

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

NATALIANE MARQUES DE VASCONCELOS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ENVOLVIMENTO DE
GENES BIOSINTÉTICOS EM ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA CAATINGA**

Recife

2016

NATALIANE MARQUES DE VASCONCELOS

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ENVOLVIMENTO DE
GENES BIOSINTÉTICOS EM ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA CAATINGA**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre
em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Orientador (a): Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
Co- orientadora: Prof^a Dr^a Gláucia Manoella de Souza Lima
e Prof^a Dr^a Marcia Vanusa da Silva

**Recife
2016**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Vasconcelos, Nataliane Marques de

Investigação do potencial antifúngico e envolvimento de genes biossintéticos em actinobactérias isoladas da Caatinga/ Nataliane Marques de Vasconcelos– Recife: O Autor, 2016.

76 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadoras: Gláucia Manoella de Souza Lima e Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2016.

Inclui referências

1. Antibióticos 2. Actinobactéria 3. Caatinga I. Correia, Maria Teresa dos Santos (orientadora) II. Lima, Gláucia Manoella de Souza (coorientadora) III. Silva, Márcia Vanusa da IV. Título

615.329

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-108

Nataliane Marques de Vasconcelos

“Investigação do potencial antifúngico e envolvimento de genes biossintéticos em actinobactérias isoladas da caatinga”

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia - Presidente

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

Data: 26 / 02 / 2016

Dedico a Deus, Criador do Céu e da Terra.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido cumprir mais esta importante e difícil etapa de vida. Toda honra e toda glória é dada a ti senhor. O Deus que realizou e vem realizando milagres em minha vida e que vem me sustentando até aqui.

Aos meus pais Francisco de Assis Vasconcelos e Josefa Marque Dó Vasconcelos, pela educação, apoio de sempre e por confiar em mim. Que com muito amor e abnegação se esforçaram para obter os meios que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu amado irmão Henrique Marques de Vasconcelos, que com todo apoio e palavras de força nunca me deixou desistir dos meus objetivos. Deus continue te abençoando cada dia mais.

Ao meu casal favorito minha linda e amada irmã e meu cunhadinho lindo, casal Gomes, Natália e Dougllas Gomes. Por me ajudar nessa caminhada, pelos incentivos e pelas lindas palavras de amor. Amo muito vocês!

Ao meu avô e avó, Severino Marques (in memorian) e Severina José (in memorian), que com todo amor de sempre deram força pra trilhar o caminho certo da vida. A vocês todo o amor do mundo.

Ao meu lindo e amado noivo (tão breve esposo), Jallison Fernandes Fontes, pelo carinho, dedicação e apoio. Muito obrigada por entender minha ausência nesse período e por me ajudar a nunca desistir. Por aturar os dias de estresse e sustentar nos dias difíceis. Te amo!

As minhas orientadoras de Antibióticos, Dra. Gláucia Manoella e Dra. Janete Magali, pela orientação e por conduzir com sabedoria em mais uma etapa da minha carreira profissional.

As minha orientadoras da bioquímica, Dra. Tereza Correia e Dra. Marcia Vanuza, por aceitar orientação sem nem mesmo me conhecer. Muito obrigada pela confiança depositada.

À todos meus amigos do Laboratório genética de microrganismo do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela amizade e feliz convivência: Wanda (Wandita), Evelyn (Evinha), Jéssica (Jeco cunhadinha), Glêzia (Chefa), Isllan (Leitte), Luís (amigo), Suellen (Sú), Geyse (Geyzinha), Gustavo (Gu), Natália e Amanda.

À dona Fátima (Fafá), Marcela e Seu Luiz, técnicos do Laboratório de Cultura de Microrganismos, que sempre deram apoio e auxílio seja no âmbito profissional ou pessoal.

À todos meus amigos do LAMAI, pela convivência e amizade: Pérsio, Camila, Rafael Manaus, Robinho, Nelânia, Erik, Iasmim, Welma.

À todos do Laboratório de Produtos Naturais e Laboratório de Processos Biotecnológico, pelos ensinamentos e amizade, em especial a Dra. Marcia Nascimento, Iranildo e Vanessa.

À minha turma mais que especial da Pós-graduação. Pessoas incríveis que eu convivi nesses dois anos que ficarão na memória. Espero reencontrá-los diversas vezes ao longo das próximas jornadas.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro recebido neste projeto.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Que Deus abençoe a todos!

Lembre da minha ordem:

“Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o senhor, o seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!”

