

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

RAPHAEL CARLOS FERRER DE SANTANA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA
COLEÇÃO UFPEDA CONTRA *Candida spp.***

RECIFE
2015

RAPHAEL CARLOS FERRER DE SANTANA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA
COLEÇÃO UFPEDA CONTRA *Candida spp.***

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

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

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

**RECIFE
2015**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santana, Raphael Carlos Ferrer de

Potencial biotecnológico de actinobactérias da coleção UFPEDA contra *Candida* spp./ Raphael Carlos Ferrer de Santana– Recife: O Autor, 2015.

66 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, 2015.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices

1. Antibiótico 2. Actinobactérias 3. *Candida* I. Araújo, Janete Magali de (orientadora) II. Lima, Gláucia Manoella de Souza (coorientadora) III. Título

615.329

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-76

RAPHAEL CARLOS FERRER DE SANTANA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS DA
COLEÇÃO UFPEDA CONTRA *Candida spp.***

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

Aprovada em: 24/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de
Pernambuco (1º Membro)

Prof.^a Dr.^a. Norma Buarque de
Gusmão Universidade Federal de
Pernambuco (2º Membro)

Prof.^a. Dr.^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva
Universidade Federal de Pernambuco
(3º Membro)

Recife, 24 de Fevereiro de 2015

Dedico a Deus e a todos que contribuíram de alguma forma

AGRADECIMENTOS

À Deus, que realiza milagres na minha vida todos os dias, que me sustenta e dá forças para que eu não desamine na realização dos meus sonhos.

A minha mãe, Fátima Santos, por ter sempre investido na minha educação fazendo o possível para me ver feliz e realizado.

À minha orientadora Professora Janete Magali pela paciência e grande aprendizado.

A minha “co-orientadora” Dr^a Glaucia Manoella, a quem tanto estimo e que sempre acompanhou de perto o meu trabalho e foi solícita em todos os momentos, esta é uma amizade que quero continuar.

À Professora colaboradora do meu trabalho Márcia nascimento, que me incentivou a fazer a seleção do mestrado e me recebeu no seu laboratório e sempre me dedicou grande atenção e cuidado.

À Andrea Nunes, minha esposa, por sua dedicação e seu amor incondicional e sincero que sempre me ajudou a seguir em frente.

À amiga Glêzia Renata pela cumplicidade, companheirismo e milhões de mensagens trocadas ao longo desse período.

À minha turma do mestrado, Laís Nery (A maga), Gabriela, Suelen, Samara, Nina Rosa e Carla” Bismarcks”, por todo sofrimento compartilhado.

À amiga Hortência Farias pelas agonias antes do resultado e nos seminários das disciplinas .

À todos meus amigos do Laboratório genética de microrganismo do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela feliz e cooperativa convivência nestes últimos dois anos: Wanda, , Kássia, Evelyn, Jéssica, Nataliane, Milca e Graciely.

À todos meus amigos do LAMAI, pela feliz e cooperativa convivência nestes últimos dois anos: Pérsio, Camila, Rafael Manaus, Robinho, Nelânia, Erik, Iasmim e Welma.

À Professora Ana Maria Souto-Maior, sempre prestativa a me atender e tirar dúvidas e que por muitas vezes disponibilizou os equipamentos do seu laboratório.

À Dona Fátima e Marcela, técnicas no Laboratório de Cultura de Microrganismos, que sempre deram apoio e auxílio seja no âmbito profissional ou pessoal.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pelo auxílio financeiro recebido neste projeto.

•

Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.

Martins Luther King

RESUMO

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas formadoras de filamentos ramificados que se destacam pela produção de metabólitos secundários, como antimicrobianos, antitumorais, fitohormônios e corantes naturais. Diante disso, este trabalho teve o objetivo de determinar o potencial biotecnológico de actinobactérias da coleção UFPEDA contra *Candida spp.* Para avaliação da atividade biotecnológica, 32 actinobactérias foram testadas contra sete isolados clínicos de *Candida spp.* utilizando diferentes meios de cultura para o crescimento (ALA, ISP-4, AY, ISP-3) e temperaturas (37 °C ou 45 °C). No ensaio primário, foi evidenciada atividade apenas quando as actinobactérias foram cultivadas em meio ISP-3 a temperatura de 37 °C. Dessas, apenas 2 linhagens (6,25 %) apresentaram atividade antifúngica com halo de inibição variando entre 11 mm e 18 mm. As duas linhagens produtoras de metabólitos secundários com atividades antifúngicas não apresentaram diferença estatística, por isso foi selecionada a linhagem G24 por apresentar um pigmento na cor vermelha para dar seguimento às análises. A fermentação da linhagem (G24) foi realizada para avaliar atividade antifúngica, biomassa e pH, durante 5 dias, utilizando diferentes meios (MPE, M1 e ISP-3), sendo tais parâmetros monitorados a cada 24 horas. O melhor meio para produção de metabólitos secundários foi ISP-3 fermentado durante 48 h em pH 7.0, sendo evidenciados halos de inibição de 13 a 18 mm e biomassa de 0,1 g/mL de meio. Estabelecidas às condições, foi realizada a extração do princípio bioativo, sendo evidenciada atividade apenas para biomassa quando extraído em acetato de etila. A concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto variou de 125 µg/mL a 62,5 µg/mL para *Candida spp.* testadas. Análise Cromatográfica do Extrato Bruto as frações semi-purificadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) sendo evidenciadas duas frações, uma com atividade antifúngica e outra um corante natural. As características morfológicas do isolado G24 foram analisadas por microscopia óptica, sendo observados esporos verticilados pertencente ao gênero *Streptomyces*. O gene 16S rDNA foi amplificado e enviado para sequenciamento, sendo identificada como *Streptomyces sp.* Diante destes resultados, podemos concluir que a linhagem (*Streptomyces sp.*), isolado da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis tul*, do bioma Caatinga, apresenta uma significativa atividade antifúngica e necessita de estudos espectroscópios para caracterização do composto bioativo e do corante.

Palavras-chave: Antifúngico, CMI, Metabólitos bioativo, 16SrDNA.

ABSTRACT

Actinobacteria are forming Gram-positive bacteria of branched filaments that stand out for the production of secondary metabolites such as antibiotics, antitumor, phytohormones and natural dyes. Given this, this study aimed to determine the biotechnological potential of actinomycetes of UFPEDA collection against *Candida* spp. To evaluate the biotechnological activity, 32 actinomycetes were tested against seven clinical isolates of *Candida* spp., Using different culture media (ALA, ISP-4, AY, ISP-3) and temperatures (37 ° C and 45 ° C). In the primary test, activity was detected only when the actinomycetes were grown in ISP-medium 3 to a temperature of 37 ° C. Of these, only 2 strains (6.25%) showed antifungal activity with inhibition zone ranging between 11 mm and 18 mm. Fermentation of strain (G24) was used to evaluate antifungal activity, biomass and pH for 5 days, using different media (MPE M1 and ISP-3), these parameters being monitored every 24 hours. The best medium for production of secondary metabolites ISP-3 was fermented for 48 h at pH 7.0, being evidenced inhibition zones 13 to 18 mm and biomass of 0.1 g / ml medium. Established conditions, the extraction of bioactive principle has been performed and demonstrated activity only when biomass extracted into ethyl acetate. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract ranged from 125 mg / mL to 62.5 mg / mL for *Candida* spp tested. In chemical prospecting, semi-purified fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC) was evidenced two fractions, one with antifungal activity and one with a natural dye. The morphological characteristics of isolated G24 were analyzed by optical microscopy, observed verticillated spores belonging to the genus *Streptomyces*. The 16S rDNA gene was amplified and sent to sequencing, being identified as *Streptomyces* sp. Given these results, we can conclude that the line (G24) (*Streptomyces* sp), isolated from the rhizosphere of *Caesalpinia pyramidalis* tul, the Caatinga biome, presents a significant antifungal activity and requires spectroscopic studies to characterize the bioactive compound and the dye.

Key-words: Actinobacteria. Bioactive metabolites. 16S rDNA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Actinobactéria: Características Gerais	17
3.2 Metabólitos secundários	18
3.2.1 Antibióticos	18
3.2.2 Corantes Naturais	21
3.3 Gênero <i>Candida</i>	22
3.4 Resistência Microbiana.....	23
3.5 Técnicas química para identificação dos Metabólitos Secundários.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Seleção e Reativação dos Micro-organismos	25
4.2 Micro-organismos Testes.....	26
4.3. Determinação da Atividade Antifúngica.....	27
4.3.1 Ensaio Primário em Meio Sólido	27
4.3.2 Ensaio Secundário em Meio Líquido.....	28
4.4 Análise Estatística	29
4.5 Extração dos Metabólitos secundários	29
4.5.1 Extração dos Metabólitos secundários da Massa Celular	29
4.5.2 Extração dos Metabólitos secundários do Líquido Metabólico	30

4.6 Atividade Antimicrobiana dos Extratos.....	32
4.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória.....	32
4.6.2 Análise Cromatográfica do Extrato Bruto Biologicamente Ativo	32
4.6.3 Bioautografia	33
4.7 Análises dos metabólitos secundários por CG-MS.....	34
4.8 Identificação das Actinobactérias	34
4.8.1 Microcultivo.....	34
4.8.2 Caracterização Molecular	35
4.8.3 Extração de DNA Total.....	35
4.8.4 Reação de Amplificação do DNA.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Ensaio Primário em Meio Sólido	37
5.2 Ensaio Secundário	39
5.3 Extração dos metabólitos ativos.....	40
5.3.1 Extração dos Metabólitos Secundários - Biomassa e Líquido Metabólico	40
5.4 Atividade Antimicrobiana do Extrato.....	41
5.5 Análise Cromatográfica do Extrato Bruto Biologicamente Ativo	42
5.6 Bioautografia	44
5.7 Análise dos metabólitos secundários por CG-MS	46
5.8 Identificação das Actinobactérias	48
5.8.1 Microcultivo.....	48
5.8.2 Caracterização Molecular	50
6. CONCLUSÃO	51
7. PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	61
APÊNDICES.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Esquema do teste antimicrobiano do ensaio em bloco de gelose	27
Figura 2.1	Esquema da fermentação e do teste de difusão em disco	29
Figura 3.1	Fluxograma da extração do princípio ativo da linhagem <i>Streptomyces sp</i> (G24)	31
Figura 4.1	Esquema da cromatografia em camada Delgada	33
Figura 5.1	Esquema da metodologia da Bioautografia	34
Figura 6.1	Halo de inibição do bloco de gelose das actinobactérias G24 (1) e G27 (2) testadas (A) <i>Candida albicans</i> (6401), (B) <i>C.guilliermondii</i> (6403), (C). <i>parapsilosis</i> (6431) e (D) <i>C.glabrata</i> (6392)	37
Figura 7.1	Perfil cromatográfico do extrato bruto da linhagem <i>Streptomyces sp</i> (G24) . Fase móvel ciclohexano: acetato de etila (1:1v/v)	42
Figura 8.1	Cromatografia em coluna (50gde sílica gel 60 0,040-0,063 mm), utilizando-se como fase móvel ciclohexano : acetato de etila(1:1v/v)	43
Figura 9.1	Bioautografia dos extratos brutos da biomassa da linhagem <i>Streptomyces sp</i> (G24)	44
Figura 10.1	Bioautografia da subfração 38 extratos brutos da biomassa da linhagem <i>Streptomyces sp</i> (G24)	45
Figura 11.1	Fragmentos característicos de compostos aromáticos	46
Figura 12.1	Espectro de massas fração F38	46
Figura 13.1	Rearranjo de McLafferty	47
Figura 14.1	Modelo de fragmentação em metilester saturado	47
Figura 15.1	Microcultivo da linhagem <i>Streptomyces sp</i> (G24) no meio ISP3	48
Figura 16.1	Micromorfologia dos gêneros investigados por microscopia óptica (40x). (A) e (B) indicam as características da <i>Streptomyces sp.</i> G24	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Antibióticos produzidos pelo gênero <i>Streptomyces spp</i>	19
Tabela 2.1	Principais corantes naturais encontrados na natureza, extraídos de plantas e animais.	21
Tabela 3.1	Principais corantes naturais produzido por micro-organismos (DUFOSSE, 2006)	21
Tabela 4.1	Actinobactérias selecionadas para realização dos testes de atividade antifúngica e respectivas temperaturas de isolamento	26
Tabela 5.1	Isolados clínicos de <i>Candida spp</i> da Micoteca URM – UFPE	26
Tabela 6.1	Representação das médias dos halos de inibição (em milímetros) no ensaio primário das linhagens G24 (A) e G27 (B)	38
Tabela 7.1	Resultados dos halos de inibição, em mm, dos extratos brutos da biomassa (A) e do líquido metabólico (B) da linhagem <i>Streptomyces sp</i> (G24) , obtidos a partir da extração com diferentes solventes e pHs, contra o isolado clínico <i>Candida guilliermondii</i> (6403)	40
Tabela 8.1	Determinação da CMI do extrato da biomassa de acetato de etila da linhagem G24	42

LISTA DE ABREVIACES

ALA	Arginina Levedura Agar
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CMF	Concentra Mínima Fúngica
CMI	Concentra Mínima Inibitória
DNA	cido Desoxirribonucleico
ISP 3	International Streptomyces Project Medium 3
M 1	Meio 1
MPE	Meio de Produ de Euromicina
NEU	cido etilborilaminoster
PCR	Rea em cadeia de polimerase
RMN	Ressonncia Magnética Nuclear
SAB	Meio Sabouraud
TLC	Thin Layer Chromatography
UFC	Unidade Formadora de Colnia
UFPEDA	Cole de Micro-organismos do Departamento de Antibioticos-UFPE
V	Volume

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais estão diretamente relacionados à diversidade química, pelo fato dos micro-organismos estarem sujeitos a constantes interações metabólicas e ambientais podendo originar novos metabólitos secundários de importância biotecnológica.

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas com alto teor de guanina e citosina, dentro desse grande grupo merece destaque o gênero *Streptomyces*, com elevada ocorrência no solo e são conhecidos pela sua importância industrial, uma vez que são considerados os principais produtores de diferentes metabólitos secundários, incluindo os antibióticos e corantes naturais (SUBRAMANI; ALBERSBERG, 2012).

