona) a pH 2,0, 7,0 e 9,0, na proporção 1:10 (g/mL) sob agitação durante 1 hora em agitador mecânico e filtrados para separação do extrato. Em seguida, o pH dos solventes e do líquido metabólico foram reajustados para 7,0 e realizado o teste de difusão em ágar utilizando-se discos de papel embebidos com o extrato e com o líquido metabólico (controle positivo) frente aos micro-organismos testes que apresentaram sensibilidade no ensaio primário (item 4.2.1). A partir deste teste, foi possível verificar qual solvente melhor extraiu o antibiótico pela análise dos halos de inibição comparando com o halo de inibição do líquido metabólico controle (LYRA et al., 1964).

4.3.3. EXTRAÇÃO DO ANTIBIÓTICO – LÍQUIDO METABÓLICO

Para extração do antibiótico do líquido metabólico foram utilizados solventes não miscíveis em água (acetato de etila, clorofórmio e éter etílico) e o líquido metabólico foi ajustado para pH 2,0; 7,0 e 9,0. Em seguida cada solvente foi adicionado na proporção de 1:2 seguido de agitação por 15 a 20 minutos. Após

agitação, os extratos dos solventes foram separados em funil de decantação e o líquido metabólico esgotado foi reajustado para pH 7,0 e realizado o teste de difusão em ágar utilizando-se discos de papel embebidos com 50 µL de cada extrato, do solvente e de cada líquido metabólico esgotado, frente aos microorganismos testes. Esse teste selecionou o solvente que melhor extraiu o antibiótico pela análise dos halos de inibição em relação ao controle positivo (LYRA et al., 1964).

4.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

Para estudar melhor a ação dos metabólitos bioativos presentes na biomassa e no líquido metabólico foi realizada a determinação a concentração mínima inibitória, prospecção química e bioautografia dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico da actinobactéria que apresentou os melhores resultados nos testes de atividade antimicrobiano. Os extratos brutos foram obtidos através de uma nova fermentação em maior escala, extração com etanol (biomassa) e acetato de etila (líquido metabólico), seguido da rotaevaporação dos solventes para obtenção do extrato bruto concentrado.

4.4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA

A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição em placas multipoços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Foram distribuídos 100 µL de meio de cultura líquido (MH) nos poços e em seguida, adicionados 100 µL de cada amostra nos poços da coluna 1 e realizada a microdiluição sucessivamente até a coluna 10, obtendo-se concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 µg/mL), quando preciso esses produtos foram diluídos ainda mais. Após diluição, cada poço foi inoculado com 10 µL do inóculo microbiano padronizado, sendo a coluna 11 o controle positivo do inóculo. Os poços da coluna 12 não receberam o inóculo, sendo

assim, o controle de esterilidade do meio. As microplacas foram cultivadas a 37 °C por 18-24 horas (Figura 4.3).

Para comparar a atividade antimicrobiana foi utilizado o padrão oxacilina que apresenta um MIC entre 32 a 0,5 µL/mL para bactérias.

4.4.2. LEITURA DA MICROPLACA

Após o cultivo, as microplacas foram reveladas com 15 µL de resazurina a 0,01% e incubadas por 1-3 horas para observar a mudança de coloração nos poços (Figura 4.3). A resazurina é um corante indicador de óxido-redução, onde a manutenção da cor azul é interpretada como inibição do crescimento microbiano, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, ocorrência de crescimento. A CMI é definida como a menor concentração do antibiótico que inibe parcialmente o crescimento do micro-organismo teste. Enquanto que a CMB é definida como a menor concentração do antibiótico que mata 99,9% o micro-organismo utilizado no teste, dentro de um período de tempo definido (CLSI, 2010). A CMB foi determinada pelo subcultivo dos poços azuis em placa de Petri contendo o meio MH sólido, incubada a 37 °C, por 24 horas (Figura 4.4). Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes.

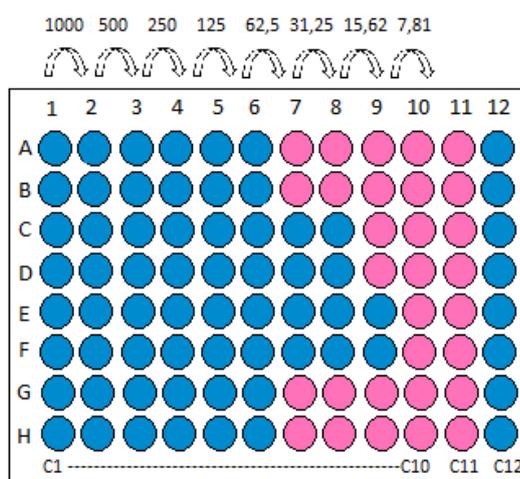


Figura 4.3: Determinação da Concentração Mínima Inibitória dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico do *Streptomyces gougerotii* pela técnica de microdiluição. C1-C10 (microdiluição); C11 (controle positivo) e C12 (controle de esterilidade do meio). Fonte: O autor.

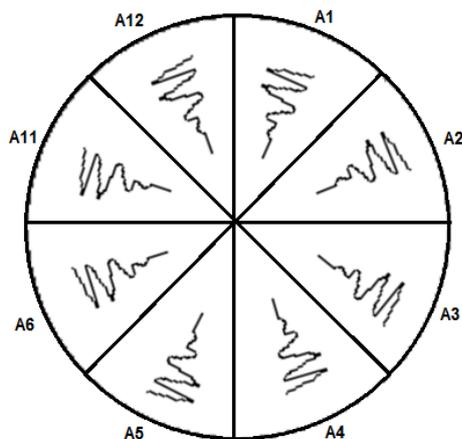


FIGURA 4.4: Determinação da Concentração Mínima Bacteriostática dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico de *Streptomyces gougerotii*, pela subcultura dos poços da microdiluição. Repique dos poços da C1-C6 e C11-C12 da linha A da microplaca. Fonte: O autor.

4.5. PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

Alíquotas de 10 μL de cada extrato (extratos brutos etanólico da biomassa e do acetato de etila do líquido metabólico) foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio TLC contendo Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck), 60mm x 100mm. Para a identificação das classes de metabólitos secundários foram utilizados diversas fases móveis e reveladores específicos (HARBORNE, 1998; METZ, 1961; ROBERTSON et al., 1956; SHARMA; DAWRA, 1991; WAGNER; BLADT, 1996). Os cromatogramas migraram em cubas previamente saturadas. A Tabela 5.1 apresenta as condições experimentais da prospecção química dos extratos.

Tabela 5.1. Condições cromatográficas da prospecção química dos metabólitos secundários produzidos pelo *Streptomyces gougerotii*.

Metabólitos	Sistema de		
	Migração	Revelador	Referência
Alcalóides	A	Dragendorff	Wagner e Bladt (1996)
Açúcares redutores	D	TTZ	Metz (1961)
Flavanóides	A	NEU	Wagner e Bladt (1996)
Taninos Hidrolizáveis	A	NEU	Wagner e Bladt (1996)
Triterpenos	e	Lieberman-	Sharma e Dawra
Esteróides	B	Burchard	(1991)
Mono/Sequiterpenos	C	Vanilina Sulfúrica	Wagner e Bladt (1996)
Proantocianidina	A	Vanilina Clorídrica	Wagner e Bladt (1996)

A. Acetato de etila - Ácido acético - Ácido fórmico - Água (100:11:11:26, v/v); **B.** Tolueno - Acetato de etila (80:20, v/v); **C.** Tolueno - Acetato de etila (97:3, v/v), **D.** Acetona - n-Butanol - Tampão fosfato pH 5,0 (5:4:1, v/v).

Os metabólitos secundários podem ser detectados pela presença das seguintes reações:

- Alcalóides são evidenciados por bandas laranja após revelação com Dragendorff e o padrão utilizado foi pilocarpina.
- Açúcares redutores são evidenciados após revelação com solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTZ) e aquecimento. Os padrões utilizados foram soluções de arabinose, glicose, sacarose e maltose.
- Para compostos fenólicos há presença de bandas com fluorescência levemente azulada e flavanóides, bandas laranja a vermelho quando revelados com o reagente de NEU (Difenilboriloxietilamina 1% em EtOH) e analisada em UV. O padrão utilizado foi quercetina.
- Taninos hidrolisáveis são evidenciados por manchas de coloração rósea após revelação com solução de vanilina clorídrica, comparando-se com os padrões de ácido elágico e ácido gálico.
- Em triterpenos e esteróides há presença de bandas marrons a azuladas após revelação com o reagente de Lieberman-Burchard e aquecimento, os padrões utilizados foram ácido ursólico, β -amirina e β -sitosterol.

- Monoterpenos e sesquiterpenos são evidenciados por manchas de coloração azul escura após revelação com solução de vanilina sulfúrica, comparando-se com o padrão timol.

4.6. BIOAUTOGRAFIA

A fração antimicrobiana foi determinada baseando-se na técnica CCD Bioautografia (SRIDHAR et al., 2003; SCHER et al., 2004). Foram aplicados 10 µL do extrato bruto da biomassa e do líquido metabólico em placa de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) utilizando o sistema de solventes CHCl₃:MeOH (9:1, v/v). Após a corrida cromatográfica foi realizada a revelação biológica aplicando sobre a placa o meio de cultura MH fundido, inoculado com uma suspensão de *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 com densidade de 0,5 na escala de Mac Farland e incubada a 37°C por 24 horas. Após este período, a cromatoplaça foi revelada com uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (20 mg/mL) e reincubada a 37°C por 2-4 horas. A revelação mostra halos de inibição de crescimento marcados por coloração amarelada e facilmente identificados em fundo vermelho. A região da placa onde o micro-organismo não se desenvolveu foi identificada e denominada fração ativa.

4.7. IDENTIFICAÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS

4.7.1. CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA

As actinobactérias isoladas do solo rizosférico da planta *Caesalpinia pyramidalis* Tul. foram selecionados para caracterização taxonômica, a nível de gênero, de acordo com a metodologia descrita por Furtado (2001), obedecendo as seguintes etapas:

- A) Análise micromorfológica
- B) Hidrólise da parede celular
- C) Cromatografia em camada delgada (CCD)

A) Análise Micromorfológica

A análise micromorfológica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Shirling e Gottlieb (1966). A linhagem foi cultivada através da técnica de “cultura em lâmina” nos meios sólidos AY modificado, Meio MC e ISP-4, incubada a temperatura de 37 °C ou 45 °C por 15 dias para observação das características micromorfológicas de cada actinobactéria através da microscopia ótica. O cultivo foi realizado em placas de Petri, com estrias largas e lamínulas foram parcialmente inseridas nas estrias, em posição inclinada, formando um ângulo de aproximadamente 45° para observação microscópica do micélio aéreo sobre a superfície das mesmas. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas e observadas ao microscópio óptico (Figura 4.5).

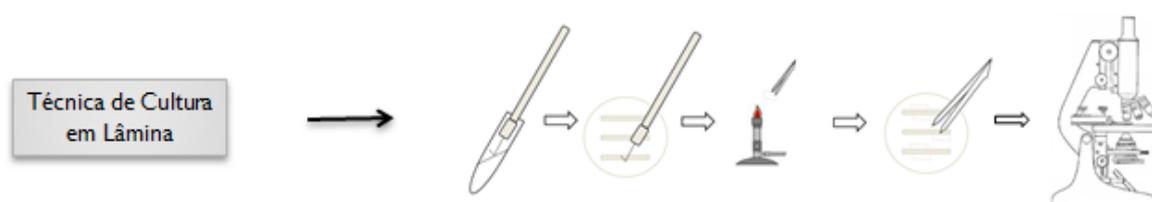


Figura 4.5 – Técnica do microcultivo para identificação das Actinobactérias. Fonte: O autor.

B) Hidrólise da parede celular

A análise da parede celular das actinobactérias foi realizada através da avaliação dos isômeros do ácido diaminopimélico (DAP), LL- ou meso-DAP, de acordo com a metodologia descrita por Stanek e Roberts (1974). Cada actinobactéria foi cultivada em meio ISP-2 líquido, sob agitação, na temperatura de 30 °C por 72 horas. Em seguida foi realizada uma filtração à vácuo com papel de filtro e a biomassa foi seca em estufa a 50°C por 2 horas. Para realizar a hidrólise da parede celular, 30 mg da biomassa seca foi transferida para um tubo de ensaio com tampa rosqueável, adicionado 1mL de HCL 6N e levado a estufa a 100°C por 16h.

Após a hidrólise, o material insolúvel foi removido utilizando um Eppendorf furado contendo lã de vidro e lavado com 1 mL de água destilada. O filtrado foi transferido para balão de fundo redondo e levado ao rotaevaporador para a retirada de todo o ácido remanescente. Esta etapa foi repetida até eliminação total do ácido. O material livre do ácido, foi retomado em 0,1 mL de água destilada por mg de material, e realizada a corrida em cromatografia por camada delgada (CCD).

C) Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada do hidrolisado da parede celular foi realizada para identificação do isômero do ácido diaminopimérico (LL-DAP ou Meso-DAP) presente na parede celular de actinobactérias. A fase móvel foi constituída por metanol-água-ácido clorídrico 6N-piridina (80:26:4:10, v/v) e a fase fixa por placas de celulose (Merck nº 5716, 20X20). Na fase fixa foram aplicadas, 2 µL do ácido diaminopimérico padrão (DAP) a 0,19% (m/v), 2 µL das amostras-padrão de *Streptomyces regensis* (DAUFPE-3053) e *Nocardia asteroides* (DAUFPE-3503), que apresentam os isômeros LL-DAP e Meso-DAP, respectivamente. A cuba foi previamente saturada por 2h e a corrida ocorreu por aproximadamente 5 h. Quando o “front” do solvente atingiu o topo da placa, a mesma foi colocada para secar e posteriormente foi borrifada com uma solução de ninhidrina a 0,2% (p/v), seguida de aquecimento a 100°C por 5 minutos para visualização dos isômeros de DAP (LL-DAP e meso-DAP). A comparação dos valores dos R_{fs} obtidos permitiu a diferenciação entre os dois gêneros (LECHEVALIER, 1979).