Josué 1:9

RESUMO

A resistência microbiológica aos antibióticos constitui uma série de problemas de saúde pública por dificultar o tratamento das infecções. As actinobactérias são fontes importantes para a descoberta de novas moléculas com atividades biológicas. A este grupo, o gênero *Streptomyces* possui, dentre outros, dois grupos de enzimas multimoduladoras conhecidas como poliketide sintase (PKS) e peptídeo sintase não ribossomal (NRPS), genes relacionados com a produção de metabólitos secundários. O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial *in vitro* de metabólitos bioativos produzidos por Actinobactérias isoladas do bioma Caatinga com atividade contra diferentes isolados clínicos de *Candida* spp. Após ensaio primário das 45 actinobactérias apenas a linhagem PR- 32 apresentou atividade contra *Candida* spp, com halos de até 20 mm no meio ISP₂. Posteriormente, essa linhagem foi cultivada em seis diferentes meios de cultura sendo observada melhor produção do metabólito secundário no meio 400 em 48 horas (h) de fermentação. A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada a partir do extrato etanólico da biomassa de PR- 32 em pH 7.0 e foi evidenciada uma CMI entre 31,25 µg/mL a 3,9 µg/mL para as leveduras testadas. A cinética de morte reforçou o resultado da CMI e mostrou que no período de 4-8 h o extrato inibiu as cepas de *Candida* spp. A caracterização da actinobactéria foi identificada por metodologias clássicas e pela pesquisa do gene 16S rRNA como *Streptomyces* sp. PR- 32. Os resultados desta caracterização sugerem uma possível espécie nova, contudo outras análises ainda precisam ser realizadas. Foi evidenciada a presença do gene *nrps* com aproximadamente 750 kb. Diante destes resultados podemos concluir que *Streptomyces* sp. PR- 32 é um isolado promissor para produção de compostos antifúngicos, sendo possível sugerir que a atividade biológica deste metabólito secundário é regulado por peptídeo sintase não ribossomal (NRPS).

Palavras-chave: Metabólito secundário, CMI, Cinética de morte, NRPS, 16S rRNA.

ABSTRACT

The microbial resistance to antibiotics is a series of public health problems for hindering the treatment of infections. The actinomycetes are important sources for new molecules with biological activities discovered. In this group, the genus *Streptomyces* have among others, multimoduladoras two groups of enzymes known as polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal peptide synthase (NRPS), genes involved in production of secondary metabolites. This study aimed to investigate the potential in vitro bioactive metabolites produced by isolated Actinobacteria biome Caatinga with activity against different clinical isolates of *Candida spp.* After screening of actinomycetes in 45 primary test only the PR- 32 strain showed activity against *Candida spp.*, with halos of up to 20 mm in the middle ISP₂. Subsequently, this strain was grown in six different culture media is best seen in secondary metabolite production means 400 at 48 h of fermentation. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined from the ethanolic extract of the biomass of PR- 32 at pH 7.0 and one MIC was observed between 31.25 mg / mL 3.9 mg / mL for yeast tested. The kinetics of death reinforced the result of CMI and showed that in the 4-8 hour period the extract inhibited the strains of *Candida spp.* The characterization of actinobacteria was identified by classical methods and research 16S rRNA gene as *Streptomyces* sp. PR- 32. The results of this characterization suggests a possible new species, but other tests that must be performed. the presence of the NRPS gene of approximately 750 kb was observed. From these results we conclude that *Streptomyces* sp. PR- 32 is a promising isolated to produce antifungal compounds, it is possible to suggest that the biological activity of this secondary metabolite is regulated by peptide synthase not ribosomal (NRPS).

Key-words: Secondary metabolite, MIC, Kinetics of death, NRPS, 16S rRNA.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Ciclo de vida do *Streptomyces coelicolor*.....20

ARTIGO

Figure 1: Mean values of the inhibition zones (in millimeters) of microorganisms test the primary test of PR-32 strain on ISP-2 medium.....57

Figure 2: Neighbor-joining based on the partial sequence of the 16S rDNA, showing phylogenetic relationships between *Streptomyces* sp. PR- 32 with other species of *Streptomyces*. Bar, sequence divergence of 0.1%.....63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1: Antifungal activity of isolated PR- 32 during 96 hours of fermentation, the different culture media used, front yeasts tests.....	58
Table 2: Values of minimum inhibitory concentration of crude extracts and positive control (Amphotericin B), compared to fungi.....	59
Table 3: Kinetic curve crude extract death time ethanolic isolated PR- 32 in Log10 base at concentrations of EB ½ MIC, EB MIC, EB 2X MIC, EB 4X MIC of amphotericin B and control the concentrations of ANF ½ MIC , ANF MIC, ANF 2X MIC, ANF 4X MIC front of the clinical isolates of <i>Candida</i> spp.....	61
Table 4: Phenotypic and biochemical that differentiate the isolated <i>Streptomyces</i> sp. PR- 32 from the nearest phylogenetic estirper.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

CMF	Concentração Mínima Fúngica
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ISP- 2	International Streptomyces Project Medium 2
M 1	Meio 1
MPE	Meio de Produção de Euromicina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
SAB	Meio Sabouraud
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPEDA	Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos-UFPE
V	Volume
NRPS	Peptídeo não-ribossomal
PKS	Policetídeo Sintase
ISP- 4	Sais inorgânicos - Amido - Ágar

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	13
2) FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Actinobactérias	16
2.2 Gênero <i>Streptomyces</i>	18
2.3 Metabólitos Secundários	21
2.3.1 Antibióticos.....	23
2.4 Policetídeo Sintase e Peptídeo não- ribossomal.....	26
2.5 Desenvolvimento de Resistência Antifúngica	28
2.6 Gênero <i>Candida</i>	31
3) OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivo específico	34
4) REFERÊNCIAS	35
5) ARTIGO	50
6) CONCLUSÃO	76

1) INTRODUÇÃO

Candida albicans é a causa predominante das infecções fúngicas invasivas muito embora, tem sido descrito um rápido aumento de micoses causadas por espécies de *Candida* não *albicans* (MICELI et al., 2011). Os fungos podem mostrar-se como patógenos primários, capazes de causar infecção sem fatores predisponentes, assim como patógenos oportunistas, características estas inclusas as leveduras do gênero *Candida* spp (ZOMORODIAN et al. 2011).