Metabólitos secundários desses micro-organismos têm sido alvos de inúmeras pesquisas desde a descoberta da estreptomicina na década de 40. A maioria dos antibióticos utilizados na clínica médica humana e veterinária é produzida pelo gênero *Streptomyces*.

Dentre os antibióticos, destacam-se os grupos dos macrolídeos, aminoglicosídeos, cefalosporinas, glicopeptídeos e outros (CHATER, 2006).

Embora exista um grande número de fármacos os micro-organismos que podem adquirir resistência, por isso é necessário e urgente à busca por novos metabólitos secundários para controlar de forma mais eficaz e menos tóxica estes patógenos causadores de doenças.

Candida albicans é considerada a principal espécie do gênero *Candida* representando cerca de 90% dos processos infecciosos de candidíase. Algumas características, ou fatores de virulência, são responsáveis pela patogenicidade de *C. albicans* como adesão a substratos inertes e biológicos, formação de tubo germinativo, variabilidade fenotípica e genotípica, variabilidade antigênica e imunomodulação do hospedeiro. (ÁLVARES et al., 2007). Esse gênero engloba patógenos oportunistas, que devido ao desequilíbrio parasita-hospedeiro, caracterizam-se por causar infecções superficiais a invasivas, expondo o paciente a sérios riscos. (VIRIATO,2014;CALDERONE, FONZE,2001).

Processos infecciosos resistentes a antibióticos já existentes, estão relacionados à espécie *Candida albicans*, porém nos últimos tempos infecções por outras espécies de *Candida não-albicans* tem sido elevado. Dentre essas espécies se destacam *C. kusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C.glabrata* e *C. guilliermondii*.(BASSETI et.al. 2006; VIRIATO,2014).

Por outro lado, o interesse mundial na produção de corantes naturais é bastante elevado, devido a sérios problemas provocados pela indústria de corantes sintéticos. Estes

problemas estão relacionados a reações alérgicas, efeitos tóxicos (mutagenicidades e potencial cancerígeno), intolerâncias e ambiental. Corantes microbianos são uma alternativa por não apresentarem problemas de sazonalidade, baixa toxicidade e menos prejudicial ao meio ambiente.

O nosso grupo de pesquisa vem investigando a diversidade de actinobactérias do bioma Caatinga do Nordeste brasileiro, considerando que pouco se conhece sobre a diversidade dessas bactérias neste habitat. É importante salientar que condições ambientais extremas representem um local propício e capaz de revelar a presença de actinobactérias produtoras de novas moléculas bioativas que são importantes para o controle de micro-organismos resistentes. Portanto, esta investigação poderá trazer importantes informações sobre o potencial biotecnológico das actinobactérias isoladas do bioma caatinga.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial biotecnológico de actinobactérias com relação à produção de metabólitos bioativos e pigmentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar actinobactérias produtoras de metabólitos secundários: antifúngico e pigmento;
- Avaliar a influência das condições de fermentação na produção dos metabólitos secundários;
- Determinar a concentração mínima inibitória do extrato bruto bioativo;
- Avaliação dos compostos secundários presentes no extrato bruto;
- Identificar a Actinobactéria produtora do composto bioativo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Actinobactéria: Características Gerais

A palavra actinomiceto, atualmente mais conhecida como actinobactéria, é derivada do grego “aktis” (traço) e “mykes” (fungo), sendo aplicada principalmente às bactérias que apresentam uma organização filamentosa, muitas vezes ramificada, formada por um micélio vegetativo ou micélio aéreo. Esses micro-organismos também são capazes de produzir cadeias de esporos semelhantes aos conídios, de fungos o que os tornam muito semelhantes a estes micro-organismos eucarióticos (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967).

As actinobactérias compreendem um grupo de bactérias Gram-positivas, apresentando parede celular formada por isômeros do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP), ácido diamino lisina, ácido diamino ornitina ou ácido diamino butírico (ANDERSON; WELLINGTON, 2001; LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967), além de apresentarem crescimento lento (ARAÚJO, 1998). Há interesse científico, desde a década passada, por seus metabólitos secundários bioativos de importância biotecnológica (BALLAV; DASTAGER; KERKAR, 2012).

Taxonomicamente, as actinobactérias são classificadas dentro do Filo e da Classe Actinobacteria, que compreende 16 ordens, 43 famílias, 201 gêneros e centenas de espécies que compartilham entre si o DNA com alto teor de guanina e citosina em seu DNA, como relatado no Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (2012). A presença dessas bases nitrogenadas pode variar de 51% a mais de 70% em *Corynebacterium* e *Streptomyces*, respectivamente.

Actinobactérias são micro-organismos cosmopolitas, ou seja, estão distribuídos nos mais variados ecossistemas, principalmente no solo. Esses micro-organismos vivem em sua maioria como saprofíticos, executando um importante papel biológico como o da reciclagem de biomateriais, enquanto outros estão em relação mutualística ou parasitária com plantas e animais (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Espécies de Actinobactérias podem apresentar reprodução por fragmentação das hifas, como o gênero *Nocardia*, enquanto outros gêneros apresentam conidiósporos ou esporangiósporos, que são esporos assexuais. Os esporos resistem bem à dessecação, tendo um grande valor na preservação da espécie, porém, não são muito resistentes a temperaturas elevadas. Os esporos são formados quando ocorre escassez de nutrientes, podendo apresentar

motilidade como ocorre no gênero *Actinoplanes* (EMBLEY; STRACKEBRABDT, 1994; FLÄRDH; BUTTNER, 2009).

As actinobactérias apresentam metabolismo variado e utilizam diferentes fontes de carbono e energia diversificada com ocorrência de exemplares heterotróficos ou quimiotróficos (KENNEDY, 1999). Apresentam outras características como: crescimento em meio aeróbio, mesófilo e pH neutro (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). De acordo com o gênero, podem exibir diferentes micromorfologias, como cocóide em *Micrococcus*, coco bacilo em *Arthrobacter*, fragmentação de hifas em *Nocardia* spp. ou micélio ramificado e cadeia de esporos altamente diferenciados como podem ser observado no gênero *Streptomyces* (LETEK et al., 2012).

O gênero *Streptomyces* se destaca como um dos micro-organismos mais promissores para produção de diferentes classes de antibióticos, além de agentes antitumorais, produtores de enzimas de importância industrial.

3.2 Metabólitos secundários

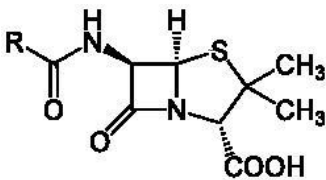
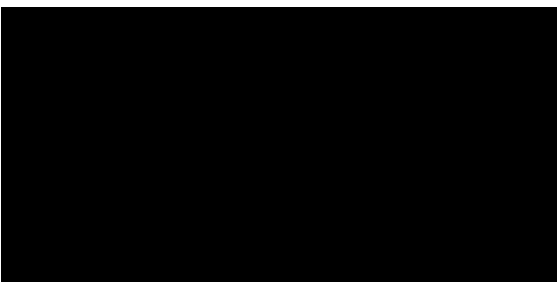
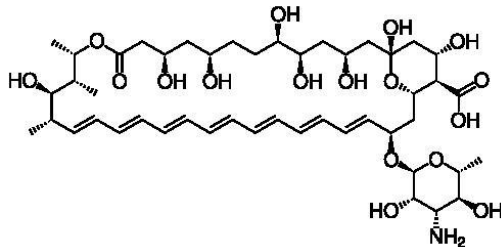
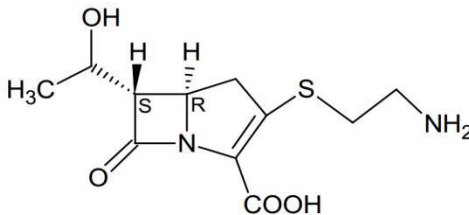
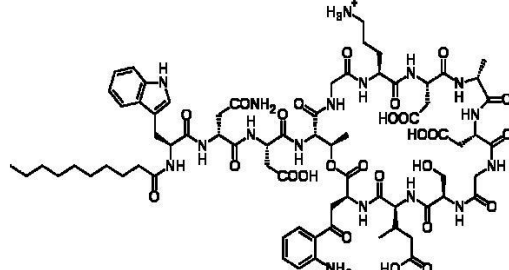
O desenvolvimento dos micro-organismos no meio ambiente os leva a produzir compostos que os auxiliam nas interações com outros seres vivos, como a produção de metabólitos diferentes, características físicas e químicas, e na sobrevivência das espécies, em diferentes habitat (EVANGELISTA-MARTÍNEZ; MORENO-ENRÍQUEZ, 2007).

Para os humanos os benefício trazidos pelos metabólitos secundários são diversos, sendo aplicado na indústria farmacêutica, agroquímica e corantes.

3.2.1 Antibióticos

As actinobactérias são as maiores produtoras de antibióticos, destacando-se o gênero *Streptomyces* como o principal produtor de metabólitos bioativos. Na tabela 1.1, estão exemplificados alguns antimicrobianos obtidos por *Streptomyces* spp.

Tabela 1.1: Antimicrobianos produzidos pelo gênero *Streptomyces* spp.

Estrutura Química	Antibióticos	Espécies
		1929
	Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i> 1950
	Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i> 1956
	Tienamicinas	<i>Streptomyces cattleya</i> 1976
	Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i> 1980

Segundo Vuillemin (1889) *apud* Ribeiro et. al. (2009), o antagonismo entre os seres vivos se define como o processo natural de seleção, onde um ser destrói o outro para sobreviver. A definição de antibióticos foi proposta por Waksman (1942) como substâncias produzidas por micro-organismos vivos, para agir na sua defesa contra seus patógenos. (CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009; TAVARES, 2001).

Os compostos bioativos podem ser utilizados por três diferentes formas: a molécula bioativa é produzida diretamente por fermentação; o produto da fermentação é usado como material de partida para a modificação química subsequente (derivatização); ou ainda, a molécula é utilizada como composto protótipo para a síntese química. A composição química dos compostos bioativos de origem microbiana é muitas vezes complexa, incluindo diversidades estereoquímica que, em muitos casos, torna difícil a síntese química (THOMAS et al., 2011).

Segundo Liu et. al. (2010), dos metabólitos bioativos obtidos a partir de micro-organismos, 45% são produzidos por actinobactérias, 38 % por fungos e 17% por outros grupos de bactérias. Esses metabólitos incluem compostos com diferentes atividades biológicas, como: antibacteriana (CHAROENSOPHARA et al., 2008), antifúngica (OLIVEIRA et al., 2010), antioxidante (ZHONG et al., 2011), antiviral, antiparasitária (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010), anti-inflamatória, inseticida (EL-KHAWAGH; HAMADAH; ELSHEIKH, 2011) e citotóxica (SHAABAN et al., 2011).

O gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de diferentes classes de antibióticos como: clorafenicol, estreptomicina, eritromicina, neomicina, nistatina e tetraciclina, além de agentes antitumorais, aminoácidos e vitaminas (PETROVA; VLAHOV, 2006; SIVARAMKRISHNA; MAHAJAN, 2009).

Entre os anos de 1980-2000, houve uma redução na identificação de novos protótipos de antibióticos, ao mesmo tempo em que houve uma elevada incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES et. al., 2010).

O isolamento de novas estirpes de *Streptomyces* ao longo dos anos também tem se tornando cada vez mais escasso e esse fato implica diretamente na descoberta de novos antibióticos (CWALA; IGBINOSA; OKOH, 2011). Sendo este um dos motivos para diminuição na produção de novos medicamentos no mercado (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

3.2.2 Corantes Naturais

As variações de cores encontradas na natureza sempre impressionaram e encantaram pessoas, o que levou ao interesse pela descoberta e isolamento de organismo vivo, plantas e animais, que produzam corantes.

Os corantes naturais mais encontrados na natureza são extraídos de plantas e animais os quais são divididos em classes: tetrapirrol, tetraterpeno ou caroteno, flavonóides, antraquinonas e betalaína (JACOBSON; WASILESKI, 1994) como observado na tabela 2.1, além de micro-organismos (DUFOSSE, 2006). Tabela 3.1.

Tabela 2.1 : Principais corantes naturais encontrados na natureza, extraídos de plantas e animais.

Classe	Corante	Cor	Fontes de obtenção
Tetrapirrol	Clorofila	Verde	Folhas verdes
Tetraterpeno	β -caroteno	Amarelo	Cenoura
	Astaxantina	Vermelho	Microalgas, Salmão, Camarão.
	Bixina	Vermelho	Sementes de urucum
Flavonóide	Luteolina	Amarelo	Frutas, flores e vegetais.
	Cianidina	Vermelho	Frutas: cereja, morango, açaí.
Antraquinona	Ácido	Vermelho	Inseto: Cochonilha
	carmínico		
Betalaína	Betanina	Vermelho	Beterraba

Fonte: Mapari et al., 2005

Tabela 3.1: Principais corantes naturais produzidos por micro-organismos

Molécula	Cor	Micro-organismos
Ankaflavia	Amarelo	<i>Monascus spp.</i> (fungo)
Astaxantina	Vermelho-rosa	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> (bactéria)
Cantaxantina	Vermelho escuro	<i>Bradyrhizobium ssp.</i> (bactéria)
Rubrolone	Vermelho	<i>Streptomyces echinoruber</i> (bactéria)
Zeaxantina	Amarelo	<i>Flavobacterium spp.</i> (bactéria)
Licopeno	Vermelho	<i>Blakeslea trispora</i> (fungo)

Fonte: Dufossé, 2006.

Segundo Aberoumand (2011) a quantidade disponível destes corantes na natureza é insuficiente para suprir as necessidades industriais atuais, fazendo-se necessário o uso da produção biotecnológica, a qual possibilita a obtenção de corantes naturais em grande escala.

Contudo, a produção biotecnológica de corantes naturais utilizando processos fermentativos de micro-organismos é o ponto de partida para a viabilidade econômica destes corantes, por apresentar possibilidades de aprimoramento da produção, como a utilização de substrato de baixo custo ou resíduos indústrias, pequenos espaços para produção e além de não ter limitações das condições ambientais. (Valduga et. al. 2009).

Além de produzir diversos antibióticos, o gênero *Streptomyces* também vem sendo estudado pela indústria alimentícia e têxtil pela capacidade de produzir corantes naturais.

Zhu et.al (2011) conseguiram isolar da rizosfera de um tomateiro um *Streptomyces caeruleatus* produtor de um corante azul escuro.