4.7.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Duas actinobactérias que apresentaram os melhores resultados na fermentação foram selecionadas para realizar a identificação taxonômica molecular em nível de espécie.

Foi realizada extração do DNA total segundo a metodologia de Sambrook e colaboradores (1989), seguido da amplificação do gene DNA 16S. A extração de DNA das actinobactérias foi realizada a partir de culturas cultivadas em meio líquido,

seguida da centrifugação e extração do DNA através do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para avaliação da integridade do DNA. Em seguida, foi realizada a amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos universais para Eubacteria fD1 (5'-AGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGGAACG-3') (WEISBURG et al., 1991).

As amplificações foram realizadas em volume final de 50 µL contendo 10 a 50 ng de DNA, 5 pmols de cada oligonucleotídeo, 200 µM de dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, 1X tampão, 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies). A reação de PCR foi realizada em termociclador programado para realizar desnaturação inicial 94° C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94°C/30 s, 63°C/1 min e 72° C/7 min, respectivamente). Após a amplificação, 5 µL da reação de PCR foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v) a 3 volts/cm-1 em tampão TBE 1x e corado com Sybr safe (Invitrogen Life Technology). O produto de amplificação foi sequenciado e a sequência comparada com todas as sequências no Genbank, utilizando o software Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências foram alinhadas usando o software Clustal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO DAS ACTINOBACTÉRIAS

Foram isoladas 68 linhagens de actinobactérias da rizosfera da planta Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.), nativa do Bioma Caatinga, sendo 52,9% (36) na temperatura de 37 °C e 47,05% (32) na temperatura de 45 °C (Figura 5.1-A), onde 77,5% (53) foram provenientes da diluição 10^{-3} , 16,18% (11) da diluição 10^{-4} e 5,88% (4) da diluição 10^{-5} .

Os resultados mostraram que os meios utilizados foram eficazes para o isolamento de actinobactérias da rizosfera da Catingueira, sendo possível verificar que o meio AY modificado obteve um maior número de colônias de actinobactérias em relação aos outros meios de cultura utilizados quando cultivado a 45° C (Figura 5.1).

A partir deste isolamento foi possível constatar que o meio de cultura que apresentou o maior número de colônias foi o MC, com um total de 60,3% (41) dos isolados, enquanto no meio ISP-4 foram isolados 23,5% (16), e no meio AY modificado um total de 16,2% (11) (Figura 5.2-B).

Comparando as duas temperaturas de isolamento (37 °C e 45 °C) foi observado que a maioria das actinobactérias foram isoladas a 37 °C. No meio MC 32,4 % (22) foram isoladas à temperatura de 37 °C e 27,9 % (19) à temperatura de 45 °C, enquanto que no meio ISP-4 17,6% (12) foram isoladas a 37°C e 5,88% (4) a 45°C. A maior incidência de actinobactérias no meio AY modificado ocorreu na temperatura de 45°C, onde 2,9% (2) foram isoladas a 37°C e 13,2% (9) a 45°C.

Vasconcellos e colaboradores (2010) ao realizarem investigação sobre bioprospecção do solo rizosférico de *Araucaria angustifolia* relataram a diluição de 10^{-3} como uma das mais adequadas para o isolamento, resultando uma média de dez colônias por placa. No entanto, o número de contaminantes foi maior quando comparadas com a diluição 10^{-4} , semelhante a este estudo que observou também que o pré-tratamento a 50°C, não mostrou grande eficácia o que dificultou o isolamento e purificação das actinobactérias (Figura 5.1,b).

Estes resultados também estão de acordo com Claessen e colaboradores (2006), ao relatarem que este grupo de bactérias filamentosas do solo constitui uma proporção considerável que ocorrem na proporção de $10^4 - 10^6$ esporos de actinobactérias por grama de solo, desempenhando um papel fundamental na mineralização da matéria orgânica.

Rahman e colaboradores (2011) quando isolaram actinobactérias do solo de Rajshahi, em Bangladesh, observaram que o número máximo de colônias de actinobactérias isoladas por diluição seriada a partir de 100 mg/mL de solo foi de $1,45 \times 10^6$ UFC/g de solo, similar ao isolamento adotado no presente estudo.

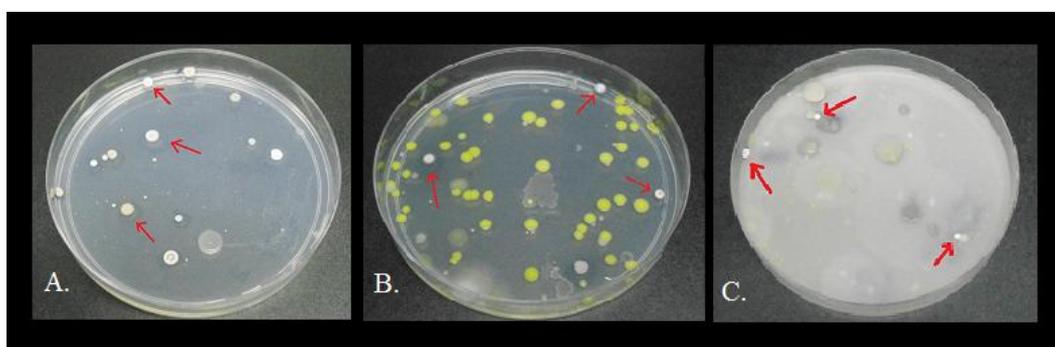


Figura 5.1 - Colônias de actinobactérias nas diluições 10^{-3} : (A) meio MC, (B) AYm e (C) ISP-4. Fonte: O autor.

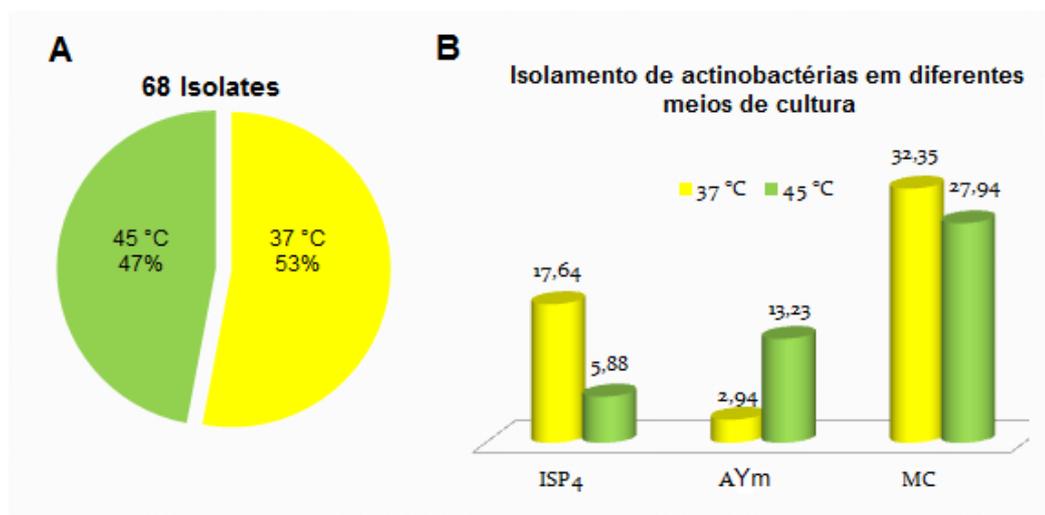


Figura 5.2 - A) Número de isolados a 37°C e 45°C; (B) Isolamento e percentual de actinobactérias em diferentes meios de cultura a 37°C e 45°C. Fonte: O autor.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS

5.2.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A identificação das actinobactérias em nível de gênero foi realizada através da técnica taxonômica clássica (microcultivo) que consiste em avaliar a micromorfologia dos tipos de esporóforos por microscopia óptica, além da avaliação fenotípica das actinobactérias, analisando a cor do micélio aéreo e vegetativo, bem como a produção de pigmentos (Figura 5.3).

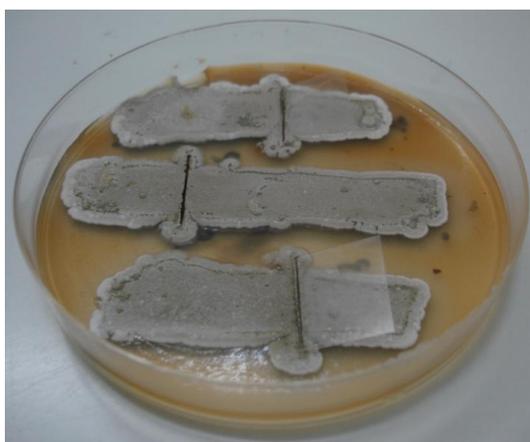


Figura 5.3 - Microcultivo da linhagem C1.52 no meio AY modificado. Fonte: O autor.

A avaliação das características macroscópicas das 68 linhagens mostrou que em 36 linhagens isoladas a 37°C a coloração predominante do micélio aéreo foi de diferentes tonalidades de cinza para 50% (18) dos isolados, seguido de 30,6% (11) com micélio marrom e 19,4% (7) micélio branco. Também houve predominância de micélio aéreo cinza para 84,4% (27) nas 32 linhagens isoladas a 45°C, seguido de 12,5% (4) com micélio branco e 3,1% (1) apresentou micélio marrom (Figura 5.4). Foi observada também a liberação de pigmentos em 26,47% (18) dos 68 isolados (Figura 5.5).

Rahman e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antibacteriana de actinobactérias isoladas do solo de Rajshahi (Bangladesh) e relataram que tons

variados de cinza predominaram entre as actinobactérias isoladas, seguido dos tons de marrom, branco, laranja e vermelho. Entretanto, o local de isolamento não influencia a cor do micélio aéreo e sim a composição dos nutrientes utilizados em cada meio.

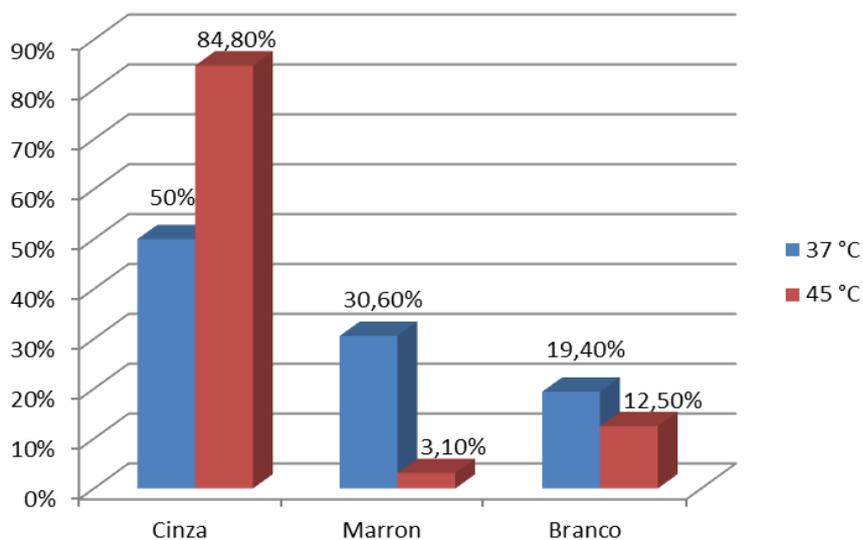


Figura 5.4 - Porcentagem das diferentes colorações do micélio aéreo das actinobactérias isoladas.

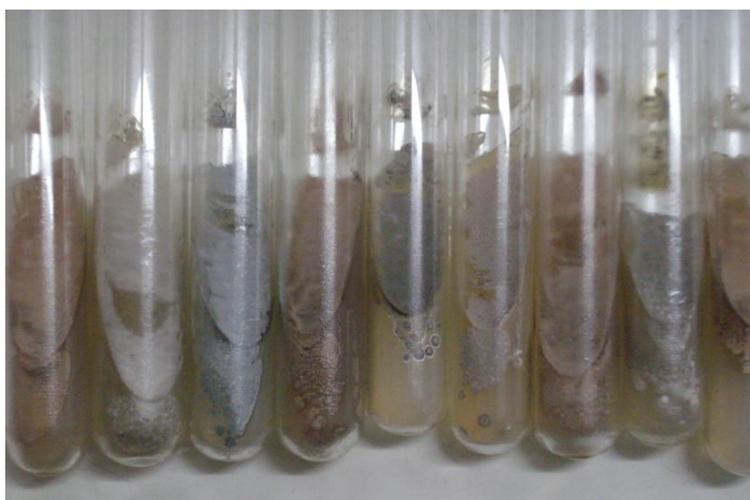


Figura 5.5 - Diferentes colorações do micélio aéreo das actinobactérias isoladas da rizosfera da Caatinga. Fonte: O autor.

Segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (WILLIAMS et al.,1989) as actinobactérias são bactérias Gram-positivas, que formam longos

filamentos finos ramificados e que podem originar cadeias de esporos em forma de espirais longas, curtas ou verticiladas, como foi observado na micromorfologia dos isolados em estudo.

A avaliação da micromorfologia mostrou que todas as 68 actinobactérias isoladas indicam pertencer ao gênero *Streptomyces* por apresentarem esporóforos curtos e espiralados na microscopia ótica (Figura 5.6-A,B), enquanto que outros apresentaram pequenas cadeias de esporos retas e ligeiramente encurvadas (Figura 5.6-C,D). A análise da presença de LL-DAP confirmou que estes isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*.

A predominância do gênero *Streptomyces* no solo justifica-se por ser um grupo de actinobactérias que não apresenta muitas exigências nutricionais. Outros gêneros de actinobactérias podem ser isolados utilizando meios de cultura mais complexos, com mais fontes de carbono ou nitrogênio ou até mesmo em temperatura diferente da utilizada neste estudo. Sanchez e Demain (2002) afirmam que a fonte de carbono utilizada no experimento pode interferir no crescimento e na produção do metabólito bioativo. A predominância do gênero *Streptomyces* em solo, também tem sido relatado por inúmeros pesquisadores em todo o mundo (VIJAYAKUMAR et al., 2007; CEYLAN, OKMEN, UGUR, 2008; VELHO-PEREIRA e KAMAT, 2012).