A ocorrência cada vez mais comum de cepas clínicas multirresistentes além das falhas no tratamento das infecções torna-se necessário a descoberta de novos metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana e com potencial para utilização na clínica. Diante da necessidade do controle de crescimento destes micro-organismos multirresistentes, um crescente número de estudos sobre atividade biológica de metabólitos secundários tem sido realizado. (SOLECKA et al., 2012).

Ao longo das últimas décadas, os produtos naturais continuam a desempenhar um papel de elevada importância como fonte promissora de novos metabólitos bioativos e como percussores para a síntese de novos fármacos (QIN et al., 2011).

Os micro-organismos representam uma rica fonte de metabólitos bioativos e têm gerado importantes produtos para a indústria farmacêutica, dentre eles: agentes antibacterianos como os beta-lactâmicos (penicilina G e cefalosporina C), tetraciclina (clortetracilina), aminoglicosídeos (estreptomicina), macrolídeos (eritromicina), glicopeptídeos (vancomicina), lipodepsipeptídeos (daptomicina); agentes imunossupressores como ciclosporina e rapamicina; agentes hipolipêmicos como a

lovastatina e fármacos anti-helmínticos e antiparasitários como a ivermectina (CRAGG; NEWMAN, 2013; GUIMARÃES et al., 2010).

Cerca de 47% dos metabólitos secundário microbianos (aproximadamente 33000 compostos) proporcionam algum tipo de atividade biológica e cerca de 40% (aproximadamente 28000 compostos) são antibióticos convencionais. As actinobactérias, principalmente o gênero *Streptomyces*, são conhecidas como grandes produtoras de metabólitos bioativos, produzindo cerca de 39% de todos os metabólitos microbianos (BÉRDY, 2012).

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 (SUBRAMANI; ALBERSBERG, 2012).

Metabólitos secundários são moléculas de adaptação que evoluíram para propósitos diferentes daqueles do metabolismo primário. São produzidos pelas espécies por razões fisiológicas, sociais ou predatórias específicas. Esses compostos são produzidos sob condições específicas, normalmente após a fase de crescimento dos micro-organismos e, dependendo das condições ambientais as quais estão submetidos, uma mesma espécie pode expressar diferentes metabólitos (O'BRIEN e WRIGHT, 2011).

Streptomyces estão entre as bactérias mais bem estudadas, devido ao impacto econômico obtido por meio dos metabólitos produzidos. Classes importantes de compostos ativos de origem microbiana (antifúngicos ou agentes antitumorais) são sintetizados por grandes enzimas multi-modulares, as poliketídios (PKS) e peptídeos não-ribossomais (NRPS). As NRPS estão envolvidas na produção de importantes

antibióticos tais como penicilina, vancomicina e ciclosporinas. Os PKS moduladores, os quais estão proximamente relacionados com os NRPS, são descritos na biossíntese de eritromicina (WALSH, 2007). A produção de metabólitos secundários inicia-se na fase estacionária quando o micro-organismo é cultivado em meio líquido, enquanto que em ágar sua produção coincide com o início da diferenciação morfológica (WEBER, 2003).

Deste modo, o presente trabalho visa avaliar o potencial biotecnológico da microbiota da rizosfera da Caatinga para a produção de compostos bioativos frente a *Candida* spp. de isolado clínico.

2) FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ACTINOBACTÉRIAS

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). Podendo estas bases constituírem mais de 50% do total de nucleotídeos, como no caso de alguns gêneros de *Streptomyces*, que podem ter mais de 70% de G + C em seu DNA (ANDERSON;WELLINGTON, 2001).

As actinobactérias são bactérias Gram positivas filamentosas amplamente distribuídas na natureza, apresentando parede celular formada por isômeros do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP), ácido diamino lisina, ácido diamino ornitina ou ácido diamino butírico. Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (PROCÓPIO et al., 2012; ANDERSON;WELLINGTON, 2001).

Na maior parte das vezes as actinobactérias são mesófilas (22 °C a 37 °C) e crescem em pH neutro, porém existem actinobactérias termofílicas, halófilas e acidófilas (WHITMAN et al., 2012). Apresentaram um metabolismo variável, podendo ser autotrófica, heterotrófica ou quimiotrófica, o que possibilita a utilização de muitas fontes de energia (KENNEDY, 1999).

Esses micro-organismos produzem esporos que permitem a sobrevivência em habitats extremos conferindo proteção e eles são normalmente correlacionados com sua diversidade morfológica. Os esporos resistem bem à dessecação, tendo um grande valor

na preservação da espécie, porém, não são muito resistentes a temperaturas elevadas (FLÄRDH; BUTTNER, 2009).

Sob condições de estresse como limitação de nutrientes, o micélio do substrato diferencia-se primeiramente em micélio aéreo, que surge a partir da divisão do substrato. O próximo passo de diferenciação é uma subdivisão de hifas aéreas por múltiplos septos e por fim desenvolvimento de esporos resistentes a dessecação. Em um sinal ainda não identificado, os esporos germinam e começa um novo ciclo (YAGUE et al., 2013).

Durante a fase da formação dos esporos são produzidos pigmentos e substâncias antimicrobianas ocorrendo a ativação do metabolismo secundário (BERNARDO, 2012).

No geral, as actinobactérias apresentam um desenvolvimento lento em relação aos seus competidores. Em relação aos fungos a velocidade de crescimento em meio sólido é lenta e quando confrontado com as bactérias essa velocidade é ainda mais lenta. Um ciclo de divisão celular em actinobactérias pode levar de 2 a 3 dias para se completar, enquanto que em *Escherichia coli* é de 20 minutos (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1981).