Chintapenta et. al. (2014) isolaram do delta do Godavari na Índia, de um mangue um fungo *Penicillium sp.* produtor de corante vermelho.

Uma preocupação para a utilização dos corantes naturais originadas de micro-organismos é a dificuldade da aprovação pelos órgãos fiscalizadores, por exigirem vários testes toxicológicos.

3.3 Gênero *Candida*

A levedura *Candida* pertence ao reino Fungi, classe dos basidiomicetos, família *Cryptococcaceae*, com ocorrência de aproximadamente 200 espécies, dentre as quais merece destaque *Candida albicans* como a mais recorrente como patógeno humano (MALUCHE et al., 2008).

Esse gênero apresenta ampla distribuição e ocorre em vários ambientes e alimentos, além de se destacar como patógeno humano (GUARRO et al., 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004). São micro-organismos comensais que se tornam patógenos quando ocorre o desequilíbrio na relação parasito/hospedeiro (BRION et al., 2001; SIDRIM; ROCHA, 2004).

O mecanismo de defesa do hospedeiro pode sofrer alterações causadas por doenças degenerativas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e mudanças fisiológicas (COLOMBO et al., 2003).

Segundo Soares et al. (2013), uma das preocupações no período neonatal é a candidemia, infecção da corrente sanguínea ocasionada por *Candida* spp, principalmente

entre recém-nascidos de muito baixo peso que, durante internação em UTIN (Unidade de tratamento intensivo neonatal), são expostos a situações que levam à ruptura das barreiras de defesa constituídas por pele e mucosas.

A espécie mais associada aos processos de fungemia é *Candida albicans*, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Porém, nos últimos anos, cerca de 30 a 40% das infecções estão associadas à *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (BASSETI et al., 2006).

Desde a década de 50, o tratamento frente às infecções fúngicas é realizado com anfotericina B e os azólicos como fluconazol e itraconazol. Apesar de mais vantajosos que a anfotericina B, os compostos azólicos apresentam limitações como espectro de atividade, toxicidade e desenvolvimento de resistência, principalmente nas espécies de *Candidas* não *albicans*. Com essas limitações, novos fármacos vêm sendo desenvolvidos, entre eles os triazólicos, voriconazol e posaconazol e a classe equinocandina, caspofungina e micafungina (SABLE et al., 2008).

Alterações no alvo molecular do fármaco, produção de enzimas fúngicas que degradam as drogas e uma redução na concentração intracelular do fármaco são mecanismos moleculares envolvidos na resistência a antifúngicos. Isso representa um sério problema, porque os micro-organismos desenvolvem resistências a múltiplas drogas (PEMAN et al., 2011).

O aumento de espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos representa um enorme risco à saúde pública, necessitando de medidas adequadas para controle de infecções.

3.4 Resistência Microbiana

Nos últimos anos, a incidência de infecções fúngicas vem aumentando de forma considerável, pois o uso indiscriminado de antibióticos, usados em situações terapêuticas, vem elevando o aparecimento de fungos e bactérias resistentes, provocando uma redução eficiente dos mesmos, sendo necessárias outras intervenções para obtenção de novos fármacos com aplicação médica (RIBEIRO; PINTO; PEDROSA, 2009).

O desenvolvimento de antimicótico específicos para o patógeno é um desafio, pois os fungos e seus hospedeiros são organismos eucariotos e possuem várias vias metabólicas e estruturas celulares comuns. Dessa forma, os agentes antifúngicos que afetam as vias

metabólicas dos fungos frequentemente afetam as vias correspondentes às células hospedeiras, tornando-os tóxicos.

Atualmente, as doenças infecciosas são uma das principais causas de morte no mundo, representando 25% (13,3 milhões). Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA), cerca de 2 milhões de infecções resistentes a drogas são relatadas a cada ano, ocasionando aumento de custos para o sistema de saúde (34 bilhões de dólares/ano) (MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012).

A resistência às drogas antifúngicas pode acontecer por mecanismos específicos, como mutações nos receptores de captação do medicamento, diminuição do teor de ergosterol, mutação gênica e superexpressão de outros genes (RODLOFF et. al., 2011).

A superexpressão dos genes *erg* e gene *erg11* em *C. albicans* pode ser causada pela mutação de ativação no seu regulador Upc2 (DUNKELET al., 2009), aumentando a resistência das células a diferentes azóis e também a medicamentos que agem sobre outras etapas na via da biossíntese de ergosterol, como a terbinafina (uma alilamina) inibidora da enzima esqualeno-epoxidase (MORSCHHÄUSER, 2009).

Neste sentido, a seleção de espécies microbianas é um aspecto importante, uma vez que não existe uma fonte notável para a produção de metabólitos secundários estruturalmente diversos que apresentam atividade biológica de relevância farmacêutica (BERDY, 2005).

Contudo, os problemas de resistência, a sensibilidade do paciente e incapacidade de controlar certas doenças infecciosas tem dado um impulso para a busca contínua de novos antibióticos em todo o mundo (ARASU, 2009).

3.5 Técnicas química para identificação dos Metabólitos Secundários

A descoberta e identificação de compostos químicos é um grande desafio na bioprospecção de novos fármacos. Isso é possível se houver a interação da multidisciplinaridade entre a química e a biologia para chegarmos ao produto desejado com características importantes para a indústria biotecnológica.

Com o progresso das técnicas cromatográficas de isolamento (LC-MS, LC-RMN, HPLC-UV-VIS, entre outras) e técnicas de identificação espectrométricas (RMN unidimensionais, Cristalografia de Raio-X e Massa) houve um aperfeiçoamento na caracterização química de novos metabólitos secundários, aumentando em escala exponencial a quantidade de novos compostos (BÉDYS, 2005).

A melhora da sensibilidade desses aparelhos tornou possível realizar a elucidação de novas estruturas química com quantidades mínimas do composto alvo. Porém, algumas características podem dificultar o isolamento e a identificação desses compostos, por exemplo, a solubilidade em água, estereoquímica e a sua estabilidade. Além disso, talvez o maior desafio para a química de produtos naturais seja a produção em escala industrial que permita a obtenção destes compostos a custos acessíveis. Diante disto, o interesse em micro-organismos como fonte de compostos naturais, por ser de origem ecologicamente e economicamente viável, e com abordagem sistemática na manipulação genética das linhagens chamadas de OSMAC (uma cepa - muitos compostos) pode aumentar o rendimento e diversidade de compostos (HOFS et al., 2000; BODE et al., 2002; CHRISTIAN et al., 2005; SCHERLACH; HERTWECK 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção e Reativação dos Micro-organismos

Foram utilizadas 32 linhagens (Tabela 4.1) de Actinobactérias isoladas de diferentes amostras da rizosfera da planta catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* tul.) da Caatinga, pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). As actinobactérias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio ISP-2 líquido (Anexo A), cultivadas sob agitação 160 rpm por cinco dias . Após esse período, foram semeadas em placa de Petri contendo os meios ALA e ISP₃ (Anexo B e C) e incubadas por mais cinco a dez dias, a 30°C e/ou 45°C, dependendo da temperatura de isolamento. Posteriormente, foi realizada a análise da micromorfológica de cada linhagem utilizando a técnica de Shirling e Gottlieb (1966) para confirmação e identificação das mesmas a nível de gênero.

Tabela 4.1 - Actinobactérias selecionadas para realização da atividade antifúngica.

Códigos	Códigos	Códigos	Códigos
CA 03	CA 15	CA 26	CB 04
CA 04	CA 16	CA 29	CB 06
CA 05	CAR 13	CA 32	CB 11
CA 09	CA 17	CA 35	CB 12
CA 10	CA 22	CA 39	CB 13
CA 12	CA 23	G24	CB 17
CA 13	CA 24	G27	CB 18
CA 14	CA 25	CB 02	CB 19

4.2 Micro-organismos Testes

Seis isolados clínicos de *Candida* spp provenientes da UTI neonatal, cedidos pela Coleção- URM do Departamento de Micologia- UFPE, e a *C. albicans* UFPEDA 1007 foram utilizados nos testes antimicrobiano (Tabela 5.1). As culturas foram reativadas sob agitação (200 rpm) em meio Sabouraud líquido – SAB (Anexo D), 30° C, por 48 horas. Após o período de incubação, foram semeadas em meio SAB sólido e posteriormente estocadas sob-refrigeração, para realização dos testes de antagonismo.

Tabela 5.1: Isolados clínicos de *Candida* spp da Micoteca URM - UFPE

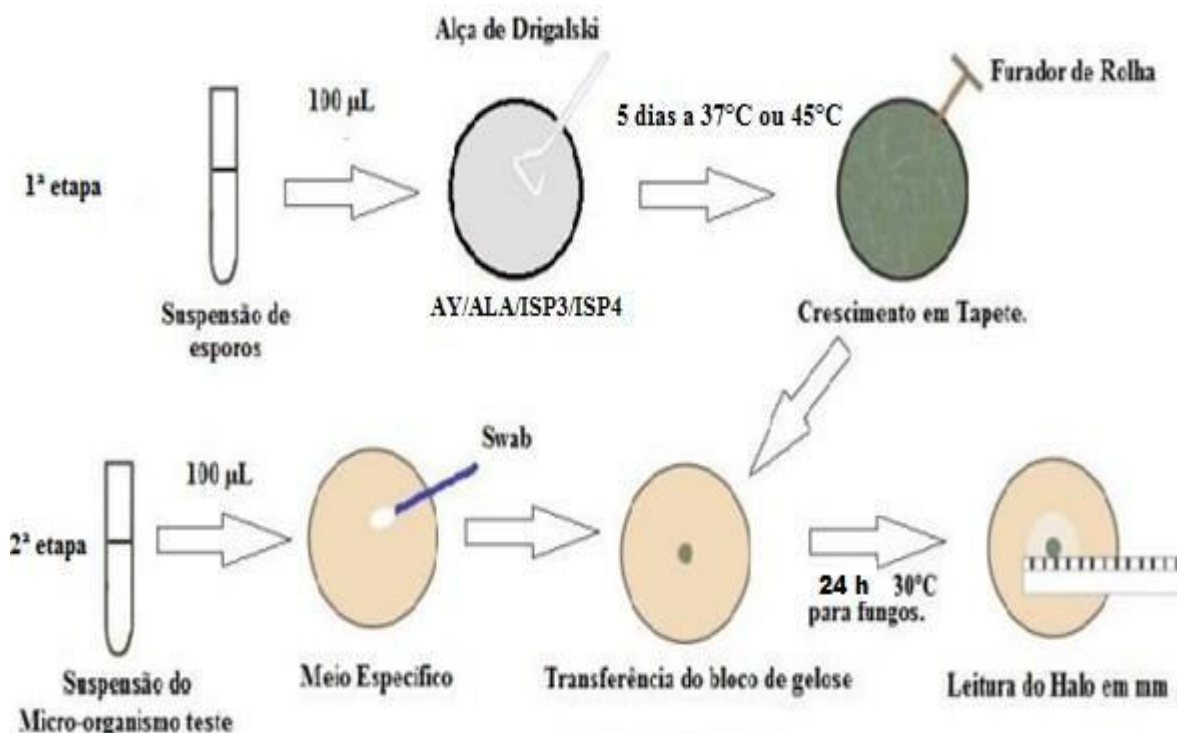
Registro URM	Espécies
6401	<i>Candida albicans</i>
6403	<i>C.guilliermondii</i>
6431	<i>C.parapsilosis</i>
6395	<i>C.albicans</i>
6392	<i>C.glabrata</i>
6281	<i>C.pelliculosa</i>

4.3. Determinação da Atividade Antifúngica

4.3.1 Ensaio Primário em Meio Sólido

Foi realizada uma suspensão de esporos (10^8 UFC/mL) das actinobactérias e 100 μ L foram espalhadas com a alça de Drigalski nos meios ALA, ISP₃, ISP₄, AY (Anexo E) e cultivadas por 5 dias a 37° C e/ou 45°C, para obtenção de um crescimento em forma de tapete. Em seguida, blocos de gelose de 8 mm de diâmetro foram removidos para realização do teste. As placas foram previamente semeadas com o micro-organismo teste numa concentração de células padronizadas, 10^8 UFC/mL (análise da densidade óptica num comprimento de onda de 600 nm), segundo a CLSI (2008). Os blocos de gelose de cada actinobactéria foram colocados sobre essas placas e incubados por 24 horas a 37° C e 45°C (Figura 1.1). Os resultados foram determinados pela medida dos diâmetros dos halos de inibição (mm). Os testes foram realizados em triplicata (ICHIKAWA et al. 1971).

Figura 1.1 - Esquema do teste antimicrobiano do ensaio em bloco de gelose (Bernardo, 2012).