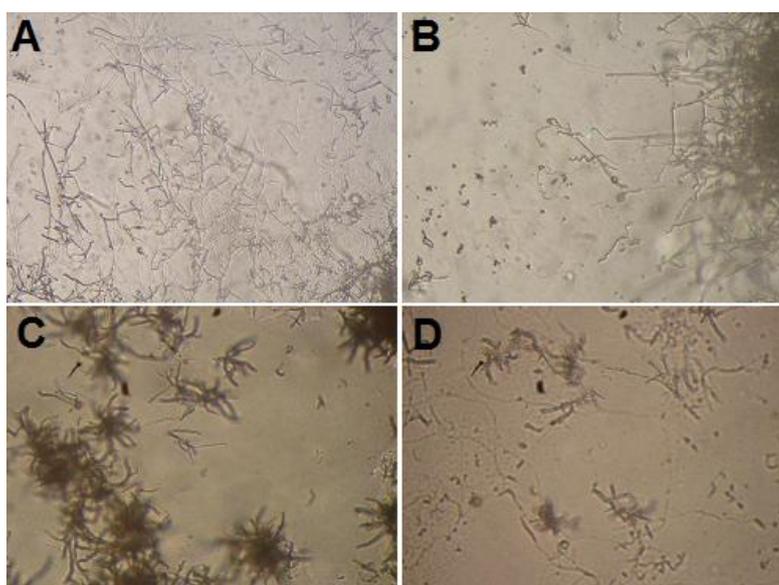


Figura 5.6 - Micromorfologia dos gêneros investigados por microscopia ótica (40x). (A), (B), (C) e (D) indicam as diferentes morfologias em que *Streptomyces* sp. podem apresentar. Fonte: O autor.

5.2.2. AVALIAÇÃO DA PAREDE CELULAR

A observação micromorfológica das actinobactérias permitiu a identificação em nível de gênero de grande parte dos isolados. A análise microscópica mostrou micélio aéreo com longas cadeias de conídios em forma de espirais, quando cultivados sobre a superfície da lamínula, indicando que as actinobactérias pertencem, provavelmente, ao gênero *Streptomyces*. A identificação foi confirmada pela identificação do isômero LL-DAP, por cromatografia em camada delgada segundo a metodologia de Stanek e Roberts (1974). Pôde ser observado o R_f do ácido diaminopimélico (DAP) presente na parede celular de *Streptomyces* na forma LL-DAP e da forma *meso*-DAP em *Nocardia*.

Sêmedo e colaboradores (2001) realizaram a caracterização de actinobactérias isoladas de solo tropical brasileiro, utilizando a técnica cromatográfica para detecção do ácido diaminopimélico a partir do hidrolisado de células com HCl 6N, onde puderam diferenciar, assim como no nosso estudo, actinobactérias que continham em sua composição a forma LL-DAP (*Streptomyces*) da forma *meso*-DAP (*Amycolatopsis*).

A mesma técnica foi utilizada por Reddy e colaboradores (2011) para avaliar a quimiotaxonomia de uma actinobactéria isolada de solo agrícola da região de Hyderabad, Andhra Pradesh, sul da Índia. A estirpe continha ácido LL-diaminopimélico na parede celular e não os açúcares característicos, indicando que esta actinobactéria exibe parede tipo I, ou seja, L-DAP. O isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Streptomyces* e posteriormente, a espécie foi caracterizada por técnica molecular. A quimiotaxonomia juntamente com as propriedades morfológicas permitem a identificação de isolados em nível de gênero.

5.2.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Foi realizada a caracterização molecular de duas actinobactérias que apresentaram ampla atividade antimicrobiana. O DNA genômico foi extraído a partir de uma cultura pura da actinobactéria e posteriormente foi realizada a eletroforese

em gel de agarose para avaliação da integridade do DNA. As sequências obtidas foram eficientemente amplificadas através da técnica da PCR, conforme descrito no item 4.7.2.

A caracterização molecular, baseia-se na investigação de parte da sequência do gene 16S rDNA, em bactérias, e 18S rDNA para fungos, seguida da amplificação por PCR e posterior caracterização através da análise por eletroforese, obtendo-se assim, um perfil da comunidade microbiana. A análise do DNA ribossomal amplificado tem sido bastante utilizada na identificação de diferentes comunidades microbianas em diversos tipos de ambientes, inclusive o solo (O'DONNELL e GÖRES, 1999; PETERS et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2005).

Suthindhiran e Kannabiran (2009) também utilizaram a técnica de PCR para amplificar a região 16S do DNAr e identificar actinobactérias provenientes de sedimentos marinhos na Baía de Bengal na Índia que apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica frente a diferentes micro-organismos testes como *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *A. niger* e *A. fumigatus*.

As sequências obtidas foram analisadas através do Genbank do NCBI. O micro-organismo previamente chamado de C1.128 foi identificado como *Streptomyces coeruleorubidus*, por apresentar 92% de similaridade com o *Streptomyces coeruleorubidus* NBRC 12761 em um fragmento de 1.543 pb. Este micro-organismo tem sido relatado por Kumar e colaboradores (2012) como potentes produtores de metabólitos secundários bioativos, com atividade comprovada frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A natureza complexa destes compostos indica que estes poderão ser utilizados como potentes agentes terapêuticos para o tratamento das doenças emergentes desafiantes.

Já o micro-organismo C1.129 foi identificado como *Streptomyces gougerotii*, por apresentar 95% de similaridade com o *Streptomyces gougerotii* MJM 7542 em um fragmento de 1.649 pb. Kanzaki e colaboradores (1962) relatam que este micro-organismo é produtor da Gougerotina, um antibiótico de amplo espectro e solúvel em água, que foi isolado por trabalhadores da Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japão. A literatura é escassa quanto ao conhecimento sobre este micro-organismo, o que torna nosso trabalho pioneiro neste assunto, uma vez que esta actinobactéria tem se mostrado grande produtora de metabólitos bioativos para bactérias Gram-positivas, conforme descrito no item 5.3.

Mincer e colaboradores (2002) identificaram actinobactérias oriundas de sedimentos oceânicos, como *Micromonospora olivasterospora* (97,1 a 97,7% de similaridade), *Verrucosispora gifhornensis* (96,8 a 97,4% de similaridade) e *Catenuloplanes japonicus* (96,3 a 97,0% de similaridade), por técnicas moleculares através do sequenciamento da amplificação da região 16S do DNAr. A técnica que também foi utilizada no nosso estudo permitiu a identificação das actinobactérias com uma alta porcentagem de similaridade com aquelas cadastradas no Genbank.

Reddy e colaboradores (2011) identificaram uma actinobactéria isolada de solo agrícola de Andhra Pradesh, sul da Índia, através de técnicas quimiotaconômicas e moleculares. A identificação molecular foi realizada pela amplificação da região 16S do DNAr. Assim como no nosso trabalho, foi possível construir a árvore filogenética com base na sequência de genes amplificados, relacionando o tipo da cepa com outras espécies do gênero *Streptomyces*, bem como avaliar a similaridade das mesmas. O isolado apresentou similaridade com *Streptomyces pactum* NBRC 13433T (99,0%), *Streptomyces olivaceus* NBRC 12805T (99,0%) e *Streptomyces parvulus* NBRC 13193T (98,8%), sendo identificada como uma nova espécie, o *Streptomyces hyderabadensis*.

5.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1. ENSAIO PRIMÁRIO

A atividade antimicrobiana foi realizada com 68 actinobactérias isoladas, através do Teste de Difusão em Ágar, frente a diferentes micro-organismos. Este teste de antagonismo permitiu que o metabólito secundário produzido pela actinobactéria em meio sólido se difundisse no meio de cultura inibindo o crescimento do micro-organismo teste. A presença do metabólito secundário ativo proporcionou a formação de um halo transparente ao redor do disco, cujo diâmetro indicou o potencial antimicrobiano, frente a determinado micro-organismo teste.

Os resultados obtidos mostram que as actinobactérias apresentaram um amplo espectro de ação com atividade para bactérias (Gram-positivas) e fungos (filamentoso e leveduriforme), como pode ser observado na Figura 5.7.

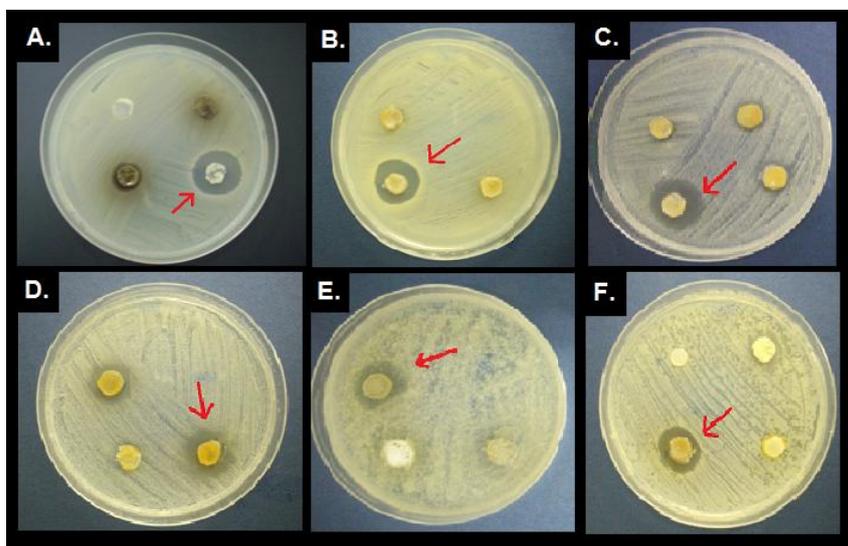


Figura 5.7 – Halo de inibição do bloco de gelose de algumas actinobactérias. (A) Halo de inibição de *Streptomyces coeruleorubidus* para o *S. aureus* (UFPEDA-02), (B) *Streptomyces gougerotii* para *S. aureus* - MRSA (UFPEDA-700), (C) Actinobactéria C1.48 para *C. albicans* (UFPEDA-1007), (D) Actinobactéria C1.125 para *C. albicans* (UFPEDA-1007), (E) Actinobactéria C1.124 para *F. moniliforme* (UFPEDA-2456); (F) Actinobactéria C1.98 para *B. subtilis* (UFPEDA-86). Fonte: O autor.

Os resultados da atividade antimicrobiana do teste do bloco de gelose, utilizando actinobactérias isoladas em diferentes temperaturas, revelaram que das 68 actinobactérias isoladas, apenas 16% (11) apresentaram atividade antimicrobiana contra alguns dos micro-organismos testes, enquanto que 84% não mostraram atividade antimicrobiana (Figura 5.8-A). Quanto à temperatura de isolamento das actinobactérias, foi possível constatar que das 36 linhagens isoladas a 37°C, 25% (8) apresentaram halos de inibição superior a 15 mm, enquanto que das 32 linhagens isoladas a 45°C, apenas 9,4% (3) mostraram atividade antimicrobiana similar (Figura 5.8-B). Os resultados apresentados na Figura 5.9 mostram o percentual de actinobactérias com atividade para os micro-organismos testados.

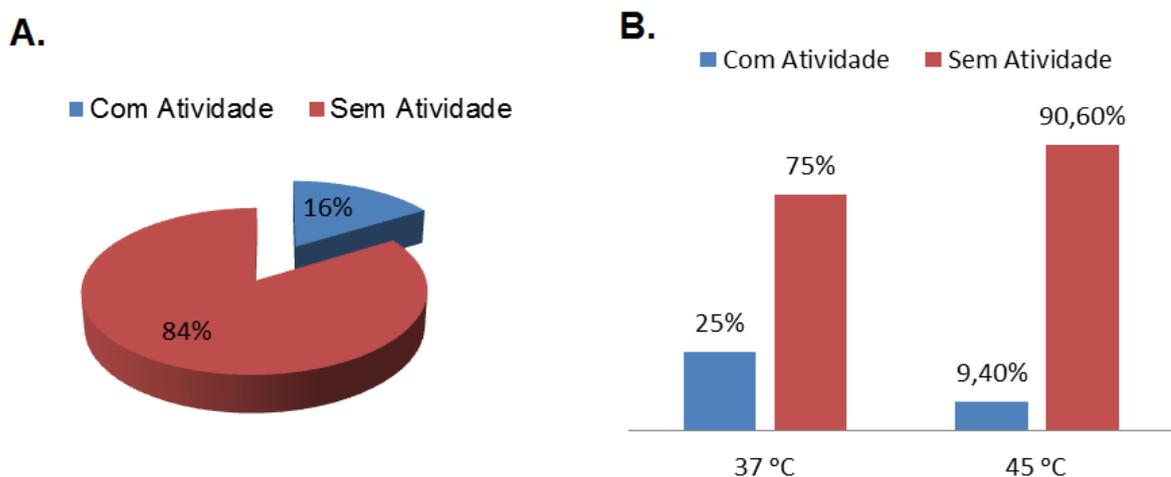


Figura 5.8 – (A) Porcentagem das actinobactérias com atividade antimicrobiana, (B) Porcentagem das actinobactérias com atividade antimicrobiana nas diferentes temperaturas de isolamento.

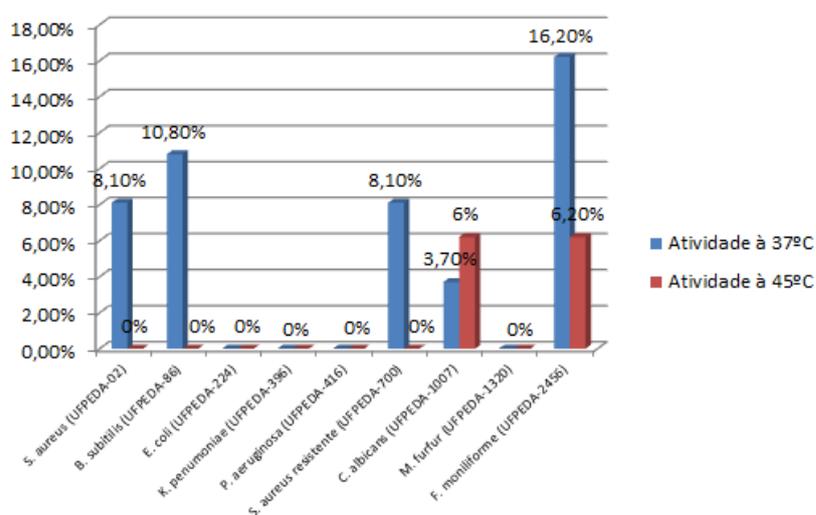


Figura 5.9 - Porcentagem de actinobactérias com atividade antimicrobiana.