O principal habitat das actinobactérias é o solo, mas podem ser encontrados em diferentes tipos de habitats, como em ambiente aquático, nódulos de raízes de plantas, plantas em decomposição, fezes de animais, sedimentos, lodo ativado, ocorrem como endófitos e epifíticos (MCCARTHY; WILLIAMS, 1990).

Actinobactérias apresentam uma variedade morfológica bastante diversificada, como cocóide (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por exemplo, *Arthrobacter*), ocorre fragmentação de hifas (por exemplo, *Nocardia* spp.) e podem ser altamente

diferenciadas em micélio ramificado (por exemplo, *Streptomyces* spp.) (RAJU et al., 2010).

Além da diversidade morfológica, as actinobactérias apresentam também funções metabólicas importantes, como a produção de enzimas extracelulares (xilanase, lipase e celulase) e a síntese de vários metabólitos secundários como, por exemplo, os antibióticos estreptomicinas, neomicina e candicina (FIEDLER, 2008).

Os maiores produtores de antibióticos são as actinobactérias, tendo por volta de 3300 compostos conhecidos com destaque para o gênero *Streptomyces*, que é o principal produtor destes metabólitos bioativos. Existe uma grande variedade de compostos produzidos por uma mesma linhagem de *Streptomyces*, como também um mesmo composto sintetizado por distintas estirpes, levando assim, a uma variabilidade química natural (WAKSMAN et al., 2010).

2.2 GÊNERO *STREPTOMYCES*

O gênero *Streptomyces*, segundo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (WHITMAN et al., 2012), é o mais conhecido dentre as actinobactérias, pois abrange mais de 500 espécies já identificadas. Pertence à família *Streptomycetaceae*; subordem *Streptomycineae*; ordem *Actinomicetales* e subclasse *Actinobacteridae*. São organismos aeróbios obrigatórios, que sintetizam compostos voláteis como a geosmina, que confere ao solo o odor característico de terra molhada (TORTORA et al., 2011; MADIGAN et al., 2010).

O gênero *Streptomyces*, ocorre predominantemente em solo, e é conhecido por produzir uma ampla variedade de moléculas bioativas como antimicrobianos, enzimas, agentes antitumorais, antivirais, promotores de crescimento, entre outros.

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (WHITMAN et al., 2012), a micromorfologia é um fator importante na distinção entre *Streptomyces* e outras actinobactérias. A caracterização microscópica deste gênero pode ser realizada através da microscopia do micélio aéreo, que forma cadeia de esporos, denominado esporóforos e/ou conidióforos, podendo ser retos, flexuosos, em forma de espirais com uma ou duas voltas ou longos espirais.

Além da microscopia, a macromorfologia também tem uma importância considerável na identificação das actinobactérias. As características macroscópicas, tais como a pigmentação de esporos, micélio substratal e pigmentos difusíveis, concomitantemente com a morfologia das colônias e textura do micélio aéreo, tem sido amplamente utilizado na classificação, identificação e muitas vezes estas variáveis tem valor taxonômico (WHITMAN et al., 2012).

Em *Streptomyces*, o desenvolvimento começa com a germinação dos esporos, quando este encontra condições favoráveis de temperatura e nutrientes, formando o tubo germinativo que cresce por extensão dando origem a hifa vegetativa, está se ramifica transformando em micélio vegetativo. Em contrapartida a diminuição de nutrientes e outros sinais podem promover o crescimento da hifa aérea que quebra a tensão superficial, escapando do ambiente aquoso onde se encontra o micélio vegetativo. Essa hifa do micélio aéreo se diferencia gerando a cadeia de esporos que é desencadeada com a formação simultânea de septos na hifa aérea. A liberação de esporos fecha um ciclo de crescimento, chamado polarizado devido ao fato das duas hifas (vegetativa e aérea) emergirem de um esporo (Figura 1) (FLÄRDH; BUTTNER, 2009).