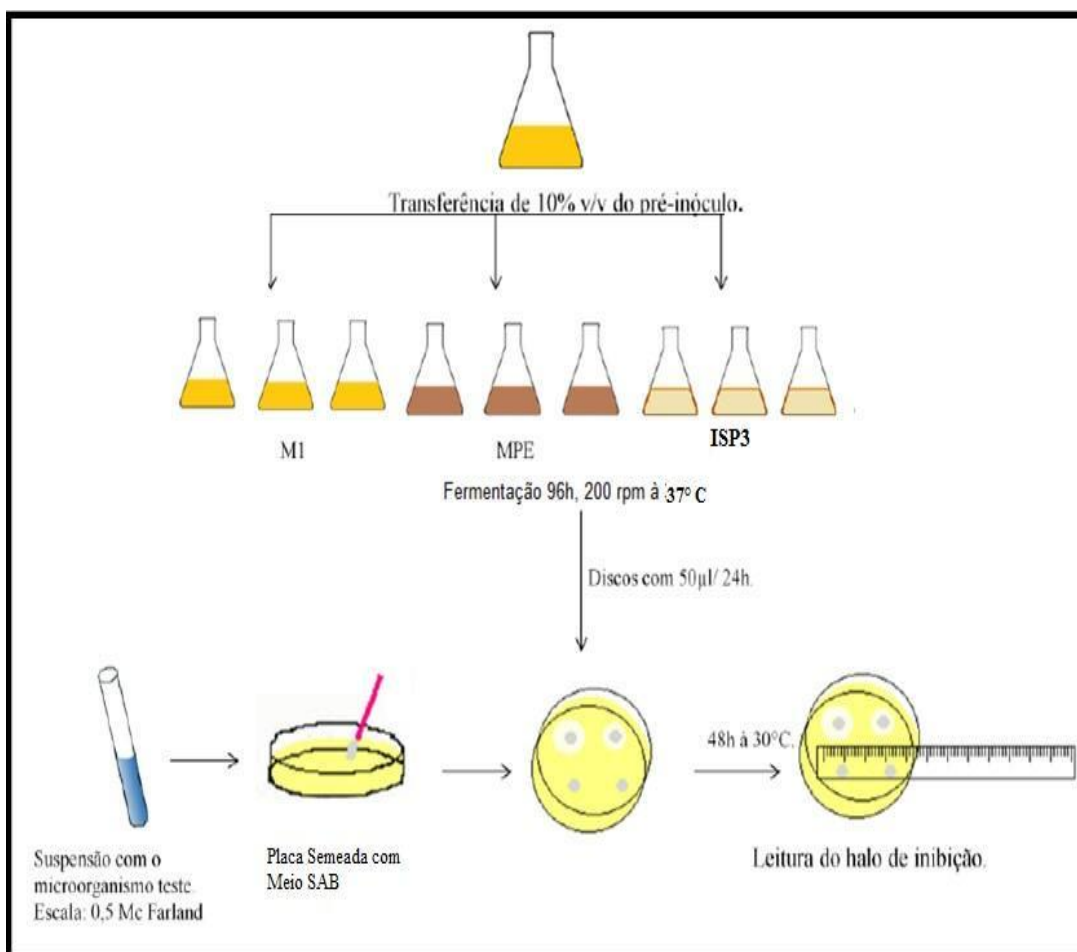
4.3.2 Ensaio Secundário em Meio Líquido

O ensaio secundário teve como objetivo avaliar o melhor tempo e produção de metabólito bioativo através da fermentação em diferentes meios de cultura. Com isso, foi selecionada a linhagem que apresentou a melhor atividade antimicrobiana no ensaio primário.

No pré-inóculo, a linhagem foi cultivada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios líquidos MPE (Anexo F), M1 (Anexo G) e ISP 3 (Anexo C), os quais foram mantidos sob agitação (200 rpm) a 37° C por 48 horas. Em seguida, 10% (v/v) do pré-inóculo foram transferidos para Erlenmeyers (250 mL), contendo 50 mL dos meios líquido para realização da fermentação.

A cada 24 horas de cultivo, alíquota (1 mL) do mosto fermentado foi retirado para avaliar pH, biomassa e atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos teste que se apresentaram sensíveis no bloco de gelose. Cada alíquota foi centrifugada (12.000 rpm por 5 min.) para separar o líquido metabólico da massa celular e discos de papel de 10 mm de diâmetro foram umedecidos com 50 µL do líquido fermentado e, em seguida, transferidos para placas de Petri contendo 10 mL dos meios de cultura (SAB) específicos que foram previamente semeados com 100 µL de suspensões padronizadas de cada micro-organismos teste (10^8 UFC/mL), conforme descrito no item 4.2. Em seguida, as placas foram cultivadas a 37° C por 24 horas. O teste foi realizado em duplicata e os resultados determinados pela a média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição em milímetro (figura 2.1) (BAUER et al., 1966).

Figura2.1 : Esquema da fermentação e do teste de difusão em disco(BERNARDO, 2012).



4.4Análise Estatística

Os testes estatísticos em relação à atividade antimicrobiana, frente a diferentes micro-organismos patogênicos, foram realizados visando à seleção da linhagem com maior potencial de inibição. A análise de variância ($p < 0,05$) e o teste de Tukey (5%) foram realizados de acordo com Bluman (2001) no programa Excel 2010 e Minitab versão 15.

4.5 Extração dos Metabólitos secundários

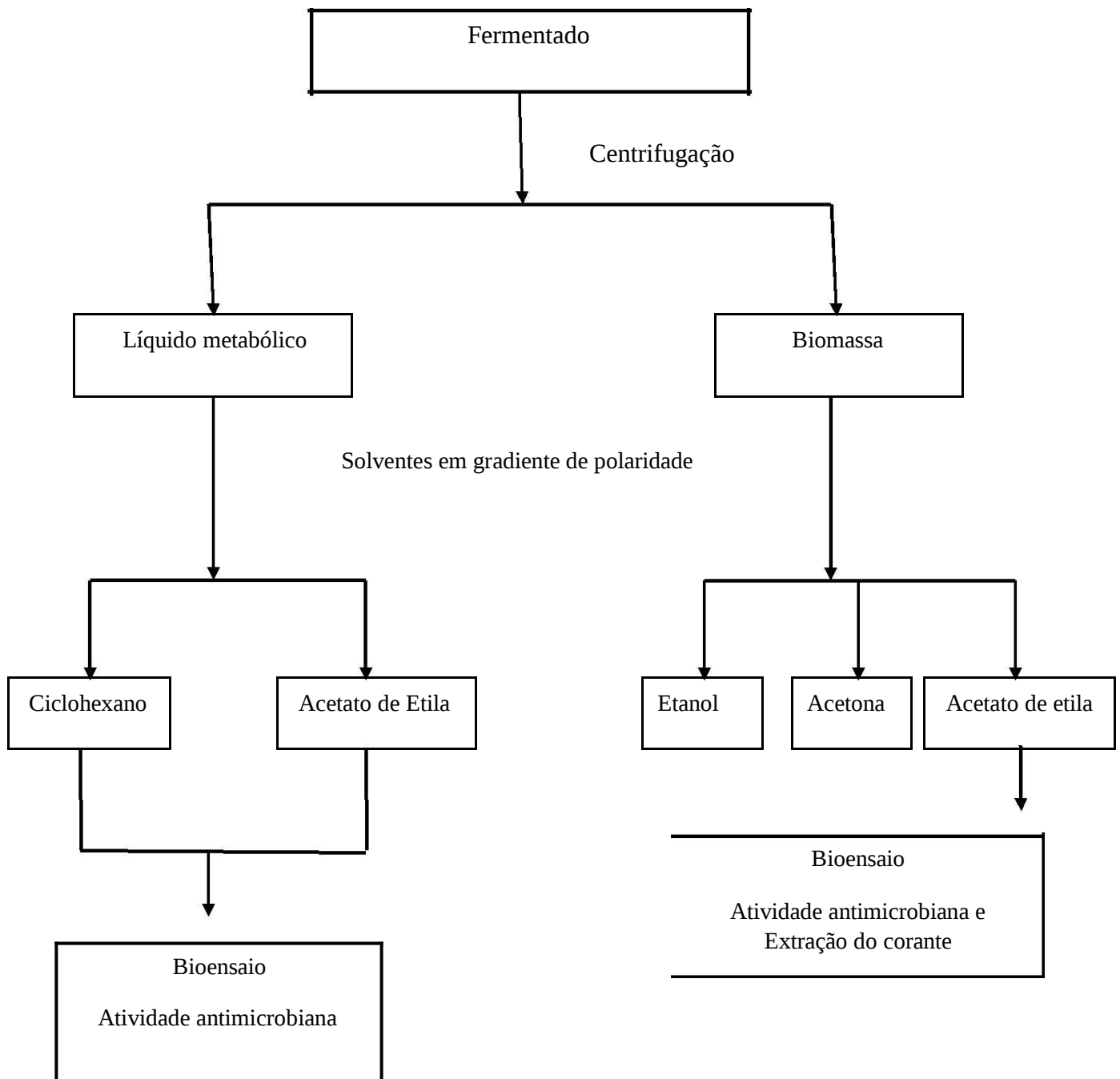
4.5.1 Extração dos Metabólitos secundários da Massa Celular

A massa celular foi tratada com acetona, acetato de etila e etanol em gradiente de polaridade, para extração do princípio ativo (Fig. 3.1). A cada 1 g de peso úmido da massa celular foram adicionados 10 mL de cada solvente e colocado sob agitação durante 20 min. para extração dos Metabólitos secundários presentes na biomassa. Em seguida, o material

obtido foi centrifugado a fim de separar a fase líquida (solvente) da fase sólida (biomassa). Discos de papel de (10 mm) foram embebidos com 50 μ L dos líquidos extraídos e realizado o ensaio antimicrobiano conforme descrito anteriormente (item 4.3.2).

4.5.2 Extração dos Metabólitos secundários do Líquido Metabólico

Para a extração dos metabólitos secundários do líquido metabólico (Fig. 3.1) foram usados os seguintes solventes: ciclohexano e acetato de etila na, proporção de 2:1 (v/v), em gradiente de polaridade, sendo colocados sob agitação por 20 minutos. Posteriormente, o líquido resultante é deixado em repouso em funil de separação para observar e separar as duas fases obtidas, a fase orgânica e fase aquosa. Em discos de papel de (10 mm) foram adicionado 50 μ L dos líquidos extraídos e foi realizado o ensaio antimicrobiano conforme descrito anteriormente (item 4.3.2).

Figura 3.1: Fluxograma da extração do princípio ativo da linhagem G24 (*Streptomyces sp*)

4.6 Atividade Antimicrobiana dos Extratos

Os metabólitos bioativos presentes na biomassa foram utilizados para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), análise cromatográfica e bioautografia das frações frente aos isolados clínicos (Tabela 2.1).

4.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória

A CMI foi realizada por meio da técnica de microdiluição, em placa de multipoços com 96 poços. Nesse ensaio, foram distribuídos volumes de 180 μL de meio líquido Sabouraud na coluna 1 e 100 μL nas demais colunas e, em seguida, adicionados mais 20 μL do extrato (1000 μg a 0,48 μg) nos poços da coluna 1 e realizada a microdiluição até a coluna 12 (A – C), já nas linhas D, E e F foram adicionados 20 μL de Anfotericina B (128 μg a 0,0625 μg), como substância padrão. Na linha H correspondem aos controles, os poços 1 a 3 trata-se do controle negativo (apenas o meio de cultura), nos poços 5 ao 7 controle positivo e nos poços 9 ao 11 controle do solvente adicionou-se 10 μL da suspensão mais 10 μL do solvente DMSO (dimetilsulfóxido). Os poços de 1 a 12 (A - F), controle positivo e o controle do solvente foram inoculados com 10 μL da suspensão microbiana padronizada. O ensaio foi realizado em triplicata para cada micro-organismos teste. As microplacas foram cultivadas a 37° C por 48h.

Após o cultivo, foram adicionadas 15 μL da solução reveladora de resazurina sódica a 0,01% e incubadas por 2 h, para observar a alteração colorimétrica pela mudança de azul para rosa. A CMI foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe parcialmente o crescimento dos micro-organismos teste.

A concentração mínima fungicida (CMF) foi determinada pelo semeio dos poços azuis em placas de Petri contendo o meio sólido Sabouraud. As placas foram incubadas a 37° C por 24h e observado qual concentração não apresentou crescimento dos micro-organismos teste.

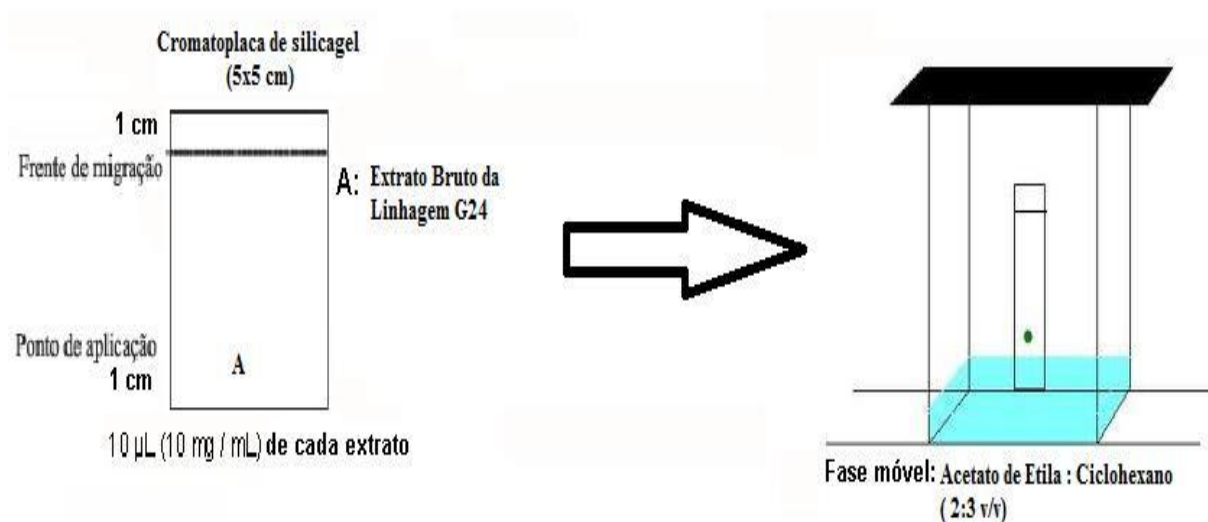
4.6.2 Análise Cromatográfica do Extrato Bruto Biologicamente Ativo

A análise foi realizada em cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck). Alíquotas de 10 μL do extrato bruto em acetato de etila da linhagem ativa foram aplicadas nas cromatofolhas (5x5 cm) e utilizado

como eluente acetato de etila : ciclohexano em diferentes proporções, para verificar o comportamento cromatográfico do extrato bruto bioativo (Figura 4.1).

Os cromatograma foram revelados com vapores de I_2 (revelador universal), lâmpada UV, anisaldeído/ácido sulfúrico e Dragendorff, para identificar as principais classes de compostos presentes no extrato bruto. O I_2 complexa-se com compostos insaturados, de modo que placas que os contem, ao serem colocadas em uma câmara contendo cristais de iodo, apresentam pontos amarronzados. Compostos UV-ativos, aparecem como manchas escuras em fundo fluorescente, quando a placa é iluminada com lâmpada de luz ultravioleta. O revelador anisaldeído/ácido sulfúrico, permite detectar esteróides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, terpenos, antibióticos (macrolídeos e tetraciclina) e micotoxinas – tricotecenos. Dragendorff permite detectar compostos nitrogenados como alcalóides (Wall, 2005; Jork, Funk, *et al.*, 1990).