Estudos realizados com actinobactérias provenientes de solo Egípcio e de sedimento marinho da Baía de Bengal na Índia mostraram boa atividade antimicrobiana frente a alguns micro-organismos testes como *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* (LAIDI et al., 2008; SUTHINDHIRAN e KANNABIRAN, 2009).

Zhao et al (2009) realizaram teste de difusão em ágar de actinobactérias isoladas de sedimentos marinhos e comprovaram que algumas estirpes em pesquisa apresentaram amplo espectro de atividade antimicrobiana. Alguns isolados apresentaram atividade fungicida, enquanto outros apresentaram atividade contra

Pseudomonas aeruginosa, *S. aureus* e *B. subtilis*, com halos de até 22 mm, 30 mm, 25 mm e 26 mm respectivamente.

Higginbotham e Murphy (2010) avaliando a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* isolados de solo Cambojano mostraram que os isolados apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Semelhante a este estudo, o *Streptomyces* relatado por Higginbotham e Murphy (2010) apresentou um bom espectro de ação frente a um *S. aureus* MRSA mostrando também, halos de até 22 mm de diâmetro.

Os outros isolados que não apresentaram atividade antimicrobiana em meio sólido, ainda podem produzir antibióticos. Matsuura (2004) enfatiza que a porcentagem de carbono no meio ou a concentração de amido são fatores que podem influenciar na produção do metabólito secundário, por isso não podemos afirmar categoricamente que estes isolados não produzem antibiótico. Novos ensaios poderão ser realizados utilizando novos meios de cultura, além de outros micro-organismos testes, com o objetivo de detectar a atividade antibiótica.

Dentre os isolados que apresentaram halos de inibição acima de 15 mm frente aos micro-organismos testes, foram selecionados seis melhores para realização do Ensaio secundário.

5.3.2. ENSAIO SECUNDÁRIO

A fermentação busca determinar as melhores condições de crescimento da actinobactéria, bem como o melhor meio e tempo, para a produção do antibiótico. Os meios testados M1, MPE, AY modificado e ISP-4, foram inoculados e acompanhado o pH, atividade antimicrobiana e biomassa, a cada 24 horas, durante 120 horas. Foi realizada a fermentação de seis actinobactérias que apresentaram os maiores halos no Teste do Bloco de Gelose. No entanto, apenas duas apresentaram resultados satisfatórios (halos > 15 mm) frente aos micro-organismos testes, enquanto as outras quatro não apresentaram halos de inibição relevantes (halos < 10 mm). Os *Streptomyces coeruleorubidus* e *Streptomyces gougerotii* apresentaram boa atividade frente à *S. aureus* (UFPEDA-02), *B. subtilis* (UFPEDA-86) e *S. aureus* MRSA (UFPEDA-700) (Figura 5.10).

Thakur e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* em solos de áreas florestais na Índia e observaram que também houve um percentual elevado de inibição contra bactérias Gram-positivas, enquanto que as Gram-negativas foram menos inibidas. A maior ocorrência de inibição de Gram-positivas ocorre pelo fato da parede celular destas bactérias serem constituídas por 90% peptidoglicanos, diferentemente da parede das Gram-negativas que são bem mais complexas fazendo com que estas sejam mais resistentes à ação de antibióticos (TRABULSI et al., 2005).

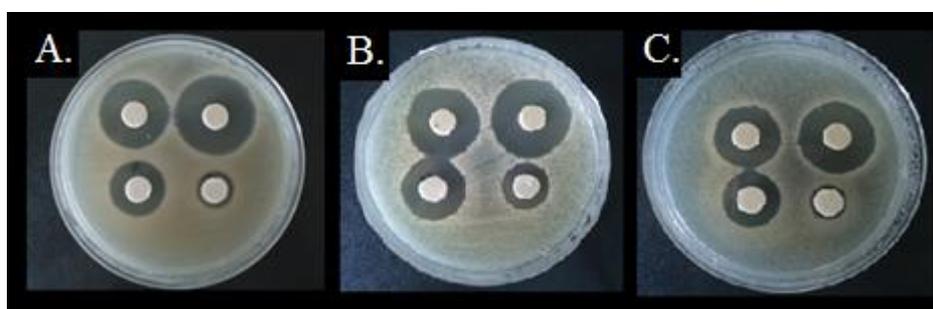


Figura 5.10 – Halo de inibição do *Streptomyces gougerotii* após 72 horas de fermentação: *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B) e *S. aureus* MRSA (UFPEDA-700) (C).
Fonte: O autor.

O diâmetro dos halos verificados a cada 24 horas, possibilitou determinar o melhor meio e tempo de fermentação do isolado. Meios de cultura como o M1 e o MPE, que possuem fonte de carbono entre 20% e 15% na sua composição, foram os que apresentaram maior produção de metabólitos bioativos. Os meios que permitiram maior produção do metabólito secundário foi o MPE para o *Streptomyces coeruleorubidus* (Figura 5.11) e o M1 para *Streptomyces gougerotii* (Figura 5.12), com grande atividade frente aos micro-organismos testes *S. aureus* (UFPEDA-02), *B. subtilis* (UFPEDA-86), *S. aureus* MRSA (UFPEDA-700). É importante observar que a fonte de carbono pode interferir na produção do metabólito pela repressão de enzimas biossintéticas, como enfatizado por Sanchez e Demain (2002). Os resultados apresentados nas figuras 5.11 e 5.12 mostram que o melhor tempo de produção do metabólito secundário foi de 96 horas, onde foram observados os maiores halos de inibição, sendo este tempo determinado para extrair o antibiótico.

Foi observado também que a biomassa formada foi maior nos meios MPE e ISP-4, em pH variante entre 6,0 e 7,0 após 72 horas de fermentação (Apêndices C e D).

Cunha e colaboradores (2009) determinaram a influência dos meios de cultura ISP-2, ISP-2M, MPE, MPEM e MA na produção de metabólitos bioativos de uma bactéria endofítica e verificaram que os melhores meios foram ISP-2 e ISP-2M, frente à *B. subtilis* e baixa atividade nos meios MPE e M1 com halos acima de 17 mm de diâmetro, indicando um bom espectro de ação. Entretanto, no presente trabalho foram observados diâmetros maiores, aproximadamente 28 mm, o que indica que o meio M1 foi o melhor para produção de metabólitos bioativos, mostrando a importância de ser realizado testes em diferentes meios de cultura para a extração do antibiótico.

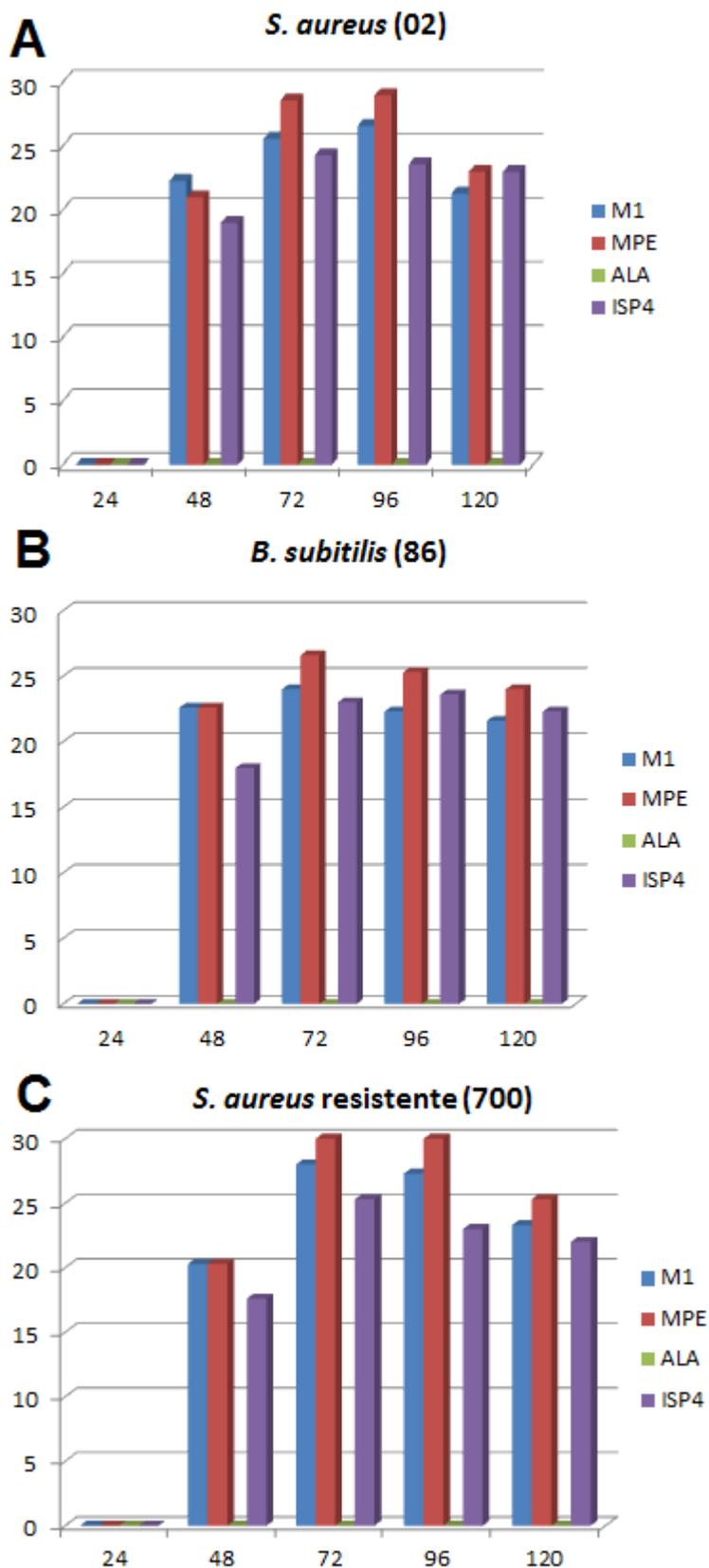


Figura 5.11 - Halos de inibição para *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B), *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C), da fermentação de *Streptomyces coeruleorubidus* em diferentes meios de cultura durante 120 horas.

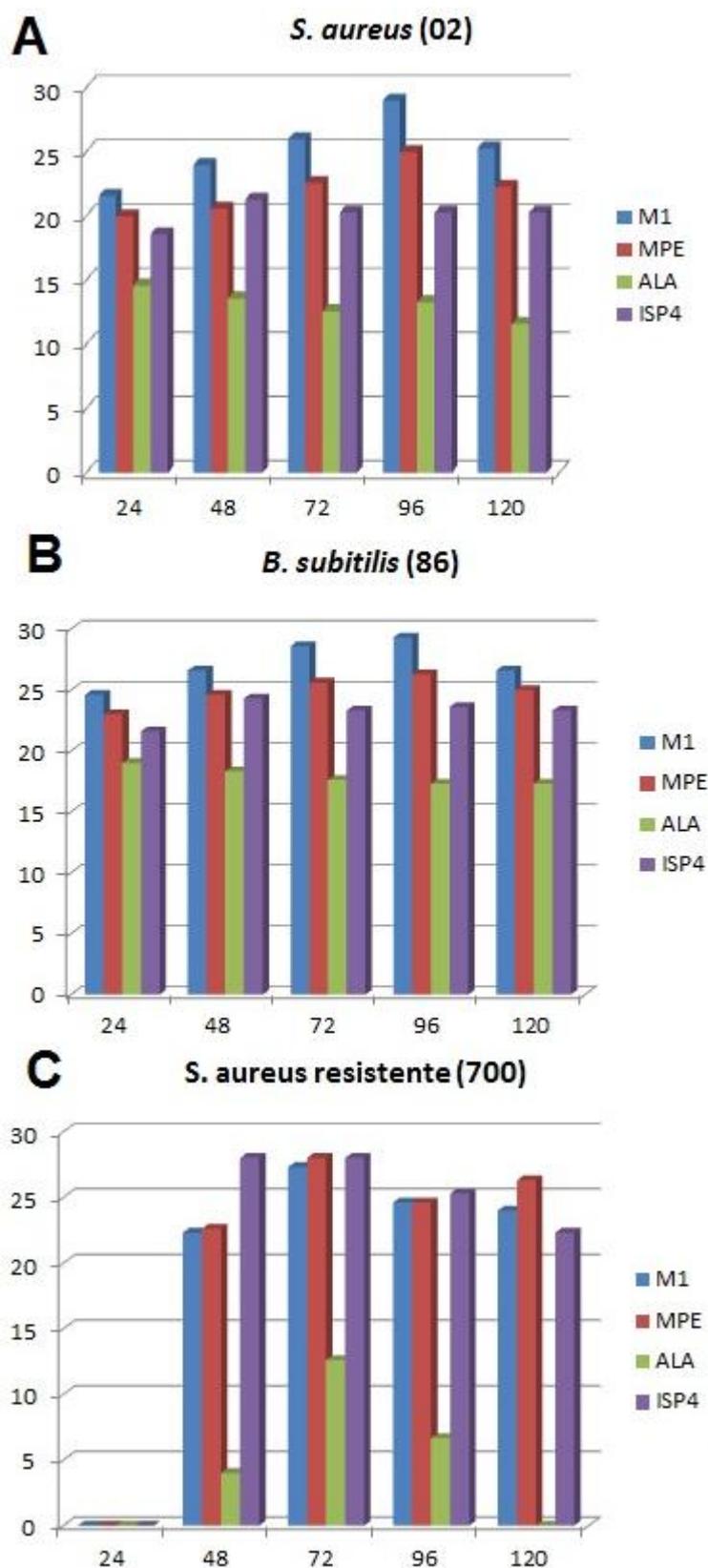


Figura 5.12 - Halos de inibição para *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B), *S. aureus-MRSA* (UFPEDA-700) (C), da fermentação do *Streptomyces gougerotii* em diferentes meios de cultura durante 120 horas.