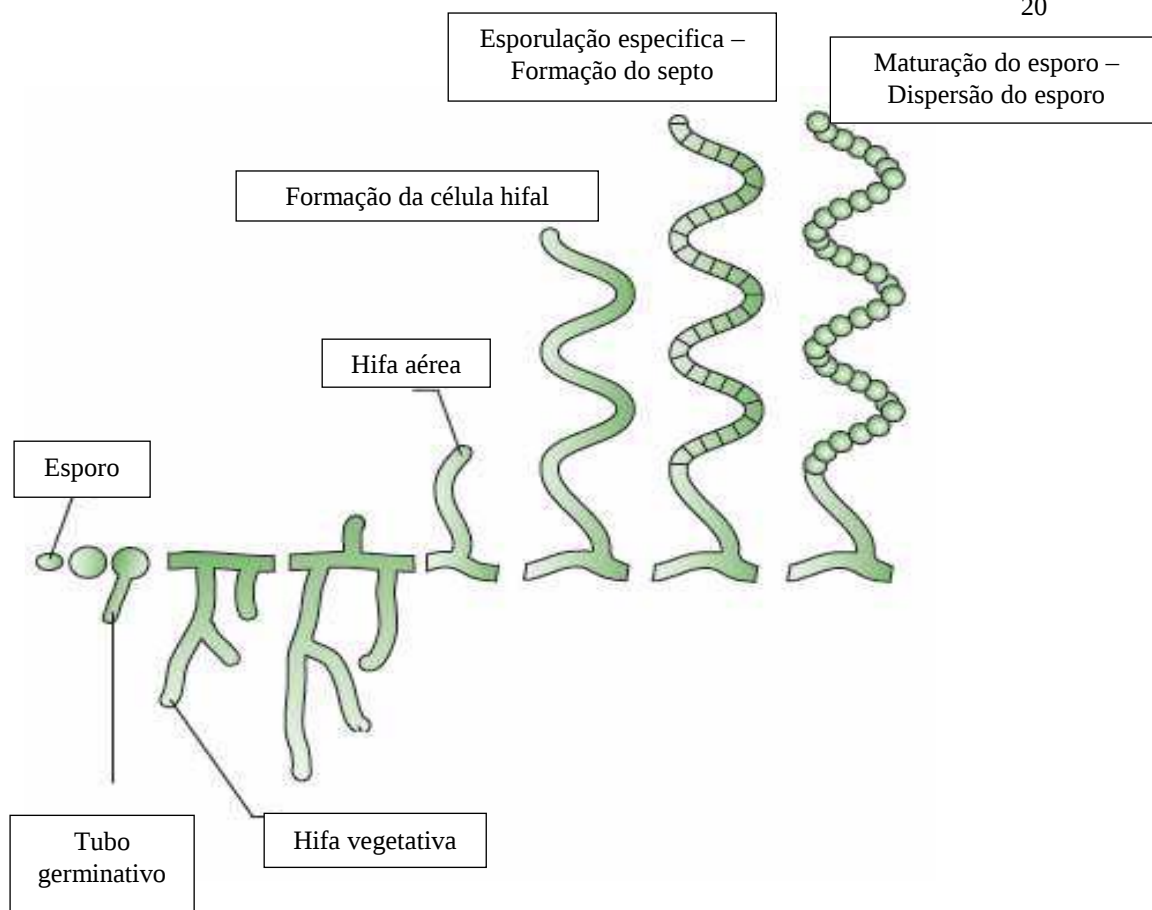


Figura 1. Ciclo de vida do *Streptomyces coelicolor* (FLÄRDH; BUTTNER, 2009).

Esse gênero é utilizado em grande escala para produção de mais de 50% dos compostos antimicrobianos empregados rotineiramente na clínica medica e em medicina veterinária (PEACOCK, 2003).

Estes micro-organismos estão entre as bactérias mais bem estudadas, por meio do impacto econômico causados pelos metabólitos bioativos produzidos. Dentre estes metabólitos merecem destaque os policetídeos e peptídeos não ribossomais. O início da produção de metabólitos secundários acontece na fase estacionária quando o micro-organismo é cultivado em meio líquido, enquanto que em ágar sua produção coincide com o início da diferenciação morfológica (WEBER, et al., 2003).

Seguramente, a produção de antibióticos é a mais importante e a mais estudada características das actinobactérias, especialmente o gênero *Streptomyces*, caracterizado

como o maior produtor dos antibióticos utilizados em humanos, na veterinária e na agricultura (TADDEI et al., 2006).

O gênero *Streptomyces* é o único gênero microbiano capaz de produzir todos os grupos de antibióticos: aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamacrolídeos, β -lactâmicos, peptídeos, glicopeptídeos, antraciclinas, tetraciclinas, nucleosídeos, polienos e quinonas (TADDEI et al., 2006). Como também é um excelente produtor de enzimas extracelulares, como endoglucanase que permite a degradação da parede celular de fitopatógenos de plantas (BOUKAEW et al., 2011).

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A princípio, um dos fundamentais impulsionadores do desenvolvimento e fonte de soluções técnicas para os problemas atuais e futuros da humanidade é a busca por novos produtos biológicos, por meio da diversidade de micro-organismos e de sua atividade antimicrobiana que apresentam uma ampla gama de aplicações (BELOQUI et al., 2008).

Segundo Newman e Cragg (2007), os produtos naturais continuam sendo uma fonte importante de novos produtos farmacêuticos, constituindo a fonte mais produtiva para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas.

Fundamentado em observações folclóricas e empíricas, os extratos de produtos naturais foram os primeiros, e por um longo período de tempo, os únicos medicamentos disponíveis para a humanidade (GANESAN, 2008). Os extratos microbianos representam uma fonte valiosa de diversas moléculas, onde muitos esforços na descoberta dessas moléculas têm levado ao isolamento de várias drogas importantes (CLARDY, 2007).

Além de plantas, os micro-organismos representam uma fonte riquíssima de metabólitos bioativos, gerando assim importantes produtos para a indústria farmacêutica, dentre eles: agente antimicrobianos como os beta-lactâmicos (penicilina e cefalosporina), tetraciclinas (clortetracilina), aminoglicosídeos (estreptomicina), macrolídeos (eritromicina), glicopeptídeos (vancomicina), lipodepsipeptídeos (daptomicina); agentes imunossupressores como ciclosporina e rapamicina; agentes hipolipêmicos como lovastatina e fármacos anti-helmínticos e antiparasitários como a ivermectina (NEWMAN; GRAGG, 2007; CRAGG; NEWMAN, 2013).

De acordo com Martin e Demain (1980), metabólitos secundários produzidos por micro-organismos não são essenciais para a diferenciação celular. Estes metabólitos são desenvolvidos por rotas biossintéticas particulares decorrentes de produtos do metabolismo primário, acarretando uma grande variedade estrutural e ampla atividade biológica.