Figura 4.1: Esquema da cromatografia em camada Delgada. (Silva,2013. Modificado)

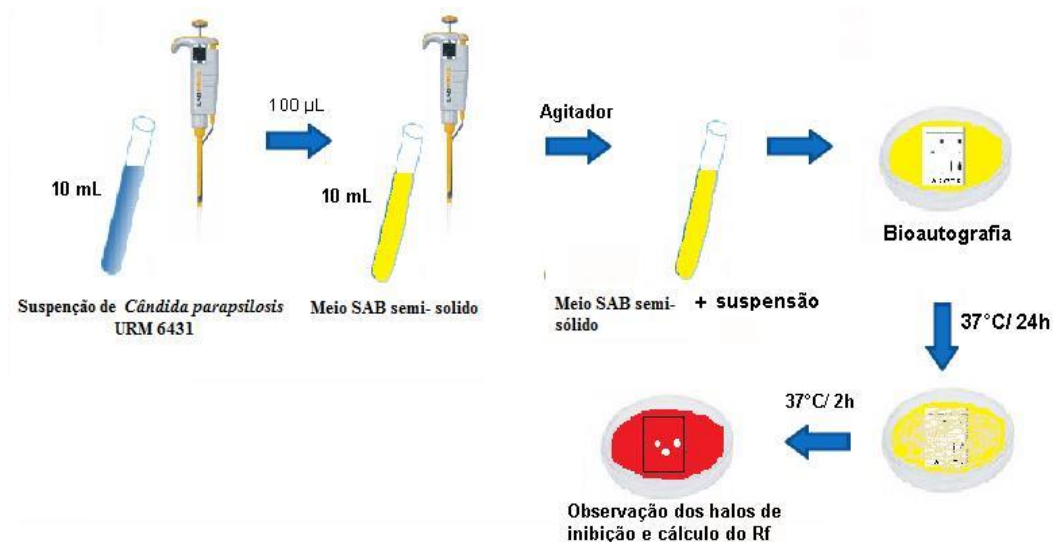


4.6.3 Bioautografia

A fração antimicrobiana foi determinada baseando-se na técnica de Bioautografia em CCD (SRIDHAR *et al.*, 2003; SCHER *et al.*, 2004). Foi aplicado 1 μ L do extrato bruto obtido no item 4.5.2 em placa de sílica gel 60 F254 (Merck), em acetato de etila:ciclohexano (3:7) v/v. Após a corrida cromatográfica, foi realizada a revelação biológica aplicando sobre a placa o meio de cultura SAB fundido, inoculado com uma suspensão de *C. parapsilosis* URM 6431

com densidade de 0,5 na escala de Mac Farland e incubada a 37°C por 24 horas. A fração onde foi evidenciada a presença de um halo de inibição frente ao micro-organismo teste foi denominada de fração ativa (Figura 4.1). Esta fração foi analisada por espectroscopia de massa.

Figura 5.1: Esquema da metodologia da bioautografia (Silva, 2013, Modificado).



4.7 Análises dos metabólitos secundários por CG-MS.

Os espectros de massas foram registrados utilizando aparelho Cromatógrafo Thermo Trace 1300 ISQ Series Single Quadrupole CG-MS Systems da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental–UFPE.

4.8 Identificação das Actinobactérias

4.8.1 Microcultivo

Para observação da micromorfologia, cada linhagem foi cultivada pela técnica de microcultivo em placa a 30 ou 37° C, segundo técnica de Shirling e Gottlieb (1966), que consiste em inocular o micro-organismos com o auxílio de uma alça de platina em formato de L contendo o meio de cultura sólido. Em seguida, inserir lamínulas com inclinação de 45° sobre o meio de cultura, de forma a induzir o crescimento do micélio aéreo sobre a lamínula para observação microscópica em objetiva de 40x após 12 a 20 dias.

4.8.2 Caracterização Molecular

A linhagem que apresentou atividade antifúngica foi escolhida para identificação molecular em nível de espécie.

4.8.3 Extração de DNA Total

A extração de DNA foi realizada a partir do cultivo em meio líquido ISP-2 por 24 horas a 37° C com agitação de 150 rpm, seguindo a metodologia de Sambrook et al. (2012). Alíquotas de cada cultura foram centrifugadas para obtenção da biomassa que foi tratada com 1,5 mL de tampão TAS (Anexo H) e centrifugada a 12000 rpm por 15 min. A biomassa foi novamente ressuspendida em 300 µL de TES, 24 µL de lisozima (40 mg.mL⁻¹), 3 µL de RNase e colocada em banho-maria a 37° C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 150 µL de SDS 10% (Anexo G) e 5 µL de proteinase K (150 µg/mL) e colocadas no banho-maria a 60° por 60 min. Após esse procedimento, centrifugou-se as amostras a 12000 rpm por 5 min., em seguida, transferiu-se aproximadamente 600 µL do sobrenadante para outro tubo. A cada sobrenadante foram adicionados 300 µL de acetato de potássio (3M, pH 5,2) e 0,6 V de isopropanol (P.A.), seguindo da centrifugação da amostra a 12000 rpm por 10 min. os sobrenadantes foram descartados. Foram adicionados 400 µL de etanol (70%) aos pellets e centrifugados por 3 min a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, após secagem do pellet, foram adicionados 50-100 µL de tampão TE (Anexo J) sendo posteriormente centrifugado por 3 minutos a 12.000 rpm

A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, utilizando 1µL de tampão de amostra, 3,0 µL do syber e 5 µL das amostras de DNA.

4.8.4 Reação de Amplificação do DNA

A amplificação foi realizada por meio da técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos universais para Eubacteria 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') e 1492R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT-3') (HEUER; SMALA, 1997). A reação foi composta por 1µ L de DNA (de 50 ng.mL⁻¹), 2 µL dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL primer 27F (100mM), 0,5 µL primer 1492R (100mM), 1,5 µL da solução de MgCl₂ (50mM), 2,5µL de tampão (Buffer 10X), 0,8µL DMSO (P.A.), 0,35 µLTaq DNA Polymerase e 16,55 µL de água Milli-Q com volume final de 25 µL para a reação. As condições do termociclador foram

desnaturação inicial 94° C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 94° C/s, anelamento a 55° C/s, extensão a 72° C/min. e extensão final a 72° C/s. (KIM et al., 1996).

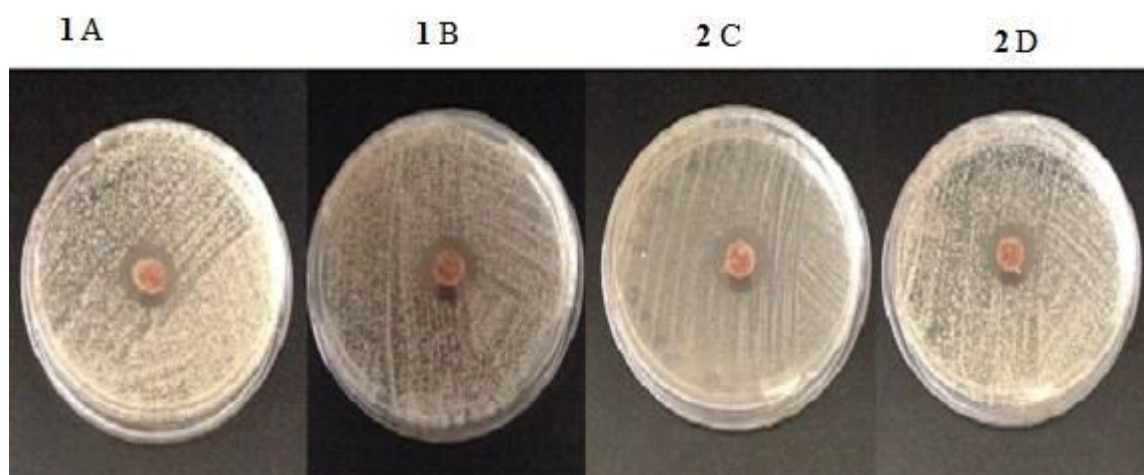
A amplificação do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, utilizando 1µL de tampão LB (4:1), 3µL de Syber e 1µL das amostras de DNA amplificado. O material foi enviado para sequenciamento pela empresa MacroGen DNA Sequencing Service-Korea.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio Primário em Meio Sólido

A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método semi-quantitativo (bloco de gelose). Esse teste permite que o metabólito secundário presente no bloco de gelose se difunda pelo meio de cultura, impedindo o crescimento dos micro-organismos, que pode ser visualizado pela formação de um halo de inibição. O teste permitiu selecionar as actinobactérias com maior potencial antimicrobiano para a realização do ensaio secundário (Figura 6.1).

Figura 6.1 – Halo de inibição do bloco de gelose das actinobactérias G24 (1) e G27 (2) testadas (A) *Candida albicans* (6401), (B) *C.guilliermondii*(6403), (C) *C.parapsilosis*(6431)e (D) *C.glabrata* (6392).



O ensaio primário mostrou que das 32 linhagens de actinobactérias testadas, 2 linhagens (6,25 %) apresentaram atividade contra as sete leveduras, apresentando halos de inibição variando de 11 a 18 mm de diâmetro (Figura 6.1), enquanto 30 linhagens que corresponde a 93,75% não apresentaram atividade antimicrobiana. Quando avaliada a influência da temperatura na produção do metabólito secundário, foi observada atividade apenas de duas actinobactérias cultivadas a 37 °C, não sendo evidenciada atividade na temperatura de 45 °C.

O meio de cultura ISP3 foi o único meio que proporcionou a produção de metabólitos bioativos. As médias dos halos de inibição da atividade antifúngica das 2 actinobactérias contra os 7 micro-organismos teste estão representados na tabela 6.1 (A e B).

Tabela 6.1: Médias dos halos de inibição (em milímetros) no ensaio primário das linhagens G24 (A) e G27 (B).

A

Micro-organismos teste	Médias /Desvios
6403- <i>C.guilliermondii</i>	16 ± 0,82
6392- <i>C.albicans</i>	16,3 ± 0,47
6395- <i>C.albicans</i>	16 ± 0,82
1007- <i>C.albicans</i>	17 ± 0,14
6431- <i>C.parapsilosis</i>	12,3 ± 2,51
6281- <i>C.pelliculosa</i>	11,66 ± 0,57
6401- <i>C. albicans</i>	13 ± 1

B

Micro-organismos teste	Médias/ Desvios
6403- <i>C.guilliermondii</i>	16,3 ± 0,82
6392- <i>C.albicans</i>	16,3 ± 0,47
6395- <i>C.albicans</i>	15 ± 0,82
1007- <i>C.albicans</i>	15,7 ± 1,41
6431- <i>C.parapsilosis</i>	15 ± 2,51
6281- <i>C.pelliculosa</i>	12 ± 0
6401- <i>C. albicans</i>	11,33 ± 1,52

Oskay (2009) testou a atividade antimicrobiana de 16 linhagens de *Streptomyces* contra leveduras, sendo evidenciada atividade apenas para 18,75% das linhagens com halos de inibição entre 12 a 28 mm.

Vários trabalhos relatam que a composição do meio de cultura, temperatura e condições de cultivo influenciam na produção dos metabólitos secundários (SHAHAT et. al., 2011; NONOH et. al, 2010). No presente trabalho as actinobactérias quando cultivadas no meio ISP3, um meio com poucos nutrientes (Aveia e Soluções de traços de sais), teve uma acentuada inibição dos micro-organismos teste quando comparado com outro meio como o ALA, composto por glicerol e glicose, além de parâmetros fermentativos como tempo, pH, temperatura.

Pesquisas realizadas com amostras do solo de vários ambientes extremófilos têm demonstrado um grande percentual de actinobactérias com atividade antimicrobiana. Choiet.al.

(2011) coletaram do solo das montanhas de Gyeong na Coreia, actinobactérias com ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, negativas e leveduras.

Azuma (2011) nos seus estudos na região entre-marés da ilha do mel no Paraná, isolou 116 actinobactérias, mostrando que 84 delas (72%) apresentaram atividade contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*.

Diversos trabalhos relatam à importância de se estudar as actinobactérias pelo seu potencial antimicrobiano, destacando-se o gênero *Streptomyces* com uma grande capacidade de produção de metabólitos secundários, tais como antifúngicos, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivos, agentes imunossupressores e os antibióticos (PROCÓPIO et al., 2012).

As duas linhagens de actinobactérias (G24 e G27) avaliadas neste estudo, apresentaram atividade antifúngica, contudo foi verificado que não existe diferença significativa estatisticamente entre elas. Por isto a linhagem G24 foi escolhida para a etapa posterior, o ensaio secundário, por apresentar um pigmento vermelho.

5.2 Ensaio Secundário

O ensaio secundário foi realizado a fim de determinar as melhores condições como o melhor meio de cultura, tempo e pH, para a produção de metabólitos secundários pela actinobactéria G24 (Apêndice A, B e C).

A linhagem G24 apresentou melhor atividade antifúngica no meio ISP3, com 48 horas de fermentação, apresentando halos de inibição maiores que 15 mm de diâmetro para todas as leveduras testadas (apêndice). O pH nesse meio de cultura variou entre 6 e 7, apresentando em 48 horas pH 7. A produção de biomassa no meio ISP 3 foi de 0,41g/ml (peso seco) em 120 horas de fermentação.

Cunha et. al.(2009) realizaram a fermentação de uma bactéria endofítica nos meios ISP-2, MPE e M1 e observaram que o meio de cultura ISP-2 teve uma melhor produção de metabólitos secundários contra o *B. subtilis*, com halos de inibição superiores a 20 mm de diâmetro.

Fator que pode influenciar na produção de metabólitos pode estar relacionado com deficiência ou ausência de componentes importantes para o crescimento como: fonte de carbono, Nitrogênio, potássio, fósforo, enxofre, solução de traços de sais e oxigênio.

No nosso estudo a produção de metabolito secundário foi no meio ISP 3, onde sua única fonte de carbono é a farinha de aveia, causando um estresse pela limitação e confirmando a maior produção de metabolitos em menor tempo.

5.3 Extração dos metabolitos ativos

5.3.1 Extração do Metabólitos Secundários - Biomassa e Líquido Metabólico

A extração dos compostos bioativos foi realizada segundo esquema apresentado na figura 3.1. Os extratos brutos da biomassa e do líquido metabólito foram testados contra a linhagem *C. guilliermondii* (6403), como observados na tabela 7.1.

Tabela 7.1: Resultados dos halos de inibição, em mm, dos extratos brutos da biomassa (A) , obtidos a partir da extração com diferentes solventes e pHs, contra o isolado clínico *Candida guilliermondii* (6403).