Pfefferle e colaboradores (2000) relatam que a maioria dos metabólitos secundários, como os antibióticos, são produzidos por espécies geneticamente distintas e também através de diferentes vias metabólicas, podendo assim, as condições ambientais serem fatores altamente significativos para alterações na produção de antibióticos durante a fermentação. Parâmetros envolvidos no processo de fermentação tais como pH, temperatura, composição nutricional do meio e o tempo de fermentação, devem ser determinados para quantificar os metabólitos secundários produzidos pela linhagem isolada.

5.4. EXTRAÇÃO

5.4.1. EXTRAÇÃO DO ANTIBIÓTICO - BIOMASSA E LÍQUIDO METABÓLICO

Após a determinação do melhor tempo de fermentação cada linhagem foi fermentada e submetida a extração do princípio ativo da biomassa com solventes miscíveis em água e do líquido metabólico com solventes não miscíveis em água e em diferentes pHs.

Os resultados apresentados na Tabela 5.2 mostra que acetona foi o solvente que melhor extraiu o metabólito bioativo da biomassa de *Streptomyces coeruleorubidus* apresentando halos de 10 a 12,6 mm frente a *S. aureus* e *B. subtilis* (Figura 5.13). No entanto, para o *Streptomyces gougerotii* o etanol foi o que apresentou os melhores resultados (Tabela 5.4), com halos de inibição acima de 20 mm para diferentes micro-organismos testes: *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. aureus*-MRSA (Figura 5.14).

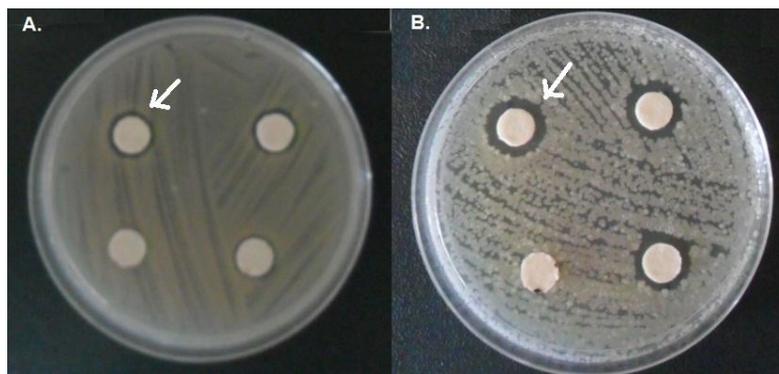


Figura 5.13 – Halo de inibição do extrato acetônico da biomassa do *Streptomyces coeruleorubidus* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A) e *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B). As setas indicam o halo do extrato em pH 7. Fonte: O autor.

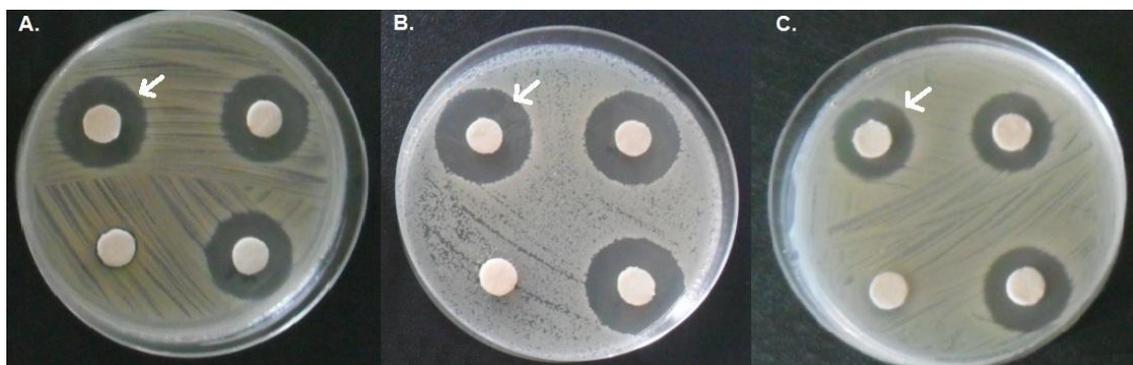


Figura 5.14 – Halo de inibição do extrato etanólico da biomassa do *Streptomyces gougerotii* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B) e *S. aureus-MRSA* (UFPEDA-700) (C). As setas indicam o halo do extrato em pH 7. Fonte: O autor.

Para extração do antibiótico do líquido metabólico, o solvente que melhor extraiu o metabólito bioativo foi o acetato de etila, tanto para o *Streptomyces coeruleorubidus* como para o *Streptomyces gougerotii* (Tabela 5.3 e Tabela 5.5). O líquido metabólico apresentou bom espectro de ação, com halos de inibição de até 27 mm de diâmetro frente aos micro-organismos testes utilizados (Figura 5.15 e Figura 5.16).

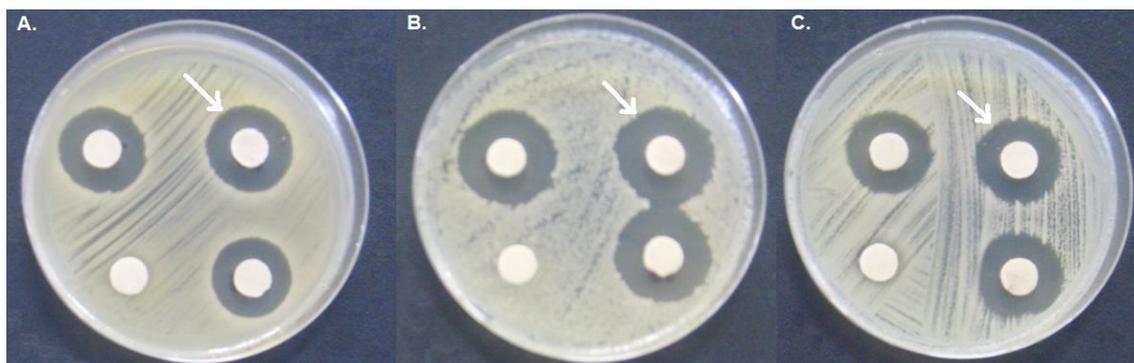


Figura 5.15 – Halos de inibição do extrato acetato de etila do líquido metabólico de *Streptomyces coeruleorubidus* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B) e *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C). As setas indicam o halo do extrato em pH 7. Fonte: O autor.

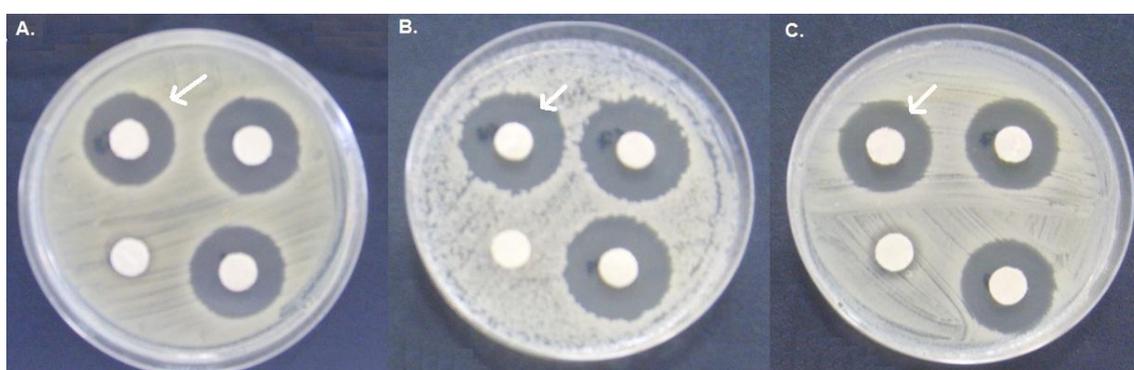


Figura 5.16 – Halos de inibição do extrato de acetato de etila do líquido metabólico de *Streptomyces gougerotii* frente a *S. aureus* (UFPEDA-02) (A), *B. subtilis* (UFPEDA-86) (B) e *S. aureus*-MRSA (UFPEDA-700) (C). As setas indicam o halo do extrato em pH 7. Fonte: O autor.

O potencial hidrogeniônico para extração do metabólito bioativo é importante para determinar se o antibiótico tem caráter ácido, neutro ou alcalino. O pH 7,0 foi a condição mais indicada, uma vez que os melhores halos foram observados neste pH.

Krishnaveni e colaboradores (2011) utilizaram acetona para extração de metabólitos bioativos da massa micelial e clorofórmio para o líquido metabólico da fermentação de *Streptomyces noursei*. Em concordância com os nossos estudos, os extratos brutos da linhagem de *Streptomyces noursei* exibiram atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas, dentre estas, alguns isolados clínicos resistentes.

Vimal, Rajan, Kannabiran (2009), que avaliaram a atividade antimicrobiana de uma actinobactéria marinha pertencente ao gênero *Nocardiopsis*, realizaram extração do metabólito bioativo do líquido metabólico adotando os mesmos solventes selecionados para este estudo, o clorofórmio, acetato de etila e éter de petróleo. A eficiência da extração foi comprovada mediante testes antimicrobianos, de modo que o extrato de éter de petróleo obtido a partir do isolado mostrou atividade antimicrobiana significativa contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, o extrato de acetato de etila mostrou também atividade antifúngica e o extrato de clorofórmio apresentou ser eficaz contra leveduras.

Deepa, Gowthami, Kumar (2011) avaliaram diferentes solventes para extração de moléculas bioativas de actinobactérias isoladas do solo, como n-butanol, n-hexano, acetato de etila, clorofórmio, benzeno e xileno. Dentre tais solventes, o n-butanol e o acetato de etila foram os únicos que extraíram do líquido metabólico, substâncias com característica antimicótica. Outro estudo realizado por Arasu e colaboradores (2009) utilizando hexano, clorofórmio, acetato de etila e outros solventes, mostraram que o clorofórmio e o acetato de etila foram capazes de extrair o metabólito bioativo produzido por um *Streptomyces* sp., apresentando atividade antibacteriana e antifúngica, enquanto que o extrato do hexano apresentou atividade contra *Xanthomonas* e *C. albicans*.

Desse modo, o acetato de etila mostrou ser um solvente eficaz para extração de metabólitos bioativos produzidos por diferentes actinobactérias, conservando a boa atividade antimicrobiana e estudos realizados com tal solvente corroboram com os nossos estudos em desenvolvimento (ARASU et al., 2009; VIMAL, RAJAN, KANNABIRAN, 2009; DEEPA, GOWTHAMI, KUMAR, 2011).

O *Streptomyces gougerotii* apresentou os melhores resultados nos teste de atividade antimicrobiano. Sendo assim, esta actinobactéria foi selecionada para realização da atividade antimicrobiana, prospecção química e bioautografia, a partir do seu extrato bruto da biomassa e do extrato bruto do líquido metabólico.

Tabela 5.2 - Resultado da extração do metabólito ativo da biomassa de *Streptomyces coeruleorubidus*.

	UFPEDA-02		UFPEDA-86	
	Média dos Halos	Desvio Padrão	Média dos Halos	Desvio Padrão
BIOMASSA - ACETONA PH 2	12,21	0,27	14,06	0,62
BIOMASSA - ACETONA PH 7	12,25	0,42	13,81	0,40
BIOMASSA - ACETONA PH 9	11,82	0,82	13,77	0,91
ACETONA	0	0	0	0
BIOMASSA - ETANOL PH 2	12,14	0,18	14,53	0,80
BIOMASSA - ETANOL PH 7	11,07	0,10	12,3	0,47
BIOMASSA - ETANOL PH 9	10,71	0,40	12,45	0,79
ETANOL	0	0	0	0
BIOMASSA - METANOL PH 2	0	0	10,51	0,29
BIOMASSA - METANOL PH 7	0	0	11,11	0,40
BIOMASSA - METANOL PH 9	0	0	11,73	1,14
METANOL	0	0	0	0

Tabela 5.3 - Resultado da extração do metabólito ativo do líquido metabólico de *Streptomyces coeruleorubidus*.

	UFPEDA-02		UFPEDA-86		UFPEDA-700	
	Média dos Halos	Desvio Padrão	Média dos Halos	Desvio Padrão	Média dos Halos	Desvio Padrão
LME - ACETATO DE ETILA PH2	13,89	0,44	17,07	0,88	9,04	6,39
EXT - ACETATO DE ETILA PH2	21,19	0,59	24,67	0,91	20,66	1,45
LME - ACETATO DE ETILA PH7	12,48	0,14	17,08	2,64	14,02	1,05
EXT - ACETATO DE ETILA PH7	22,34	0,45	25,23	0,233	20,82	1,00
LME - ACETATO DE ETILA PH9	13,44	0,75	15,69	0,80	14,10	1,19
EXT - ACETATO DE ETILA PH9	21,83	0,43	24,79	0,32	20,48	1,42
ACETATO DE ETILA	0	0	0	0	0	0
LME - CLOROFORMIO PH2	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH2	20,97	0,30	23,61	0,35	20,31	0,65
LME - CLOROFORMIO PH7	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH7	20,25	0,60	23,44	0,26	20,91	0,53
LME - CLOROFÓRMIO PH9	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH9	15,71	0,39	18,00	0,72	13,45	0,79
CLOROFÓRMIO	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER ETÍLICO PH2	18,20	3,34	17,77	0,47	13,78	0,43
EXT - ÉTER ETÍLICO PH2	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER ETÍLICO PH7	18,27	0,56	18,89	1,15	15,51	1,21
EXT - ÉTER ETÍLICO PH7	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER ETÍLICO PH9	15,55	0,98	18,24	0,20	13,74	0,98
EXT - ÉTER ETÍLICO PH9	0	0	0	0	0	0
ÉTER ETÍLICO	0	0	0	0	0	0

LMÉ: Líquido Metabólico Esgotado
EXT: Extrato Bruto

Tabela 5.4 - Resultado da extração do metabólito ativo da biomassa de *Streptomyces gougerotii*.