Metabólitos secundários são moléculas de adaptação que evoluíram para propósitos diferentes daqueles do metabólito primário. São produzidas pelas espécies por razões fisiológicas, sociais ou predatórias específicas (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

Cerca de 47% dos metabólitos microbianos (aproximadamente 33000 compostos) apresentam algum tipo de atividade biológica e cerca de 40% (aproximadamente 28000 compostos) são antibióticos convencionais. O gênero *Streptomyces* são conhecidos como grandes produtores de metabólitos secundários bioativos, produzindo cerca de 39% de todos os metabólitos microbianos conhecidos (BÉRDY, 2012).

As actinobactérias apresentam metabolismo extremamente rico e, comumente, produzem metabólitos secundários de importante diversidade química, os quais atraem o interesse de diversas indústrias biotecnológicas (SOARES et al., 2012). Actinobactérias produzem uma grande variedade de metabólitos secundários,

provavelmente refletindo as diferenças de habitats e estratégias de sobrevivência dos mesmos (HARVEY, 2000).

A biossíntese de metabólitos secundários em actinobactérias envolve a seguinte sequência de etapas: 1) captura de nutrientes pela célula e sua conversão em intermediários do metabólito primário; 2) acúmulo de metabólitos primários e sinalização por moléculas induzindo a produção de metabólitos secundários; 3) metabólitos primários percorrem rotas para a produção de um metabólito secundário específico; 4) produção destes metabólitos secundários é regulada por genes de rotas específicas (BERVANAKIS, 2008).

O gênero *Streptomyces* é líder na produção de moléculas farmacologicamente ativas, dentre elas pode-se citar: aminoglicosídeo, macrolídeo, ansamacrolídeo, beta-lactâmico, peptídeo, glicopeptídeo, antraciclina, tetraciclina, nucleosídeo, polieno e quinona (NASCIMENTO et al., 2009).

2.3.1 ANTIBIÓTICOS

Antibióticos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de impedir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos. Quando causam a morte microbiana são chamados bactericidas e, quando promovem a inibição do crescimento microbiano, bacteriostáticos (GUIMARÃES et al., 2010).

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

A descoberta e o uso de antibióticos na década de 1950 têm sem dúvida, conferido um dos maiores benefícios à humanidade. Sobre os 10-15 anos seguintes da descoberta dos antibióticos, o tempo médio de vida da população aumentou significativamente, algumas doenças infecciosas tornou-se quase desaparecidas, e várias doenças neoplásicas e virais tornou-se controlável. Os antibióticos foram determinados como sendo úteis no tratamento de infecções bacterianas, fungicas, protozoários e algumas doenças fisiológicas (por exemplo, a redução do colesterol) (BERDY, 2012).

O primeiro antibiótico a ser empregado com sucesso foi a penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928 e que se tornou disponível como fármaco desde 1940. Em meados da década de 1940, as indústrias inglesas e norte-americanas estavam produzindo bilhões de unidades de penicilina. (AMINOV, 2010).

A penicilina ainda é um dos antibióticos mais vendidos no mundo (SCIENCE MUSEUM, 2013). Ao longo do tempo, os antibióticos aumentaram a sobrevivência após graves traumas e, com isso, passaram a ser empregados disseminadamente, tanto é que os antibióticos estão entre os medicamentos mais vendidos mundialmente (VAN BOECKEL et al., 2014).

Fleming foi um dos primeiros pesquisadores que advertiu sobre o potencial de resistência à penicilina se for consumida em quantidade muito pequena ou durante um período muito curto do tratamento. Com isso, motivou uma nova frente de pesquisa na busca de novos antibióticos a partir de culturas de micro-organismos, especialmente fungos e actinobactérias (AMINOV, 2010; GUIMARÃES et al., 2010; SAGA; YAMAGUCHI, 2009; SYKES, 2001; TAVARES, 2001).

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).

O primeiro antibiótico descoberto a partir de *Streptomyces* foi a estreptomicina em 1944, com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose e, desde esse tempo muito esforço tem sido feito na triagem de antibióticos a partir desse gênero (CWALA; IGBINOSA; OKOH, 2011).

Lechevalier e Waksman em 1948 descobriram a neomicina, um aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces fradiae* usado como antibacteriano tópico e, em 1953, a candidicina, um polieno produzido pelo *Streptomyces griseus* utilizado como produto antifúngico tópico (DEMAIN, 2006).

Entre os diferentes tipos de fármacos antimicrobianos existentes no mercado, os antifúngicos são um grupo muito pequeno, mas significativo de medicamento e tem um papel importante no controle de doenças micóticas (THAKUR et al., 2007).

Quando comparada as substâncias antibacterianas, o número de droga antifúngica adequada é muito limitado. É muito mais difícil de alcançar a toxicidade seletiva nas células fúngicas do que nas células bacterianas, isto devido ao fato de que os fungos pertencem ao domínio *Eukarya* e a sua maquinaria celular é idêntica à dos animais (ESPINEL-INGROFF, 2009).

A necessidade de novos compostos antifúngicos, seguros e mais eficaz é um grande desafio para a indústria farmacêutica da atualidade, especialmente com o aumento de infecções oportunistas em hospedeiros imunocomprometidos e pela crescente resistência aos medicamentos (DHANASEKARAN et al., 2008).