A

Biomassa	Halo de inibição do extrato fermentado por 48 h (mm)		
	pH 2	pH 7	pH 9
Acetona	-	-	-
Acetato de etila	16	16	15
Etanol	-	-	-

Os resultados observados na tabela 7.1 mostram que o acetato de etila conseguiu extrair os metabólitos bioativos da biomassa da linhagem G24, uma vez que inibiu o crescimento do micro-organismo teste com halo de inibição acima de 15 mm de diâmetro. Com relação à tentativa de extração dos metabólitos bioativos do líquido metabólico, não foi observada nenhuma atividade microbiana.

Nguyen et al. (2013), em seu estudo sobre produção de metabólito antifúngico de *Streptomyces griseus* H7602, conseguiram extrair o princípio ativo da biomassa com acetato de etila. No presente estudo, o extrato bruto da linhagem G24, extraído com o mesmo solvente, exibiu atividade antimicrobiana significativa para as linhagens de *Candida* testadas.

Hui et al. (2014) determinaram como melhor solvente para extração do metabólito bioativo o acetato de etila e foi observada a presença de um novo composto produzido pela espécie *Streptomyces griseoruber* com atividade para *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*. Fato semelhante também foi evidenciado por Vartak et al. (2014) que

conseguiram extrair um metabólito secundário, com atividade, da linhagem *Streptomyces* sp. MTCC 5680 com acetato de etila.

O solvente acetato de etila foi utilizado por consegui dissolver um grande número de substâncias tais como gorduras, óleos e resinas. Desse modo, o acetato de etila mostrou ser um solvente eficaz para extração de metabólitos bioativos produzidos por diferentes espécies de actinobactérias, e os resultados desses estudos são descritos na literatura (ARASU et al., 2009; VIMAL; RAJAN; KANNABIRAN, 2009).

5.4Atividade Antimicrobiana do Extrato

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato bruto em acetato de etila da biomassa da linhagem G24, foi avaliada com valores de CMI igual ou abaixo de 125 µg/mL.

Choi et. al. (2012) verificaram que o extrato bruto em acetato de etila do *Streptomyces* sp. BCNU 1001, isolado do solo das montanhas de Gyebang, Coréia, apresentou uma CMI de 125 µg/mL para *C. albicans*, resultado este semelhante ao obtido no nosso trabalho.

O extrato bruto em acetato de etila da biomassa apresentou valores da concentração mínima fungicida (CMF) igual ou inferior a 250 µg/mL para todas as linhagens.

Apesar da anfotericina B ser um dos antifúngicos mais antigos e seu emprego restringir-se quase que exclusivamente à administração sistêmica, ainda hoje, é consideradaa droga de referência para o tratamento da maioriadas infecções fúngicas, por esse motivo foi utilizada com padrão para todos os micro-organismos teste, utilizando a concentração de 0,031µg/mL sendo inibidas todas as linhagens testes.

Tabela8.1: Determinação da CMI do extrato da biomassa de acetato de etila da linhagem *Streptomyces* sp (G24).

Micro-organismos teste	CMI e CMF do extrato Bruto (µg/mL)	
	CMI	CMF
<i>Candida albicans</i> (URM 6395)	62,5	125
<i>C.guilhermondii</i> (URM 6403)	125	250
<i>C. albicans</i> (URM 6401)	125	250
<i>C. parapsilosis</i> (URM 6431)	125	250
<i>C. pelliculosa</i> (URM 6281)	125	250
<i>C. glabrata</i> (URM 6392)	62,5	125
<i>C. albicans</i> (UFPEDA 1007)	125	250

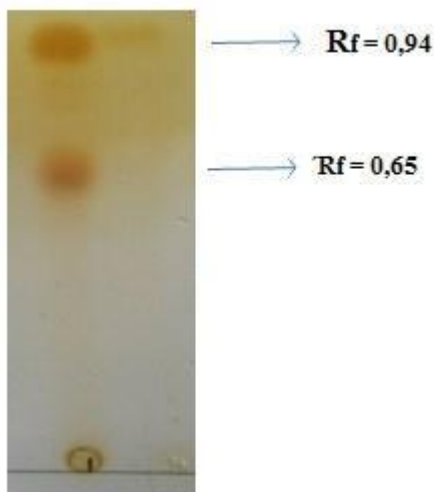
Vartak et al. (2014) isolaram um novo composto da linhagem *Streptomyces* MCTT 5860, isolado das regiões montanhosas de Himachal Pradesh, na Índia, e obtiveram uma CMI de 32 µg/mL para *C.albicans*, além de atividade frente a fungos filamentosos.

Os valores de CMI do extrato obtido no nosso trabalho são bastante promissores e novos estudos estão sendo conduzidos a fim de purificar e identificar o composto.

5.5 Análise Cromatográfica do Extrato Bruto Biologicamente Ativo

O extrato de acetato de etila da biomassa da linhagem (G24) foi submetido à cromatografia em camada delgada (sílica gel 60) para verificar a presença de metabolitos secundários presentes no extrato de acetato de etila, foi observada 7 frações (quando reveladas na câmara com lâmpada UV) , entre estas frações havia 2 frações que conseguiram ser reveladas com vapores de iodo, como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 7.1.

Figura 7.1: Perfil cromatográfico do extrato bruto da linhagem *Streptomyces* sp (G24) . Fase móvel: -ciclohexano: acetato de etila (1:1v/v). Revelação em I₂.



O extrato bruto de acetato de etila da linhagem (G24) foi submetidas a fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel (figura 8.1). O sistema de eluição utilizado foi ciclohexano : acetato de etila P.A. (1:1 v/v). Foram coletadas 40 frações, as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas, secas à temperatura ambiente, para cálculo de rendimento, e posteriormente, foram submetidas a revelações biológicas.

Figura 8.1: Cromatografia em coluna (50gde sílica gel 60),utilizando-se como fase móvel ciclohexano:acetato de etila (1:1 v/v).



As frações F14 (Corante - rendimento de 180 mg) e F38 (Com atividade antimicrobiana - rendimento de 110 mg), foram analisadas por CCD e enviadas para análise estrutural de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

Azuma (2011), estudando actinobactérias da região entre-marés da ilha do mel – Paraná, conseguiu isolar 60 subfrações da fração do extrato bruto em acetato de etila de *Streptomyces sp.* obtendo uma única fração com atividade antimicrobiana.

Hozzein, Rabie e Ali (2011) investigaram actinobactérias produtoras de novos compostos antimicrobianos isolados do deserto egípcio. A extração dos compostos foi realizada em acetato de etila, realizada purificação parcial por coluna, seguido de bioautografia.

5.6 Bioautografia

A verificação das frações com atividades foi realizada com o extrato bruto de acetato de etila da biomassa da linhagem (G24) por bioautografia, após corrida com o sistema ciclohexano: acetato de etila (1:1 v/v). A levedura *Cândida parapsilosis* URM 6431 foi utilizada como micro-organismo teste.

Na revelação biológica do extrato bruto, foi possível verificar que a atividade antifúngica não estava no pigmento e sim em outra fração (Figura 9.1). A subfração (38) foi analisada pela revelação biológica apresentando atividade frente a *Cândida parapsilosis* URM 6431, como podemos observar na figura 10. 1.

Figura 9.1: Bioautografia dos extratos brutos da biomassa da linhagem *Streptomyces* sp (G24) . Fonte: O autor.



Figura 10.1: Bioautografia da subfração 38 extratos brutos da biomassa da linhagem *Streptomyces* sp (G24) . Fonte: O autor.



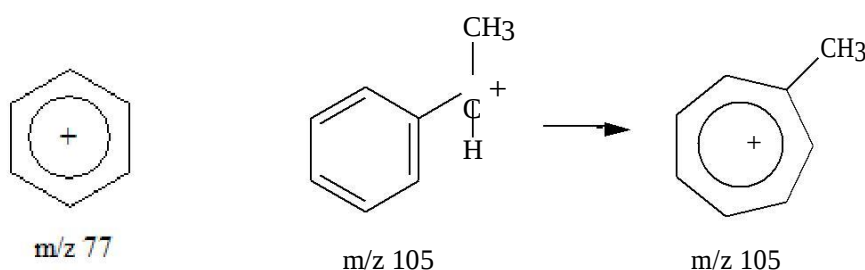
O composto obtido da fração F14 (**Corante**) apresentou valor de R_f de 0,65 (em placa de CCD) usando o sistema acetato de etila: ciclohexano (1:1)v/v e a fração F38 (que possui atividade antifúngica) apresentou valor de R_f de 0,15 para o mesmo sistema de eluição (Fig 10.1).

A bioautografia permite uma pesquisa rápida de novos agentes antimicrobianos através do estudo biomonitorado. Esse método detecta, mesmo em pequenas quantidades, compostos antimicrobianos ativos em misturas complexas de compostos. Trata-se de uma técnica qualitativa que não informa os valores da concentração mínima inibitória (SCORZONI et al., 2007).

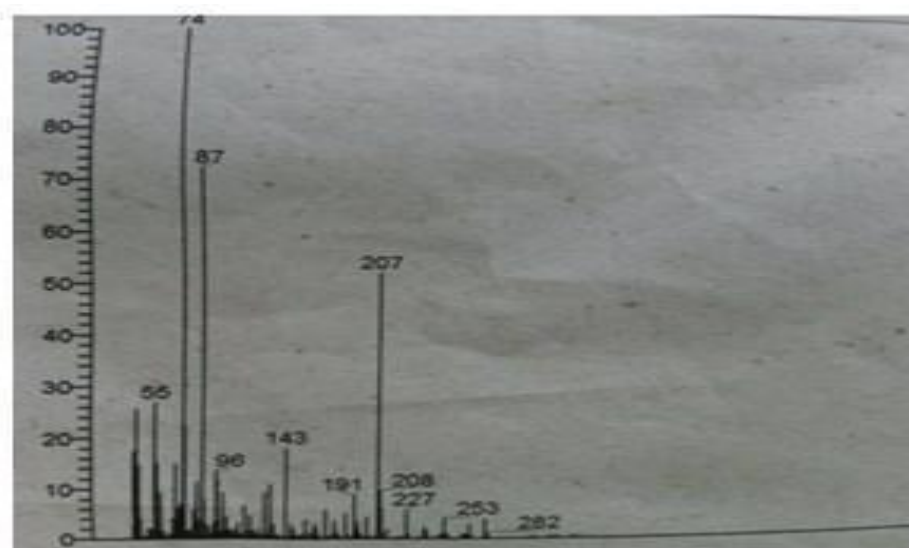
5.7 Análise dos metabólitos secundários por CG-MS

A análise da cromatografia gasosa da fração F14 (**corante**) revelou uma substância com tempo de retenção de 7,46 min. , cujo caráter aromático fica evidenciado, pois o espectro de massas apresenta fragmentos característicos (m/z 77 e m/z 105) provavelmente de um composto aromático alquilsubstituído (Figura 11.1).

Figura 11.1. Fragmentos característicos de compostos aromáticos

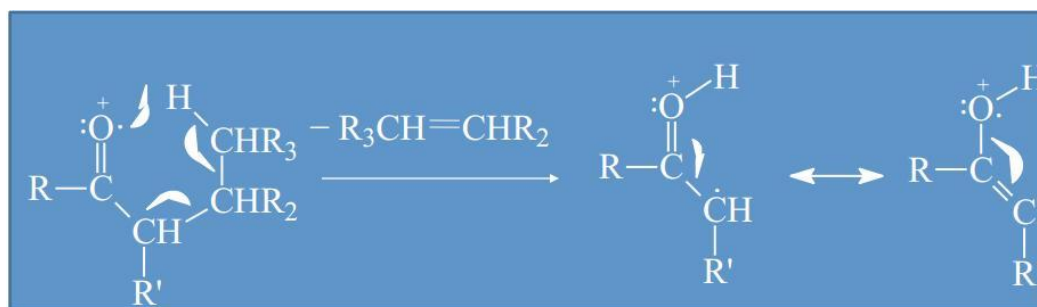


A análise da cromatografia gasosa da fração F38 (**antifúngica**) revelou uma substância com tempo de retenção de 13,66 min. O espectro de massas (Fig. 12.1) indicava que a substância apresenta uma fragmentação correspondente a um metil ester de ácido graxo com íon molecular m/z 282 indicando uma fórmula molecular de $C_{17}H_{30}O_2$.



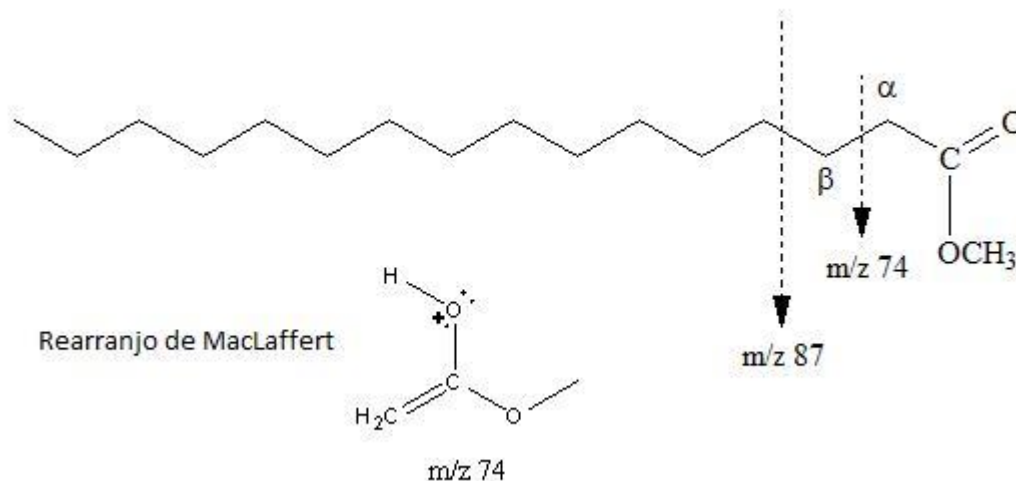
Os ésteres saturados apresentam os fragmentos diagnósticos de ésteres metílicos m/z 74 (pico base) obtido pelo rearranjo do tipo McLafferty (Figura 13.1) e o fragmento m/z 87 obtido pela clivagem β ao grupo carboxílico (Rebouças, et al, 1999). (figura 14.1).