	UFPEDA-02		UFPEDA-86		UFPEDA-700	
	Média dos Halos	Desvio Padrão	Média dos Halos	Desvio Padrão	Média dos Halos	Desvio Padrão
BIOMASSA - ACETONA PH 2	21,37	0,26	24,25	0,51	20,78	0,11
BIOMASSA - ACETONA PH 7	22,53	0,25	25,58	0,75	22,01	0,55
BIOMASSA - ACETONA PH 9	21,3	0,37	25,21	0,17	22,31	0,20
ACETONA	0	0	0	0	0	0
BIOMASSA - ETANOL PH 2	20,62	0,38	23,83	0,22	20,37	1,14
BIOMASSA - ETANOL PH 7	21,64	0,43	24,63	0,26	20,58	0,54
BIOMASSA - ETANOL PH 9	21,53	0,49	23,61	0,75	20,60	0,52
ETANOL	0	0	0	0	0	0
BIOMASSA - METANOL PH 2	19,01	0,24	21,6	0,31	19,54	0,33
BIOMASSA - METANOL PH 7	18,51	1,52	22,15	0,48	20,04	0,61
BIOMASSA - METANOL PH 9	18,98	0,53	22,07	0,85	19,75	0,20
METANOL	0	0	0	0	0	0

Tabela 5.5 – Resultado da extração do metabólito ativo do líquido metabólico de *Streptomyces gougerotii*.

	UFPEDA-02		UFPEDA-86		UFPEDA-700	
	Média dos Halos	Desvio Padrão	Média dos Halos	Desvio Padrão	Média dos Halos	Desvio Padrão
LME - ACETATO DE ETILA PH2	0	0	8,19	5,80	0	0
EXT - ACETATO DE ETILA PH2	24,42	0,57	27,28	0,33	24,64	0,34
LME - ACETATO DE ETILA PH7	0	0	15,18	1,82	0	0
EXT - ACETATO DE ETILA PH7	23,35	0,56	27,33	0,26	24,46	0,17
LME - ACETATO DE ETILA PH9	0	0	14,92	0,60	0	0
EXT - ACETATO DE ETILA PH9	23,75	0,35	27,40	0,58	23,98667	0,23
ACETATO DE ETILA	0	0	0	0	0	0
LME - CLOROFORMIO PH2	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH2	24,60	0,68	27,81	0,13	24,96	0,25
LME - CLOROFORMIO PH7	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH7	23,17	0,15	27,47	0,41	24,36	0,04
LME - CLOROFÓRMIO PH9	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH9	24,76	0,33	27,15	0,06	21,69	4,64
CLOROFÓRMIO	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER ETÍLICO PH2	19,12	0,24	23,85	0,37	21,00	0,58
EXT - ÉTER ETÍLICO PH2	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER ETÍLICO PH7	21,14	0,50	24,7	0,16	21,97	0,17
EXT - ÉTER ETÍLICO PH7	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER ETÍLICO PH9	20,69	0,52	24,20	0,18	21,87	0,45
EXT - ÉTER ETÍLICO PH9	0	0	0	0	0	0
ÉTER ETÍLICO	0	0	0	0	0	0

LME: Líquido Metabólico Esgotado
EXT: Extrato Bruto

5.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

A atividade antimicrobiana do extrato bruto da biomassa e do extrato bruto de acetato de etila do líquido metabólico de *Streptomyces gougerotii* foi avaliada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI). Os dois extratos apresentaram boa atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas.

Os micro-organismos testes escolhidos para a determinação da CMI foram os que se mostraram mais susceptíveis ao teste de atividade antimicrobiano: *Staphylococcus aureus* (02); *Staphylococcus aureus* MRSA (700) e *Bacillus subtilis* (86). O extrato bruto etanólico da biomassa apresentou uma boa atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testes com valores de CMI iguais ou abaixo de 3,9 µg/mL, enquanto que o extrato bruto de acetato de etila do líquido metabólico apresentou valores de CMI iguais ou abaixo de 15,62 µg/mL (Tabela 5.6).

O extrato bruto etanólico da biomassa apresentou os melhores valores da CMI, 0,97 µg/mL quando testado frente ao *S. aureus* MRSA (700) e ao *Bacillus subtilis* (86). Já extrato bruto de acetato de etila do líquido metabólico apresentou valores de CMI mais altos, inibindo o crescimento de *S. aureus* (02) e *S. aureus* MRSA (700) na concentração de 3,9 µg/mL.

O extrato bruto etanólico da biomassa apresentou os melhores valores da CMB, 1,95 µg/mL quando testado frente ao *S. aureus* MRSA.

Tabela 5.6: Determinação da CMI dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico de *Streptomyces gougerotii* frente aos micro-organismos testes.

Micro-organismo teste	Extrato Bruto da Biomassa (µg/mL)		Extrato Bruto do Líquido Metabólico (µg/mL)		Oxacilina (µg/mL)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,9	15,62	3,9	15,62	0,156	0,39
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	0,97	1,95	3,9	31,25	256	512
<i>Bacillus subtilis</i>	0,97	31,25	15,62	31,25	0,156	0,156

Choi e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de acetato de etila do líquido metabólico da fermentação de *Streptomyces* sp. BCNU 1001 e observaram CMI de 0,25 mg/mL para *Bacillus subtilis*, 0,125 mg/mL para *S. aureus* e 0,125 a 0,25 mg/mL para alguns micro-organismos Gram-negativos. Também foi observada atividade antifúngica, com valores de CMI de 0,5, 0,125 e 0,25 mg/mL para *A. niger*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*, respectivamente.

Arasu e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do *Streptomyces* spp. ERI-3, isolado do solo rochoso da floresta de Ghats Ocidental, na Índia. O micro-organismo mostrou ser produtor de metabólitos bioativos que puderam ser extraídos do sobrenadante (líquido metabólico) com acetato de etila. O extrato obtido inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis* (CMI= 0,25 mg/mL), *S. aureus* (CMI= 0,5 a 1 mg/mL) e bactérias Gram-negativas (CMI= 0,5 a 1 mg/mL).

O composto produzido pelo *Streptomyces* sp. BCNU 1001 relatado por Choi e colaboradores (2012) apresenta CMI de 500 a 1000 µg/mL frente a diferentes linhagens de *S. aureus* MRSA. Yoo e colaboradores (2007) isolaram a partir da biomassa do *Streptomyces* sp. CS684 um antibiótico denominado CSU-1 (Laidlomocina), que apresentou CMI de 1 µg/mL, frente a diversas cepas de *S. aureus* MRSA. Estes estudos corroboram com o nosso trabalho, pois também relatam a ação de metabólitos bioativos de *Streptomyces* frente a bactérias Gram-positivas e multirresistentes.

Rahman e colaboradores (2010) verificaram a atividade antimicrobiana de um antibiótico polipeptídico denominado Actinomicina D (AR-1a), de uma nova cepa de *Streptomyces parvulus*. Após caracterizado, o antibiótico apresentou CMI de 2 a 8 µg/mL tanto para bactérias Gram-positivas quanto para bactérias Gram-negativas.

Dessa forma, a linhagem de *Streptomyces gougerotii*, encontrado no nosso estudo, mostra ser uma actinobactéria com elevado potencial devido à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. É importante ressaltar que os resultados da CMI dos extratos brutos obtidos neste estudo estão expressos em µg/mL, indicando assim, que o composto produzido por esta linhagem é ativo em pequenas concentrações. Resultados melhores de CMI poderão ainda ser relatados após purificação dos extratos.

5.6. PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS BRUTOS

Foi realizada a prospecção química dos extratos brutos da biomassa e do líquido metabólico de *Streptomyces gougerotii*, pois os metabólitos produzidos por este micro-organismo mostraram apresentar boa atividade antimicrobiana.

Alíquotas de cada amostra foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada para identificar a classe de metabólitos secundários. No extrato bruto da biomassa, foi possível verificar a presença de açúcares redutores, flavonóides, mono/sesquiterpenos, proantocianidina, triterpenos e esteróides, enquanto que no extrato bruto do líquido metabólico verificou-se a presença de flavonóides, mono/sesquiterpenos, proantocianidina, triterpenos e esteroides, conforme descrito na tabela 5.7.

Os resultados mostram que açúcares redutores são os únicos metabólitos que diferenciam a biomassa do líquido metabólico, indicando que os antibióticos podem ser os mesmos.

Tabela 5.7: Prospecção química por Cromatografia em Camada Delgada dos metabólitos secundários bioativos produzidos pela actinobactéria *Streptomyces gougerotii*.

Metabólitos	Biomassa	Líquido Metabólico
Alcalóides	-	-
Açúcares redutores	+	-
Flavonóides	+	+
Taninos Hidrolizáveis	-	-
Triterpenos e Esteróides	+	+
Mono/Sesquiterpenos	+	+
Proantocianidina	+	+

Um estudo realizado por Thomas e colaboradores (2011) com extratos de uma bactéria e de um fungo isolados de diversos habitats mostra a prospecção química, na busca de alcalóides, esteróis, compostos fenólicos e taninos, proteínas e aminoácidos livres e flavonóides, em extratos da biomassa e do líquido

metabólico. Em relação à bactéria, o uso de solventes orgânicos para extração de metabólitos da biomassa permitiu a extração de alcaloides, carboidratos, compostos fenólicos, proteínas e aminoácidos, enquanto que no líquido metabólico os solventes inorgânicos permitiram a extração de flavonóides e esteróis. Já em relação ao fungo, o uso de solventes orgânicos para extração de metabólitos da biomassa permitiu a extração de carboidratos, taninos, compostos fenólicos, proteínas, aminoácidos e flavonóides, enquanto que no líquido metabólico os solventes inorgânicos permitiram a extração de apenas esteróis.

A prospecção química é geralmente realizada com extratos de plantas medicinais, para identificação de compostos com potencial terapêutico. Os flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e lignanas, têm sido relatados como alvos de incessantes estudos por possuírem essa característica. Estudos relatam a presença destes e de outros compostos ativos em diferentes plantas, tanto em extratos foliares quanto em extratos da raiz (LÔBO et al., 2010; FABRI et al., 2011). Desse modo, é importante considerar que na rizosfera há grande concentração de nutrientes orgânicos oriundos das raízes, que influenciam os micro-organismos a produzir compostos semelhantes (MELO e AZEVEDO, 2008; KENT e TRIPLETT, 2002).

5.7. BIOAUTOGRAFIA

Alíquotas do extrato etanólico bruto da biomassa e do extrato bruto de acetato de etila do líquido metabólico foram analisadas por bioautografia, após corrida cromatográfica utilizando o sistema de solvente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1). A bactéria Gram-positiva *S. aureus* UFPEDA 02 foi utilizada para observar as possíveis bandas que apresentam atividade antibacteriana.

Os dois extratos estudados apresentaram frações com atividade bacteriana. O extrato bruto da biomassa mostrou duas frações com R_f 0,37 e a outra R_f 0,68. O extrato bruto do líquido metabólico também mostrou três frações com atividade, apresentado R_{fs} de 0,2; 0,37 e 0,58 (figura 5.17). Estes primeiros resultados indicam que a fração da biomassa com R_f 0,37 é similar a fração do líquido metabólico com R_f igual. A purificação destes antibióticos poderão esclarecer estes resultados preliminares. O sistema de eluição utilizado na bioautografia poderá ser utilizado para futura purificação dos extratos.

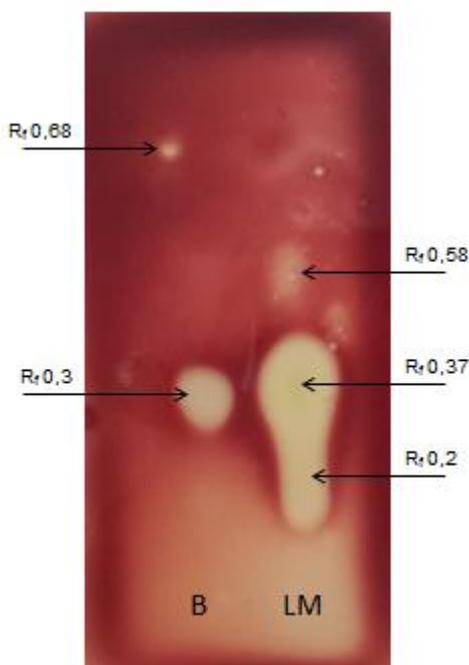


Figura 5.17: Bioautografia dos extratos brutos da biomassa (B) e do líquido metabólico (LM) de *Streptomyces gougerotii*. As setas indicam os R_{fs} dos metabólitos bioativos. Fonte: O autor.

Krishnaveni e colaboradores (2011) determinaram a atividade antibacteriana de metabólitos bioativos produzidos por *Streptomyces noursei*, isolados de amostras de solo de Kunur Village da Índia, através da técnica da bioautografia. O teste foi realizado utilizando o sistema de eluição CHCl_3 :MeOH (9:1) com amostras fracionadas a partir de coluna cromatográfica, frente à uma cepa de *Bacillus subtilis*, permitindo a obtenção de bandas que representam o halo de inibição, nos quais encontram-se os possíveis compostos bioativos. Cada mancha apresentou-se com diferentes valores de R_f (0,56; 0,44; 0,32; 0,28; 0,12).

Hozzein, Rabie, Ali (2011) realizaram uma busca por actinobactérias produtoras de novos compostos antimicrobianos isoladas do deserto egípcio. Após extração utilizando acetato de etila, foi realizada purificação parcial por coluna, seguido de bioautografia. A técnica utilizada revelou que a estirpe *Streptomyces* D332 foi capaz de produzir apenas um único composto ativo com R_f de 0,28, para uma bactéria Gram-positiva.

Resultados semelhantes foram obtidos por El-Naggar, El-Assar, Abdul-Gawad (2006) que relataram uma cepa de *Streptomyces violaceusniger*, isolada do solo egípcio, como produtora de apenas um composto importante que inibe fortemente o crescimento de bactérias Gram-positivas. Entretanto, a inibição contra bactérias Gram-negativas e leveduras foi reduzida.