2.4 POLICETÍDEO SINTASE E PEPTÍDEO SINTASE NÃO RIBOSSOMAL

As rotas biossintéticas presentes em micro-organismos e plantas são responsáveis pela produção de uma ampla diversidade estrutural de compostos químicos. Contudo, a biossíntese de metabólitos secundários em micro-organismos é estreitamente controlada por mecanismos regulatórios que, frequentemente, limitam a descobertas de novos compostos bioativos (MIAO et al., 2006).

O estudo químico destes micro-organismos levou a identificação de vias biossintéticas destes produtos naturais elucidando a complexidade do seu processo. Com a descoberta das tecnologias de DNA recombinante, a biossíntese destes metabólitos em nível genético, colaborando para um melhor entendimento de sua organização e numerosos genes associados com a produção destes metabólitos secundários (COX; GLOD, 2004).

Os policetídeos e os peptídeos não ribossomais tratam-se de compostos que tem uma grande e estruturalmente distinta família de produtos naturais bioativos (HILL, 2005), como diversos antibióticos, toxinas, sideróforos e imunossupressores (CANE et al., 1998, CROSA; WALSH, 2002).

Estes compostos são sintetizados por enzimas multifuncionais de alto peso molecular (200-2,000 kDa) de bactérias, fungos e plantas (CANE et al., 1998, MOFFITT; NEILAN, 2003), denominadas peptídeo sintase não ribossomal (*NRPS*) e policetídeo sintase (*PKS*).

Em meio aos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces*, os policetídeos e peptídeos não-ribossomais compõem uma das classes mais importantes e podem ocorrer esporadicamente em determinadas condições de cultivo em laboratório. Inúmeros compostos são produzidos apenas em condições específicas, em contraste

com os metabólitos ditos primários, responsáveis pela estrutura e energia de todas as células vivas (CRUZ et al., 2015).

O esqueleto *NRPS* pode ser composto por estruturas químicas lineares, cíclicas ou ramificadas por meio de acilação, glicosilação ou formação do anel heterocíclico (MARAHIEL et al., 1997).

Os *NRPSs* estão envolvidos na produção de importantes antibióticos tais como as penicilinas, vancomicinas e ciclosporinas. Os *PKSs* modulares, os quais estão aproximadamente relacionados com os *NRPSs*, são descritos na biossíntese do antibiótico eritromicina produzidos pelas actinobactérias (MANTOVANI, 2011).

As enzimas estão organizadas de forma modular, e utilizam regiões específicas para que ocorra a condensação de ácidos carboxílicos simples (*PKS*) ou aminoácidos (*NRPS*), construindo sequência em forma de cadeia crescente, de forma similar a uma linha de montagem (MANTOVANI, 2011).

O gene *pks* são organizados em módulos composto pelos domínios: aciltransferase (AT), cetosintase (KS) e proteína transportadora de acil (ACP) (SCHWARZER et al., 2003). Já os *nrps* são formados de maneira geral por três domínios, cada um desempenhando uma função específica: domínio de adenilação (A), domínio de tiolação (T), domínio de condensação (C) (MARAHIEL et al., 1997). O *nrps* também é organizado em módulos, cada um dos quais é responsável por um ciclo de alongamento pela incorporação de um único aminoácido no crescimento da cadeia peptídica. Estes domínios são conhecidos com: adenilação (A), proteína transportadora de peptidil (PTP) e condensação (C), todos envolvidos no reconhecimento e condensação do substrato (SCHWARZER et al., 2003).

Os *PKSs* são classificados em dois tipos de acordo com sua arquitetura enzimática e organização genética, *PKS I* e *PKS II*. O tipo I são proteínas

multifuncionais e podem ser encontrada em bactérias, fungos e plantas. O tipo II são complexo multi-enzimáticos constituído por proteínas monofuncionais e são encontrados apenas em bactérias. A presença dos genes *nrps* e *pks* está intimamente relacionada com a biossíntese de importantes antifúngicos produzidos pelas actinobactérias como nistatina e candicidina (SELPKE et al., 2011).

Sendo as vias *nrps* e *pks* associadas com a síntese de metabólitos secundários, um método eficaz para analisar a presença dessas vias biosintética é a detecção de genes *nrps* e *pks*. A utilização da PCR com primers específicos para a sequência dessas regiões é um método muito promissor para a identificação e seleção de bactérias que possuam estes genes (SACIDO; GENILLOUD, 2005; ZHAO et al., 2011).

O entendimento e a distribuição das vias biosintéticas naturais é de suma importância para a produção de novos compostos usando a máquina biosintética existente em cada organismo, especialmente para obtenção de antibióticos derivados de policetídeos e peptídeos não ribossomais (GUIMARÃES et al., 2010).

2.5 DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os antibióticos têm sido empregados muitas vezes inapropriadamente e, em diversas situações clínicas, sem baseamento científico em evidências que comprovem sua real indicação. Os antibióticos são usados de forma inadequada de até 60% dos casos de infecções respiratórias, e em quase 40% dos casos de diarreia em países em desenvolvimento, uma vez que predominam as infecções virais e /ou parasitárias. Segundo a OMS, o uso de antibióticos mesmo quando são formalmente prescritos, pode ser desnecessário em até 50% dos casos (WHO, 2010).