Figura 13.1: Rearranjo de McLafferty



Fonte: http://www2.iq.usp.br/docente/lhc/disciplinas/qf15922-2011/2011_massa_-_bloco_2_-_lique.pdf

Figura 14.1. Modelo de fragmentação em metilester saturado.



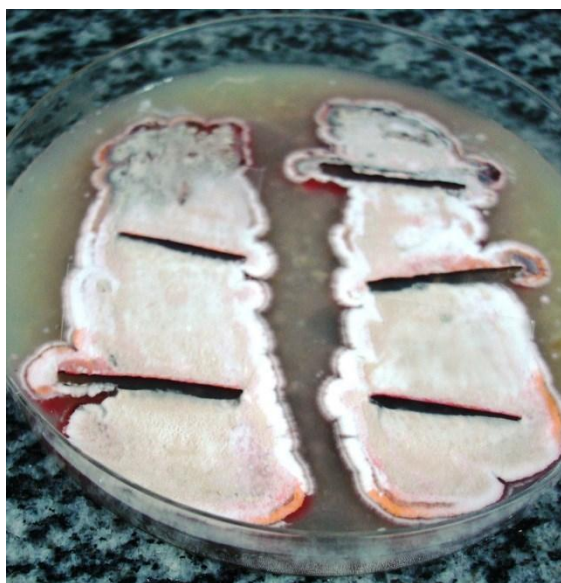
A estrutura do referido composto está sendo avaliada por técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear.

5.8 Identificação das Actinobactérias

5.8.1 Microcultivo

A identificação a nível de gênero da actinobactéria foi realizada pela técnica de taxonomia clássica (microcultivo) que consiste em avaliar por microscopia óptica a micromorfologia das cadeias de esporos, bem como a produção de pigmento (Figura 15.1).

Figura 15.1 - Microcultivo da linhagem *Streptomyces* sp (G24) no meio ISP3. Fonte: O autor.

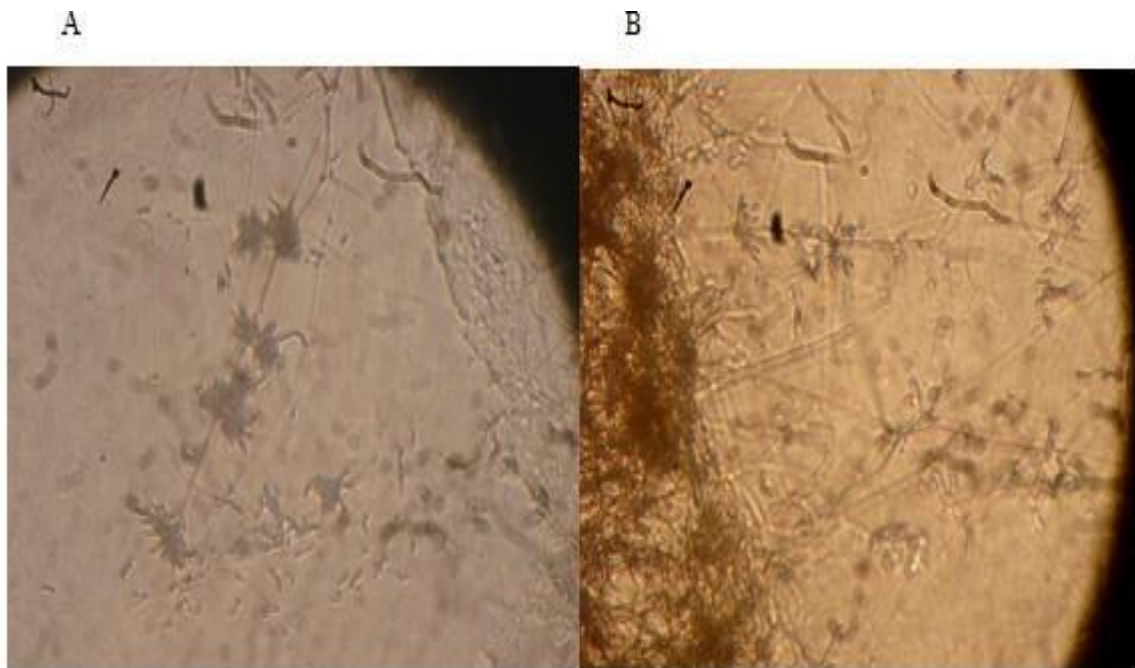


Rahman et al.(2011) observaram a atividade antibacteriana de actinobactérias isoladas do solo de Rajshahi (Bangladesh) e descreveram que as actinobactérias isoladas apresentaram diversidades de colorações do micélio aéreo (marrom, branco, laranja e vermelho). A coloração do micélio aéreo não está relacionada com o local de isolamento e sim com os nutrientes utilizados em cada meio.

Na análise micromorfológica mostrou cadeias de esporos em forma de espiral verticiladas, característico do gênero *Streptomyces* sp. (Figura 16.1). Essas características podem ser confirmadas no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012).

O gênero *Streptomyces* é predominante no solo, isso justifica por ser um grupo que não tem muitas exigências nutricionais. Existem gêneros de actinobactérias que para ser isolados necessitam de meios de culturas mais complexos, com fontes de carbono ou nitrogênio elevadas para sobrevivência. Sanchez e Demain (2002) afirmam que a fonte de carbono utilizada no experimento pode interferir no crescimento e na produção do metabólito bioativo.

Figura .16.1 - Micromorfologia dos gêneros investigados por microscopia óptica (40x). (A) e (B) indicam as características da *Streptomyces* sp. G24. Fonte: O autor.



5.8.2 Caracterização Molecular

A caracterização molecular da *Streptomyces sp* G24 foi realizada com a extração do DNA genômico a partir da cultura pura e em seguida avaliada sua integridade por eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a confirmação da extração e integridade, foi realizada a amplificação do gene 16S DNAr e foi evidenciada uma banda em torno de 1500 pb no aparelho espectrofotômetro. A amostra foi enviada para sequenciamento.

Malekiet al.(2013) utilizaram a técnica de PCR para amplificar a região 16S do rDNA e identificaram actinobactérias do solo do noroeste do Irã que apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica frente a diferentes micro-organismos teste

6. CONCLUSÃO

As linhagens G24 e G27 de actinobactérias apresentaram uma boa atividade antifúngica. A linhagem *Streptomyces sp* (G24) foi escolhida por apresentar um pigmento na cor vermelha e ter apresentado melhor produção de metabólito tanto no ensaio primário como no ensaio secundário; o melhor meio neste último ensaio foi o ISP3 em 48 horas de fermentação para a produção do composto bioativo.

O solvente acetato de etila em pH 7,0 foi o mais eficiente para extração do composto bioativos da biomassa da linhagem *Streptomyces sp* (G24) e do corante. A concentração mínima inibitória do extrato bruto apresentou uma variação de 62,5 µg/mL a 250 µg/mL para os micro-organismos teste.

Na análise cromatográfica do extrato bruto da biomassa, quando analisado no sistema acetato de etila : ciclohexano (1:1 v/v) em placa de CCD, foi possível verificar a existência de várias bandas. O fracionamento desse extrato bruto foi realizado por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com acetato de etila:ciclohexano (1:1 v/v), sendo obtidas 40 subfrações, tendo duas principais a fração F14 e F38.

A fração F38 apresentou um halo de inibição significativo frente ao micro-organismo teste e a fração F14 um corante vermelho, onde não foi observado atividade antimicrobiana .

Através da técnica de microcultivo, foi possível identificar a linhagem (G24) como *Streptomyces sp*.

Esses resultados indicam o potencial desta linhagem de *Streptomyces sp* como promissor para produção de novos antibióticos com atividade antifúngica e produtor de um corante com coloração intensa.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Elucidação estrutural do composto bioativo;
- ✓ Elucidação estrutural do pigmento.
- ✓ Fazer atividade citotóxica do pigmento
- ✓ Aplicar em diversos tecidos o pigmento
- ✓ Redigi o artigo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEROUMAND, A. - A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences** 6, 1:71-78, 2011.

ANDERSON,A.S. ;WELLINGTON,E.M.H.;The taxonomy of Streptomyces and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.v(2001), 51, 797–814.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. R. M.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X.; DIAS, C. S. DIAS; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 351-367, 1998.

ARASU, M. V.; DURAIPANDIYAN, 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.

ARASU, M. V.; DURAIPANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**, 18(3), p. 147–153. 2008.

AYUSO-SACIDO, A., GENILLOUD, O. (2005) New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49(1):10-24.

AZUMA,M.V.P **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da ilha do mel, PR, Brasil**, Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. UFPR, 2011.

BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 31-39, 2012.

BASSETTI, M., TARAMASSO, L., NICCO, E., MOLINARI, M.P., MUSSAP, M., VISCOLI, C. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. **Plos One**, v.6, p. 1-6. 2011.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1–26. 2005.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HOF, R.; ZEEK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chemical biochemical, Weinheim**, v. 3. P. 618-627, 2002.

BODEY G.P.,MADARNI.M.,HANNA. H.A.,BOKTOUR.M.,ABBAS.J.,GIRGAWY. E.,HACHEM. R.Y.,KONTOYANNIS.D.P.,RAAD.I.I.,The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with câncer. **The American Journal of Medicine**,v.112,p.380-385,1992.

BRESSAN, W., FIGUEIREDO, J.E.F. Efficacy and dose-response relationship in biocontrol of Fusarium disease in maize by *Streptomyces* spp. **European Journal of Plant Pathology**, 120:311-316, 2008.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology, Cambridge, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

COLOMBO AL,GUIMARÃES .T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. V. 36, pág. 599- 6007, 2003.

CHAROENSOPHARAT, K. et al. Antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. No 87. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1362-1368, 2008.

CHATER, K. F.; HORINOUCI, S. Signalling early development events in two highly diverged *Streptomyces* species.**Molecular Microbiology**, New York, v. 48, p. 9-15, 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.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.; CURRIE, C.The natural history of antibiotics. **Current Biology**, v. 19, n. 11, p. 437–441, 2009

CLSI.Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

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.

CWALA, Z.; IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa African. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 2,p. 118-124, 2011.

DUFOSSE, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. Food **Technol. Biotechnol.**, v. 44, p. 313-321, 2006.

DUNKEL, N.; LIU, T.; BARKER, K.; HOMAYOUNI, R.; MORSCHHÄUSER, J.; ROGERS, P. A Gain-of-Function Mutation in the Transcription Factor Upc2p Causes Upregulation of Ergosterol Biosynthesis Genes and Increased Fluconazole Resistance in a Clinical *Candida albicans* Isolate. **Eukaryotic cell**. v. 7, n. 7, p. 1180-1190. 2008 *Streptomyces* sp. EBR49-AUFPEDA. **Rev. Bras.Farm.**, v.90, n.2, p.120 – 123, 2009.

EL-KHAWAGH, M. A.; HAMADAH, K.H. SH.; EL-SHEIKH, T. M. The insecticidal activity of actinomycete metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, v. 4, n. 1, p. 103-113, 2011

EVANGELISTA-MARTÍNEZ; MORENO-ENRÍQUEZ.; Metabolitos secundários de importância farmacéutica produzidos por actinomicetos. *Bio Tecnología*, Vol. 11 Nº. 3, 2007

.

FLÄRDH K, BUTTNER MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium.

GONZÁLEZ,I. ET AL, (2005) Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology** 54.401–415.

GOODFELLOW, M. M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v 37, p. 189-216, 1983. Disponível em:<<http://arjournals.annualreviews.org/dó/abs/10.1146/annurev.mi37.100183.001201>>. Acesso em 25 de set. 2011.

GUARRO,J.; GENÉ, J.; STCHIGEL,A.M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, v.12,p. 454-500,1999.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO,L. S.; PUPO,M. T. antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.;**Química Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HOF, R., WALKER, M.; ZEECK, A. Hexacyclinic acid, a polyketide from *Streptomyces* with a novel carbon skeleton, **Angewandte Chemie International, Weinheim**, v. 39, p. 3258–3261, 2000.

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.

HILL, R.A. (2005) Marine natural products.**Annu Rep ProgChem**, 101:124–136.

HUI,J.; WANG.W.; HU,H.; PENG,H.;ZHANG, X.; *Streptomyces griseoruber* Y1B, a Novel *Streptomyces* for 1-Hydroxyphenazine Production .**Journal of Applied Biotechnology**.Vol. 2, No. 2,2014.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OSAKI, A. Improvement of kasugamycin-Producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol**, v. 16, p. 218-224, 1971.

JACOBSON, G.; WASILESKI, J. – Production of Food Colorants by Fermentation. – In. Gabelman, A. (ed.) Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients. John Wiley & Sons, NY, 205-37, 1994

JORK, H. et al. Thin-Layer Chromatography – Reagents and Detection Methods. Weinheim: Vch Verlagsgesellschaft MbH, v. 1a, 1990. THE United States Pharmacopeia. 30. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2006.

JUNG, S. I. et al. Antifungal susceptibility to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and flucytosine in *Candida* bloodstream isolates from 15 tertiary hospitals in Korea. **Ann. Lab. Med.**, v. 32, n. 6, p. 426-428, 2012.

J.M. PIRET AND A. L. DEMAİN, “Actinomycetes in biotechnology: an overview,” in *Actinomycetes in Biotechnology*, M. Goodfellow, S. T. Williams, and M. Mordarski, Eds., pp. 461–482, **Academic Press, London**, UK, 1988.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 21, p. 71-100, 1967.

LETEK, M.; FIUZA, M.; VILLADANGOS, A. F.; MATEOS, L. M.; GIL, J. A. cytoskeletal proteins of actinobacteria. *International Journal of Cell Biology*, 2012.

LIU, CHONG-XI; ZHANG, JI; WANG, XIANG-JIN; QIAN PING-TING, JI-DONG WANG; YA-MEI GAO; YI-JUN YAN, SHU-ZHEN ZHANG, PENG-FEI XU, WEN-BIN LI ; AND WEN-SHENG XIANG .Antifungal Activity of Borrelidin Produced by a *Streptomyces* Strain Isolated from Soybean. LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of the actinomycetes. **J. Agric. Food Chem.**, 2012, 60 (5), pp 1251–1257

KE ZHAO; PETRI PENTTINEN ; TONGWEI GUAN ; JING XIAO ; QIANG CHEN ; JUN XU; KRISTINA; INDSTROM ; LILI ZHANG; XIAOPING ZHANG; GARY A. STROBEL;. The Diversity and Anti-Microbial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau, China. , January 2011, Volume 62, Issue 1, pp 182-190.