É importante ressaltar que a bioautografia é eficiente para a detecção de antimicrobianos presentes nos extratos, onde geralmente há misturas complexas de compostos, mesmo estando em pequenas quantidades. No entanto, a técnica restringe à identificação da banda que possui atividade antimicrobiana. Além disso, diferentes estudos relatam que a maioria dos compostos produzidos pelo gênero *Streptomyces* com atividade antibacteriana detectada pelo método da bioautografia, tem R_{fs} semelhantes aos encontrados no nosso trabalho. (SCORZONI et al., 2007; HOZZEIN, RABIE, ALI, 2011; KRISHNAVENI et al., 2011)

6. CONCLUSÕES

A rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. mostrou maior ocorrência de *Streptomyces* termofílicos e mesofílicos. As actinobactérias mesofílicas apresentaram maior atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas como *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. aureus* – *MRSA*. A fermentação indicou o melhor meio, tempo e pH para produção do metabólito bioativo, e em seguida, a utilização de diferentes solventes miscíveis e não miscíveis em água permitiu a extração do antibiótico da biomassa e do líquido metabólico. Os antibióticos produzidos por *Streptomyces coeruleorubidus* e *Streptomyces gougerotii* apresentam alta atividade antibacteriana para *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. aureus* – *MRSA*. Estes resultados indicam o potencial destes *Streptomyces* como promissores para produção de novos antibióticos com atividade para bactérias multiresistentes.

REFERÊNCIAS

- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Londres: Academic Press, 1995. 576 p.
- ARASU, M. V.; DURAIANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, p. 22-28, 2009.
- BALTZ, H.R. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the future. **Microbe**. v. 2, p. 125-131, 2007.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**. v.68, p.1–13, 2009.
- BIBB, M.J. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 8, p. 208–215, 2005.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 4ª Ed. Recife: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 1960. 540 p.
- BUCHAMAN, R. E. Studies on the classification and nomenclature of the bacteria: VIII. The subgroups and genera of the *Actinomycetales*. **Journal of Bacteriology**. v.111, p. 403-406, 1916.
- BULL, A. T. **Microbial Diversity and Bioprospecting**. 1ª Ed. Washington: American Society for Microbiology, ASM Press, 2004. 496 p.
- CASTELLETTI, C.H.M.; SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M. e SANTOS, A.M.M. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. 2004. In: SILVA, J.M.C., TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. p. 91-100. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília.
- CEYLAN, O.; OKMEN, G.; UGUR, A. Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **EurAsian Journal of BioSciences**. V. 2, p. 73-82, 2008.
- CHATER, K.F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, UK, v. 361, p. 761 – 798, 2006.
- CHOI, H. J.; KIM, D. W.; CHOI, Y. W.; LEE, Y. G.; LEE, Y.; JEONG, Y. K.; JOO, W. H. Broad-spectrum In Vitro Antimicrobial Activities of *Streptomyces* sp. Strain BCNU 100. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 17, p. 576-583, 2012.
- CLAESSEN, D.; JONG, W.; DIJKHUIZEN, L.; WÖSTEN, H. A. B. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!. **Trends In Microbiology**,

Cambridge, v. 14, n. 7, p. 313-319, 2006.

CLSI – Clinical and laboratory standards institute. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twentieth informational supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010.

CUNHA, I.G. B.; SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, R. E. A.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, J. M. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 120 – 123, 2009.

DA SILVA, C.H.T.P.; SOBRINHO, T.J.S.P.; CASTRO, V.T.N.A.; LIMA, D.C.A. ; DE AMORIM, E.L.C. Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *sapium glandulosum* (L.) Morong from northeastern brazil. **Molecules**, Basel, Switzerland, v.16, n. 6, p. 4728-39, 2011.

DEEPA, L. S.; GOWTHAMI, K.; KUMAR, K. S. *In vivo* Screening of Antimicrobial Activity of Soil Actinomycetes Against Human Pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 5, p. 624-628, 2011.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 52, p. 455-463, 1999.

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 486-495, 2006.

DING, C.H.; JIANG, Z.Q.; LI, X.T.; LI, L.T.; KUSAKABE, I. High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E- 86. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 7-10, 2004.

EL-NAGGAR, M. Y.; EL-ASSAR, S. A.; ABDUL-GAWAD, S. M. Meroparamycin Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. **The Journal of Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 432-438, 2006.

EMBRAPA – Empresa brasileira de Pesquisas e Agropecuária. **Ecologia da rizosfera e Filosfera**. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=228&func=unid>> Acesso em: 9 de agosto de 2012.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v.13, n.2, p.183-189, 2011.

FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAU, J.H.J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant Soil**, v. 321, p. 279–303, 2009.

FURTADO, V. C. Estudos preliminares da produção de antibiótico e caracterização parcial do actinomiceto isolado da zona da mata de Pernambuco. **Dissertação de mestrado do departamento de bioquímica do centro de ciências biológicas da**

Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 2001.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**. v. 309, p. 1387–1390, 2005.

GIULIETTI, A.M., DU BOCAGE NETA, A.L., CASTRO, A. A.J.F., GAMARRA-ROJAS, C.F.L., SAMPAIO, E.V. S.B., VIRGÍNIO, J.F., QUEIROZ, L.P., FIGUEIREDO, M.A., RODAL, M.J.N., BARBOSA, M.R.V. & HARLEY, R.M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C., TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, 2004.

GONZÁLEZ, I.; SACIDO, A.A.; ANDERSON, A.; GENILOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 401-415, 2005.

GOODFELLOW, M.; BROWNELL. G.H.; SERRANO, J.A. **The biology of the Nocardiae**. New York. Academic Press, 1976, 517 p.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, HDM. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 38, p. 135-141, 2007.

HARBONE, J. B.; In: HARBONE, J.B., **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Nova York: Chapman and Hall, 1998, 320 p.

HECHT, S.T.; CAUSEY, W.A. Rapid method for the detection and identification of mycolic acids in aerobic actinomycetes and related bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 284-287, 1976.

HIGGINBOTHAM, S. J.; MURPHY, C. D. Identification and characterization of a *Streptomyces* sp. Isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 82-86, 2010.

HO, P. L.; CHEUNG, C.; MAK, G. C.; TSE, C. W.S.; NG, T. K.; CHEUNG, C. H.Y.; QUE, T. L.; LAM, R.; LAI, R. W.M.; YUNG, R. W. H.; YUEN, K. Y. Molecular epidemiology and house hold transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 145–151, 2007.

HOZZEIN, W. N.; RABIE, W.; ALI, M. I. A. Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 12, p. 2295-2301, 2011.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis **Ecossistemas brasileiros: Caatinga**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/caatinga.htm>> Acesso em: 09 de Agosto

2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas e de Vegetação. Rio de Janeiro.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 15 de Fev de 2012.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. A improvement of kasugamycin – Producing Strain by the Agar Piece Method and Prototroph Method. **Folia Microbiológica**, v.16, p. 218-224, 1971.

INBAR, E.; GREEN, S.J.; HADAR, Y.; MINZ, D. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. **Microbiology Ecology**, v.50, p.73-81. 2005.

KANZAKI, T.; HIGASHIDE, E.; YAMAMOTO, H.; SHIBATA, M.; NAKAZAWA, K.; IWASAKI, H.; TAKEWAKA, T.; MIYAKE, A. Gougerotin, a new antibacterial antibiotic. **The Journal of Antibiotics (Japan)**. Ser. A, v. 15, p. 93, 1962.

KAWAMURA, T.; TAGO, K.; BEPPEU, T.; ARIMA, K. Antiviral Antibiotic 515-1. Taxonomy of the producing strain and study conditions for production of the antibiotic. **The journal of antibiotics**. Tokio, v. 29, n. 3, p. 242-247, 1976.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology** v. 56, p. 211–236, 2002.

KIRBY, W. M. M.; BAUER, A. W.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2008. 1760 p.

KRISHNAVENI, J.; RADZOM, M.; ZEECK, A.; KISHAN, V. Taxonomy, fermentation, biological activities, isolation and characterization of metabolites obtained from a new strain of *Streptomyces noursei* (KC46). **Indian Journal of Biotechnology**. v.10, p. 212-218, 2011.

KUMAR, K. S.; HARITHA, R.; SWATHI, A.; SIRISHA, B.; RAMANA, T. Taxonomy and Antimicrobial Activity of *Streptomyces coeruleorubidus* sp. Isolated from Marine Sediment. **Research Journal of Microbiology**, v. 7, p. 171-181, 2012.

LACAZ, C. S. **Antibióticos**. São Paulo: Fundo editorial Prociex, p. 16-60, 1965.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LAI, R.F.; SIFOUR, M.; SAKR, M.; HACENE, H. A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v. 24, p. 2235-2241, 2008.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 804 p.

LECHEVALIER, H.A; LECHEVALIER, M.P. Classification des actinomycetes aerobes baseé sur leur morphologie et leur composition chimique. **Annales de l'Institut Pasteur** v. 108, p. 662-673, 1965.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 20, p. 435-443, 1979.

LECHEVALIER, H. A. Criteric to by Used in the Description of New Actinomycete. **Actinomycetes Relato Org**. v. 16, p 46-48, 1981.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimaticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, 2001. 593 p.

LIRAS, P.; MARTIN, J. F. **Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*: methods in biotechnology**. Totowa: Human Press. p. 149-164, 2005.

LISBOA, T; FARIA, M; HOHER, J. A.; BORGES, L. A. A.; GÓMEZ, J; SCHIFELBAIN, L.; DIAS, F. S.; LISBOA, J.; FRIEDMAN, G. Prevalência de infecção nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 414-20, 2007.

LÔBO, K. M. S.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, A. M. A.; RODRIGUES, F. F. G.; LÔBO, I. S.; BEZERRA, D. A. C.; COSTA, J. G. M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin e Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v.12, n.2, p.227-233, 2010.

LYRA, F. D. A.; GONÇALVES DE LIMA, O.; COELHO, J. S. B.; ALBUQUERQUE, M. M. F.; MACIEL, G. M.; OLIVEIRA, L. L.; MACIEL, M. C. N. Ciclamicina e ciclacidina, Dois novos Antibióticos Produzidos pelo *Streptomyces capoamus* nov. sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 36, n. 3, p. 323-334, 1964.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**, 12ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p 459-451, 2010.

MAIA, G. N. Catingueira. In: MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: Leitura e Arte, p.159-169, 2004.

MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.)** Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2ª Ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647 p.

METZ H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. **Naturwissenschaften**, v. 48, p. 569-570, 1961.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D.E.G.T.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife, UFRPE, 2005, 388 p.

MINCER, T. J.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5005–5011, 2002.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 30 de julho de 2012.

NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. **Actinomicetos no solo**. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa MG, 2008.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Actinobacterial community and diversity in rhizosphere soils of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by RT-PCR and PCR-DGGE. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 39, p. 509–519, 2011.

NOMOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbiospora* and *Streptosporangium* strains in soil. (Part 1). **Journal of Fermentation technology**, v. 47, p. 463-469. 1969a.

NOMOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VII. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbiospora* and *Streptosporangium* strains in soil. (Part 2). Classification of the isolates. **Journal of Fermentation technology**, v. 47, p. 701-709. 1969b.

O'DONNELL, A. G.; GÖRES, H. E. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, n. 3, p. 225-229, 1999.

OLIVEIRA FILHO, A. T.; SCOLFORO, J. R. **Inventário Florestal de Minas Gerais: Espécies Arbóreas da Flora Nativa**. Lavras: UFLA, p.211-215, 2008.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia; Conceitos e aplicações**. 2ª ed. São Paulo: Pearson Makron Books, v. 1, 1997. 248 p.

PETERS, S.; KOSCHINSKY, S.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. Secession of microbial communities during hot composting as detected by PCR Single-Strand-Conformation Polymorphism-based genetics profiles of small-subunit rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 3, p. 930-936, 2000.

PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRÓN, C.; FLORES, M.E. *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 269-273, 2003.

PFEFFERLE, C.; HEOBALD, U.; GÜRTLER, H.; FIEDLER, H.P. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. ***Journal of Biotechnology***, v. 80, p. 135-142, 2000.

POLHILL, R.M. Classification of the Leguminosae. 1994. p. 45-54. In: F.A. Bisby; J. Buckingham e J.B. Harbone (eds.). **Phytochemistry dictionary of the Leguminosae**. New York, Chapman and Hall.

RAHMAN A.; ISLAM M. Z.; KHONDKAR, P.; ISLAM, A. Characterization and antimicrobial activities of a polypeptide antibiotic isolated from a new strain of *Streptomyces parvulus*. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**. v. 13, n. 1, p.14-16, 2010.

RAHMAN, A.; ISLAM, M. Z.; ISLAM, A. U. Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. **Biotechnology Research International**. v. 2011, p. 1-6, 2011.

RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and Drug-An overview. **American Journal of Drug Discovery and development**. v.1, n. 2, p. 74-84, 2011.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 219–235, 2006.

REDDY, T. V.; MAHMOOD, S.; PARIS, L.; REDDY, Y. H.; WELLINGTON, E. M.; IDRIS, M. M. *Streptomyces hyderabadensis* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 61, p. 76–80, 2011.

ROBERTSON, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. fraction and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p. 72-80, 1956.

SALVAT, A.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine**, v. 11, p.230 – 234, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2ª ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 417 p.

SAMPAIO, Y. e BATISTA, J.E.M. **Desenvolvimento regional e pressões antrópicas no bioma Caatinga**. In: SILVA, J.M.C., TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. p. 311-324, 2004.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 895-906, 2002.

SANTANA, D.G. ; SANTOS, C.A. ; SANTOS, A.D.C. ; NOGUEIRA, P.C.L.; THOMAZZI, S.M. ; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R. ; CAMARGO, E.A. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **Journal of Ethnopharmacology**. v.142, n. 2, p.445-55, 2012.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S; BOLZANI, V.S.; GIANINNI, M.J.S.M. The use of Standard methodology for determination of antifungal activity of Natural Products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SCHER, J. M.; SPEAKMAN, J. B.; ZAPP, J.; BECKER, H. Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S. F. Gray. **Phytochemistry**. v. 65, p. 2583-2588, 2004.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a Census of Bacteria in Soil. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 7, 2006. 92 p.

SÊMEDO, L. T. A. S.; LINHARES, A. A.; GOMES R. C.; MANFI, G. P.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO R. R. R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiology Research**. v. 155, n. 4, p. 291-299, 2001.

SHARMA, O. P.; DARWRA, R. K. Thin layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. **Journal of Chromatography**, v. 567, p 351-354, 1991.