KONEMAN, E. ET AL, (2006) Koneman's **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th ed. Lippincott Williams e Wilkins

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agricultura, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 65-76, 1999

KRMAR, A.; IIIC-TOMIC, T.; PETKOVIC, M.; RADULOVIC, N.; KOSTIC, M.; JOCIC, D.; NIKODINOVIC-RUNIC, J.; Crude bacterial extracts of two new *Streptomyces* sp. Isolates as

bio-colorants for textile dyeing. **World journal Microbiol Biotechnol.**(2014) 30:2231-2240.

MALEKI,H.; DEHNAD,A.; HANIFIAN,.S.; KHANI,S.; Isolation and Molecular Identification of Streptomyces spp. With Antibacterial Activity from Northwest of Iran.**BioImpacts**,3(3), 129-134,2013

MALUCHE,ME;SANTOS,JI. *Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40,n. 2 p. 65-67,2008.

MANGAMURI,U.K., MUVVA.V., PODA,S., KAMMA, S.; Isolation, Identification and Molecular Characterization of Rare Actinomycetes from Mangrove Ecosystem of Nizampatnam. **Malaysian Journal of Microbiology**, Vol 8(2) 2012, pp. 83-91.

MANTOVANI,C.K. Determinação e atividade antimicrobiana de bactérias isoladas de esponjas marinhas. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação Genética e Biologia Molecular.**Campinas:Unicamp**,2011.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes - A review.**Frontiers in Bioscience E4**, n.1, p. 240-253, 2012.

MORSCHHAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.*; v. 47(2); pág. 94-106; 2009.

MOFFITT, M. C., NEILAN, B. A. (2003) Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. **J Mol Evol**, 56:446–457.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi.*Fungal Genetics and Biology*. v. 47, p. 94-106. 2009.

NONOH,J.O.; LWANDE,W.; MASIGA,D.; HERRMANN,R.; PRESNAIL, J.K.; S.; SCHEPERS,E.; OKECH, A.M.; BAGINE,R.; MUNGA,P.; NYENDE, A.B.; BOGA, H.I. Isolation and characterization of Streptomyces species with antifungal activity from selected national parks in Kenya. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 4(9), pp. 856-864, 4 May, 2010

OLIVEIRA, M. F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente. **Porto Alegre: UFRGS**, 2003.

OSKAY, M. Antifungal and antibacterial compounds from Streptomyces strains. **African Journal of Biotechnology** Vol. 8 (13), pp. 3007-3017, 6 July, 2009

PEMÁN, J.; ZARAGOZA, R.; QUINDÓS, G.; ALKORTA, M.; CUÉTARA, M.S.; CAMARENA, J.J.; RAMÍREZ, P.; GIMÉNEZ, M.J.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; LINARES-SICILIA, M.J.; PONTÓN, J. Clinical factors associated with a *Candida albicans* Germ Tube Antibody positive test in Intensive Care Unit patients. **BMC Infectious Diseases, Valencia**, v. 11, n. 60, p. 1-7, 2011.

PETROVA, D.; VLAHOV, S. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21E producer of thermostable collagenase. **Journal of Culture Collections**, v. 5, n.1, p. 3-9, 2006.

PIMENTEL-ELARDO, S. KOZYTSKA, T.S. BUGNI, C.M. IRELAND, H. MOLL, U. HENTSCHEL Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from **Mediterranean sponges Mar Drugs**, 8 (2010), pp. 373–380.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; *Biologia química: uma estratégia moderna para pesquisa de produtos naturais. Química nova*, São Paulo, v.30, p 1446 -1445, 2007.

RAHMAN, S. U.; RASOOL, M. H.; RAFI, M. Penicillin production by wild isolates of *Penicillium chrysogenum* in Pakistan. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 476-481, 2012.

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.

LÚCIA M. C. REBOUÇAS, MARIA DO S. B. CARACIOLO E ANTÔNIO E. G. ANT'ANA JOHN A. PICKETT, LESTER J. WADHAMS E ELEANOR M. POW Composição química da glândula abdominal da fêmea da mariposa *Castnia licus* (Drury) Lepidoptera: Castniidae): possíveis feromônios e precursores **Quím. Nova** vol.22 n.5 São Paulo Sept./Oct. 1999

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.

RIBEIRO, M.; PINTO, I.; PEDROSA, C. Comportamento da população do conelho de Vizela no consumo de antibióticos. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v.27, n. 2, p. 57-70, 2009.

RIBEIRO, M.; PINTO, I.; PEDROSA, C., Comportamento da população do conelho de vizela no consumo de antibióticos. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, v.27, n.2, p.57-70, 2009.

RODLOFF, A.; KOCH, D.; SCHAUMANN, R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. **European Journal of Medical Research**. v. 16, p. 187-195. 2011.

SABLE C., STROHMAIER K., CHODAKEWITZ J. Advances in antifungal therapy. *Ann Rev Med* 59: 361–379(2008).

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **Japan Medical Association Journal**, v. 52, n. 2, p. 103–108, 2009

SALOMON, C. E., MAGARVEY, N. A., SHERMAN, D. H. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, 21:105–121.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, v. 1. 4th ed. New York : CSHL Press, 2012.

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

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**, n. 38, p. 391-397, 2007

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Discovery of aspoquimolones A-D, prenylated quinoline alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Organic & Biomolecular Chemistry*, Cambridge, v. 4, p. 3517-3520, 2006.

SCHWARZER, D. , MARAHIEL, M. A. (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 88: 93–101.

SEMEDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; LINHARES, A. A.; DUARTE, G. F.; NASCIMENTO, R. P.; ROSADO, A. S.; PINHEIRO, M. M.; MARGIS, R.; SILVA, K. R. A.; ALVIANO, C. S.; MANFIO, G. P.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 54, p. 1323-1328, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, V. V.; DÍAZ, M. C.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Rev Chil Infect**, 19 :56-65, 2002.

SIVARAMAKRISHNA, H.; MAHAJAN G. Microbes an eternal source of innovative drugs. **Express Pharma**, p. 16-30, 2009

SHAABAN, K. A.; SRINIVASAN, S.; KUMAR, R.; DAMODARAN, C.; ROHR, J. Landomycins P-W, cytotoxic angucyclines from *Streptomyces cyanogenus* S-136. *Journal of Natural Products*, v. 74, n.1, p. 2–11, 2011.

SHAHAT, A. S.; ABOUWARDA A.; EL-WAFA, W. M. Production of Anti-*Candida albicans* by Egyptian *Streptomyces* Isolates. **International Journal of Microbiological Research** 2 (2): 167-171, 2011

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

SOARES, L. P. M. A.; CARNEIRO, I. C. R. S.; OLIVEIRA, R. T.; Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. Emunidade neonatal de hospital de ensino da Região Nordeste do Brasil: estudo dos fatores de risco. **Rev Pan-Amaz Saude** 2013; 4(3):19-24.

SOARES; E. P. COSTA; L. C. N. SILVA; J. M. ARAÚJO, Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* sp. UFPEDA 968, v. 8, n. 12, 2012.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Marine Actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**. 2012

WALL, P. E. **Thin-layer Chromatography**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 2 697-703. 1991

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TITO LÍVIO CASTRO, T.L.; COUTINHO, H.D.M.; GEDEON, C.C.; SANTOS, J.M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L.B.S. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA CANDIDA SP WWA ANTIFÚNGICOS. **Infarma**, v.18, nº 9/10, 2006

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.

THAIS D.MENDES, WARLEY S. Borges, Andre Rodrigues, Scott E. Solomon, Paulo C. Vieira, Marta C. T. Duarte, and Fernando C. Pagnocca ,Anti-*Candida* Properties of Urauchimycins from Actinobacteria Associated with *Trachymyrmex* **Ants** .v.2013 ,2013.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J. E DI LUCCIO, M. –Produção de carotenoides: micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim. Nova**, 32,9:2429-2436, 2009.

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.

VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida* Berkhout, causadoras de infecções hospitalares. **O mundo da saúde**. **38(1): 40-50, 2014.**

VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, v. 10., p 6-21- , 2006.

ZHONG, L.; XU, L.; MENG, X.; PENG, Y.; CHEN, Y.; SUI, P.; WANG, M.; ZHOU, L. Botrallin from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and its antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 10, n. 79, p. 18174–18178, 2011.

ZHU, H.; GUO, J.; YAO, Q.; YANG, S.; DENG, M. E LI, T. - *Streptomyces caeruleatus* sp. nov., with dark blue diffusible pigment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61, 507–511, 2011.

ZUCCHI T. D., A. S. GUIDOLIN, AND F. L. C`ONSOLI, "Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae)," **Microbiological Research**, vol. 166, no. 1, pp. 68–76, 2011.

ANEXOS

A **International Streptomyces Project Medium 2 (ISP2)** (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966)-pH 7,2

Extrato de levedura	4,0 g
Extrato de malte	10,0 g
Dextrose	4,0 g
Água destilada	1000 mL

B **B.Arginina Levedura Ágar (ALA)** (NONOMURA e OHARA, 1971)- pH 7,4

L-arginina	0,3 g
Glicose	1,0 g
Glicerol	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
KCl	0,3 g
Extrato de levedura	1,0 g
Água destilada	1000 mL
Agar	20,0 g

C **International Streptomyces Project Medium 3 (ISP3) modificado**(SHIRLING E GOTTLIEB,

1966) - pH 7,2

Farinha de Aveia	20,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	1000 mL

Solução de Traços de Sais (as quantidades abaixo são para 1 L de meio)

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,1 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 mg

D **MeioSabouraud (SAB)- pH 5,6**

Peptona bacteriológica	10,0 g
Glicose	40,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

E	Meio AY	
	L-arginina	0,3g;
	Glicose	1g
	Glicerol	1g
	K ₂ HPO ₄	0,3g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
	NaCl	0,3g
	Extrato de levedura	1g
	FeSO ₄ .7H ₂ O	10mg
	MnSO ₄ .7H ₂ O	1mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1mg
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1mg
	H ₂ O	100ml
F	Meio de Produção de Euromicina (MPE)- pH 7,0	
	Glicose	20,0 g
	Farinha de soja	20,0 g
	NaCl	5,0 g
	CaCO ₃	2,0 g
	Água destilada	1000 mL
G	Meio 1 (M1) - pH 7,0	
	Glicose	10,0 g
	Farinha de soja	10,0 g
	NaCl	5,0 g
	CaCO ₃	1,0 g
	Água destilada	1000 mL
H	Tampão TAS	
	Tris-HCl	50 mmol.L ⁻¹
	EDTA (pH 8,0)	50 mmol.L ⁻¹
	NaCl	150 mmol.L ⁻¹
Observação: Apenas os meios de cultura listados acima foram esterilizados em autoclave a 121° C/15 min.		
I	SDS 10%	
	SDS	20g
	Volume	200 mL
Observação: Dissolverem 150mL de H ₂ O estéril e aquecer a 68°C		
J	Tampão TE	
	Tris-HCl	10,0 mmol.L ⁻¹
	EDTA - pH 8,0	1,0 mmol.L ⁻¹

L

Farinha de soja	10,0 g
NaCl	5,0 g
CaCO ₃	1,0 g
Água destilada	1000 mL(pH 7,0)

APÊNDICES

APÊNDICE A - Diâmetros dos halos de inibição (em milímetros), do ensaio secundário, da linhagem *Streptomyces sp* (G24) de actinobactéria isolada da rizosfera da Caatinga, para diferentes micro-organismos teste.

L 24		6401					6403					6281				
MEIOS	Atividade (mm)															
	(DP)*						(DP)					(DP)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
MPE	16 2,8284	15,5 0,7071	11,5 0,7071	0 0	0 0		15,5 0,7071	16 0	14 1,4142	17 0	16 1,4142	15 0	20 0	14,5 0,7071	16,5 0,7071	14 1,4142
M1	12,5 0,7071	12 1,4142	12,5 0,7071	0 0	0 0		15,5 0,7071	18 0	16 1,4142	14 2,1213	14,5 0,7071	15,5 2,1213	17,5 0,7071	12,5 0,7071	14,5 0,7071	12 0
ISP 3	18,5 0,7071	15 0	13 2,8284	0 0	0 0		18,5 0,7071	18 0	16 1,4142	18,5 1,4142	15 0	19 0	17 1,4142	16 1,4142	14 0	15 0
L 24		6431					6395					6392				
MEIOS	Atividade (mm)															
	(DP)*						(DP)*					(DP)				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
MPE	16,5 0,7071	18,5 2,1213	18 0	17 0	14,5 0,7071		15 0	16,5 0,7071	17,5 0,7071	15 1,4142	14,5 0,7071	16 1,4142	19 1,4142	17 0	16,5 0,7071	18,5 2,1213
M1	15,5 0,7071	15 0	15,5 0,7071	17 0,7071	15 1,4142		14,5 0,7071	15 0	14 0	16 0	13 0	13,5 0,7071	16,5 0,7172	15 1,4142	15 0	14 1,4142
ISP 3	19,5 0,7071	18,5 0,7071	18 4,2426	18,5 2,1213	14,5 0,7071		19,5 0,7071	17 0	14 1,4142	17 1,4142	15,5 0,7071	16,5 2,1213	17 0	18 1,4142	15 0	15 0

APÊNDICE B– Variação de pH da linhagem *Streptomyces sp* (G24) durante 120 horas de fermentação nos diferentes meios de fermentação.

Variação de pH da *Streptomyces sp*. G24 durante 120 horas de fermentação nos diferentes meios de fermentação.

Meios	Tempo				
	24h	48 h	72h	96 h	120h
M1	8	8	7	7	7
MPE	8	8	8	8	8
ISP 3	7	7	7	6	6

APÊNDICE C – Concentração de massa celular da linhagem *Streptomyces sp* (G24), durante 120 horas nos diferentes meios de fermentação (biomassa em miligramas).

Concentração de massa celular do isolado G24, durante 120 horas nos diferentes meios de fermentação (biomassa em grama).

Meios	Tempo				
	24h	48 h	72h	96 h	120h
M1	0,113	0,88	0,287	0,28	0,434
MPE	0.1105	0,162	0,265	0,316	0,361
ISP 3	0,140	0,1	0,14	0,32	0,41