SHARMA, S.; ANEJA, M.K.; MAYER, J.; MUCH, J.C.; SCHLOTTER, M. Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. **Microbial Ecology**. v. 49, p.407-15, 2005.

SHIRLING, E. B.; E GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, p. 313-340, 1966.

SILVA, J.M.C., TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Ministério do Meio Ambiente, Brasília-DF. Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SILVA, L.B.; SANTOS, F.A.R.; GASSON, P.; CUTLER, D. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 23, n.2, p. 436-445, 2009.

SRIDHAR, S. R.; RAJAGOPAL, R. V.; RAJAVEL, R.; MASILAMANI, S.; NARASIMHAN, S. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 7596-7599, 2003.

STANECK, J. L.; ROBERTS, G. D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 226-231, 1974.

SUTHINDHIRAN, K.; KANNABIRAN, K. Cytotoxic and Antimicrobial Potential of Actinomycete Species *Saccharopolyspora salina* VITSDK4 Isolated from the Bay of Bengal Coast of India. **American Journal of Infectious Diseases**. v.5, n. 2, p. 90-98, 2009.

THAKUR, D.; YADAV, A.; GOGOI, B. K.; BORA, T.C. Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 17, p. 242-249, 2007.

THOMAS, A. T.; RAO, J. V.; SUBRAHMANYAM, V. M.; CHANDRASHEKHAR, H. R.; MALIYAKKAL, N.; KISAN, T. K.; JOSEPH, A.; UDUPA, N. *In vitro* anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n. 2, p. 279-287, 2011.

TORRES-CORTÉS, G.; MILLÁN, V.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. J.; AGUIRRE-GARRIDO, J. F.; RAMÍREZ-SAAD, H. C.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; TORO, N.; MARTÍNEZ-ABARCA, F. Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. **Plant Soil**. v. 357, p. 275–288, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. 10^a ed., Editora Artmed, 2011. 894 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; **Microbiologia**. Editora Atheneu, 4^a ed., 2005, 718 p.

TROVÃO, D. M. B. M.; FERNANDES, P. D.; ANDRADE, L. A.; DANTAS NETO, J. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.11, n.3, p. 307–311, 2007.

VAN DER KOOIJ, T.I.I.; MANNING, J.; WILLE, J.C.; VAN BENTHEM, B.H.B. Prevalence of nosocomial infections in The Netherlands, 2007–2008: results of the first four national studies. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, p. 168–172, 2010.

VASCONCELLOS, R. L. F.; SILVA, M. C. P.; RIBEIRO, C. M.; NOGUEIRA CARDOSO, E. J. B. N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agrícola**, v. 67, n. 6, p. 743-746, 2010.

VELHO-PEREIRA, S.; KAMAT, N. M. Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified "Cross-Streak" method. **Nature Precedings**, p. 1-16, 2012.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C. Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. **Microbial Ecology**, v. 57, pp. 749–756, 2009.

VIJAYAKUMAR, R.; MUTHUKUMAR, C.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A.; SARAVANAMUTHU, R. Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. **Actinomycetologica**, v. 21, p. 59–65, 2007.

VIMAL, V.; RAJAN, B. M.; KANNABIRAN, K.; Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). **Asian Journal of Medical Sciences**. v. 1, n. 2, p. 57-63, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis – Athin layer chromatography atlas**. Munich: Springer, 1996, 384 p.

WAKSMAN, S. A.; HENRICI, A. T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**. v.46, p. 337-341, 1943.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, p. 697-703, 1991.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Williams e Wilkins, v. 4, 1989, 2648 p.

YOO, J. C.; KIM, J. H.; HA, J. W.; PARK, N. S.; SOHNG, J. K.; LEE, J. W.; PARK, S. C.; KIM, M. S.; SEONG, C. N. Production and Biological Activity of Laidlomycin, Anti-MRSA/VRE Antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. **The Journal of Microbiology**., v. 45, n. 1, p. 6-10, 2007

ZHAO, X.; JIAO, W.; JIANG, B.; YUAN, W.; YANG, T.; HAO, S. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 859–866, 2009.

8. ANEXOS

8.1. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Composição dos meios de cultura Sólidos

Reagentes	MC	AY modificado**	ISP-4***	MH (Müller Hinton Agar)	SAB (Sabouraud Agar)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	4 g	-	-
Amido solúvel	-	-	20 g	1,5 g	-
CaCO ₃	-	-	4 g	-	-
Extrato de Levedura	-	1 g	-	-	-
KCl	0,3 g	-	-	-	-
Extrato de Carne	-	-	-	5 g	-
Glicerol	-	1 g	-	-	-
Glicose	2 g	1 g	-	-	40 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g	0,3 g	2 g	-	-
L-arginina	-	0,3 g	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g	0,2 g	2 g	-	-
NaCl	-	0,3 g	2 g	-	-
NaNO ₃	0,5 g	-	-	-	-
Peptona	-	-	-	17,5 g	10 g
Ágar	20 g	17 g	17 g	15 g	15 g
H ₂ O Destilada	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
Solução de Sais	1 mL	1 mL	2 mL	-	-
pH	7,4	6,4	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,2	5,6 ± 0,2

Composição das Soluções de Sais

Reagentes	Sais do meio	
	MC e AV modificado	Sais do meio ISP-4
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 g	-
Fe ₃ (SO ₄) ₃	1 g	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	0,1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	0,1 g
H ₂ O Destilada	100 mL	100 mL

Composição dos meios líquidos

Reagentes	M1	MPE	AV modificado**	ISP-4***
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	4 g
Amido solúvel	-	-	-	20 g
CaCO ₃	1 g	2 g	-	4 g
Extrato de Levedura	-	-	1 g	-
Farinha de Soja	10 g	20 g	-	-
Glicerol	-	-	1 g	-
Glicose	10 g	20 g	1 g	-
K ₂ HPO ₄	-	-	0,3 g	2 g
L-arginina	-	-	0,3 g	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	0,2 g	2 g
NaCl	5 g	5 g	0,3 g	2 g
H ₂ O Destilada	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
Solução de Sais	-	-	1 mL	2 mL
pH	7	7	6,4	7,2 ± 0,2

8.2. TAMPÃO

Phosphate Buffered Saline (PBS)	
NaCl	8,5 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,236 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,81 g
H ₂ O	100 mL

9. APÊNDICE

APÊNDICE A - Linhagens isoladas a 37 °C, com seus respectivos gêneros e características macroscópicas.

Isolado	Gênero	Micélio aéreo	Micélio Vegetativo	Pigmento
C1.01	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Cinza Escuro	-
C1.02	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Amarelo	-
C1.03	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Escuro	-
C1.04	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Escuro	-
C1.07	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Amarelo	+
C1.09	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Cinza Claro	-
C1.11	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Cinza Claro	-
C1.12	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza	-
C1.13	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza	-
C1.14.1	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom	+
C1.15	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Claro	-
C1.16	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Branco	-
C1.17	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.19	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.20	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Bege	-
C1.22	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Branco	-
C1.24	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Escuro	-
C1.29	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Branco	+
C1.33	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.35	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.45	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Marrom Claro	+
C1.46	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Cinza	+
C1.47	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Amarelo	+
C1.48	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Beje	-
C1.52	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Marrom	+
C1.88	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Escuro	-
C1.89	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Escuro	-
C1.94	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Bege	+
C1.97	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Escuro	+
C1.98.2	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Escuro	Marrom	+
C1.128	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	Cinza Claro	Cinza Claro	-
C1.129	<i>Streptomyces gougerotii</i>	Cinza	Cinza Claro	+
C1.131	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza	-
C1.135	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Amarelo Claro	-
C1.142	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom	-
C1.147	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Marrom	+

+: Pigmento Presente;

-: Pigmento ausente.

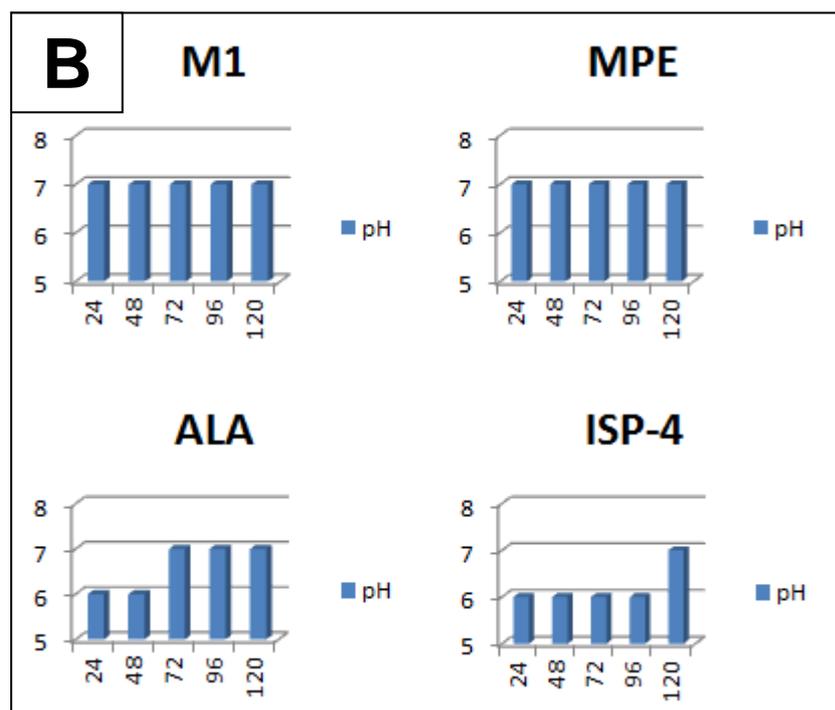
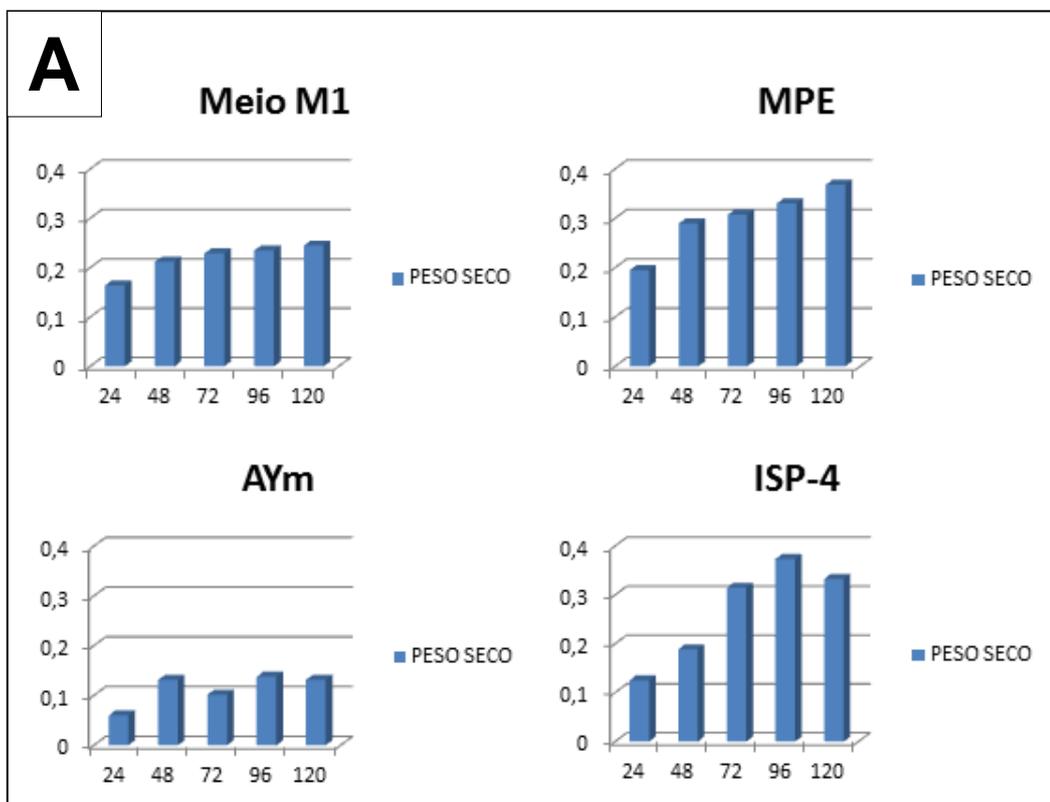
APÊNDICE B - Linhagens isoladas a 45 °C, com seus respectivos gêneros e características macroscópicas.

Isolado	Gênero	Micélio aéreo	Micélio Vegetativo	Pigmento
C1.53	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.54	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Escuro	Cinza Claro	-
C1.55	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Amarelo Claro	+
C1.56	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Escuro	Cinza Claro	-
C1.57	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Escuro	Cinza	-
C1.58	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.59	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Escuro	Cinza Escuro	-
C1.60	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Escuro	-
C1.66	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Branco	-
C1.67	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Branco	-
C1.69	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.70	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Cinza	-
C1.71	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Branco	-
C1.72	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	+
C1.74	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.75	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Escuro	-
C1.77	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	-
C1.78	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Branco	-
C1.81	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Branco	-
C1.82	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza Claro	+
C1.84	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Branco	-
C1.106	<i>Streptomyces</i> sp.	Marrom Claro	Marrom Claro	-
C1.109	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Branco	-
C1.111	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza	-
C1.113	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza	-
C1.116	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Escuro	Cinza Escuro	-
C1.118	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza Claro	Branco	-
C1.124	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Branco	+
C1.125	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Branco	+
C1.136	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Marrom	-
C1.138	<i>Streptomyces</i> sp.	Cinza	Cinza	-
C1.144	<i>Streptomyces</i> sp.	Branco	Amarelo Claro	+

+: Pigmento Presente;

-: Pigmento ausente.

APÊNDICE C - *Streptomyces coeruleorubidus*: A) Peso seco da biomassa (g) x Tempo (horas) de crescimento nos diferentes meios de cultura. B) pH x Tempo(horas) de crescimento nos diferentes meios de cultura.



APÊNDICE D - *Streptomyces gougerotii*. A) Peso seco da biomassa (g) x Tempo (horas) de crescimento nos diferentes meios de cultura. B) pH x Tempo(horas) de crescimento nos diferentes meios de cultura.