Estima-se que 80 milhões de brasileiros são adeptos da automedicação, sendo o Brasil o quinto país do mundo que mais se automedica (FREITAS, 2012). A automedicação, está diretamente relacionado com a predominância da resistência antimicrobiana, que por sua vez, contribui para a seleção de bactérias que se tornam resistentes aos antibióticos, criando um círculo vicioso (GRIGORYAN et al., 2006).

A resistência microbiológica é um problema de saúde mundial. (SPELLBERG; GUIDOS & GILBERT, 2008). Consequentemente, alguns micro-organismos ficaram tão resistentes aos antimicrobianos que são resistentes a todos antibióticos disponíveis no mercado (MORGAN et al., 2011).

A venda de antimicrobianos para pacientes não hospitalares na Europa e na América do Norte, é praticamente restrita, mediante prescrição médica, com o intuito de reduzir o aparecimento de resistência microbiológica, entretanto em outras regiões o acesso aos antibióticos sem prescrição é frequente, contribuindo para a expansão do gigantesco mercado farmacêutico (VAN BOECKEL et al., 2014).

São diversos os mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência a antifúngicos, como por exemplo, alterações no alvo molecular do fármaco, “sobre expressão” da molécula alvo, diminuição da concentração intracelular do fármaco (efluxo), perdas de porinas, alterações na biossíntese de esteróis, produção de enzimas fúngicas que degradam as drogas (PEMÁN et. al., 2011).

Os fungos foram desenvolvendo uma variedade de mecanismos para escapar ou diminuir a regulação das respostas imunes do hospedeiro, principalmente por modificação da exposição do comportamento da parede celular, tal mudança fenotípica é uma mudança estratégica empregada por vários fungos patogênicos, como por exemplo *Candida albicans*, sendo capaz de se transformar de uma forma de célula, levedura, para forma de hifas. A formação de hifas está associada ao mecanismo de

evasão por perda de reconhecimento adequado pelo sistema imune do hospedeiro (RIZZETO et al., 2013; VAN de VEERDONK et al., 2008).

As mutações que causam defeitos na captação flucitosina ou na sua conversão intracelular são uma das principais causas de resistência a esta droga (PAPON et al., 2007). Uma diminuição do teor de ergosterol na membrana pode conduzir a susceptibilidade reduzida aos polienos, devido a mutações no gene *erg6*, gene envolvido na biossíntese de ergosterol, ou ao decréscimo de sua expressão (VANDEPUTTE et al., 2006). Já, a resistência ao fluconazol pode ser causada por mutações no gene *erg11*, também envolvido na biossíntese de ergosterol (RODLOFF et al., 2011).

A superexpressão de outros genes *erg* e do gene *erg11* em *C. albicans* pode ser causada por uma mutação de ativação de seu regulador Upc2 (proteína desacopladora 2) (DUNKEL et al., 2008), 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 (MORSCHHAUSER, 2009).

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).

Segundo o IMS *Health* (2013) atualmente o Brasil é o 4º no mercado de consumo de medicamentos do cenário global (superado apenas por China, Estados Unidos e Japão). Ainda mais, quando se leva em conta que o Brasil é um país que se automedica com frequência, ocupando o 5º lugar mundial, com aproximadamente 80 milhões de brasileiros se utilizando dessa prática danosa. A evolução da resistência aos antibióticos por importantes patógenos humanos tornou os antibióticos originais (penicilina,

estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina) e a maioria dos seus sucessores ineficazes (CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009).

As doenças infecciosas são uma das principais causas de mortalidade no mundo, representando 25% de todas as mortes. Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, cerca de 2 milhões de infecções resistentes à drogas são descritas a cada ano, levando a um aumento de custos para o sistema de saúde (MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012).

2.6 GÊNERO *CANDIDA*

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes e ordem Saccharomycetales. Este gênero contém mais de 150 espécies, mas apenas uma minoria é causadora de micose humana (NCBI Taxonomy, 2011). São leveduras anamórficas, cujo mecanismo de divisão celular envolve o brotamento simples, divisão binária e brotamento fissão (GUARRO et al., 1999; BRION, et al., 2001).

Candida albicans é o principal patógeno humano do gênero *Candida*, mas outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae*, tem sido frequentemente observadas como causadoras de infecções fúngicas (PICHOVA et al., 2001; COLOMBO & GUIMARAES 2003; MARCHETTI et al., 2004; MEDRANO et al., 2006; GIOLO & SVIDZINSK, 2010).

Esse gênero possui ampla distribuição, sendo encontrado em vários ambientes. São micro-organismos comensais que se tornam patógenos quando ocorre um desequilíbrio na relação parasita/hospedeiro (SIDRIM; ROCHA, 2004). O desequilíbrio da relação parasita-hospedeiro, pode ser desencadeada por alterações das barreiras

teciduais, da própria microbiota e da resposta imune (DRAGO et al., 2000, CALDERONE; FRONZI, 2001).

Desde os anos 1950 que a terapêutica contra às infecções fúngicas é feito com anfotericina B e azólicos, como por exemplo fluconazol e itraconazol. No Brasil, infecções por *Candida* spp tem sido duas a quinze vezes mais frequente que em países do Hemisfério Norte, tendo sido ela o quarto principal micro-organismo isolado em hemoculturas (FURLANETO, et al., 2011).

No Brasil, em um estudo realizado no Complexo Hospitalar Santa Casa, em Brasília, foi verificado que espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam a 51,6% dos episódios de candidemia na instituição; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e outras espécies foram responsáveis por 25,8%, 13,3%, 3,3%, 1,7% e 7,5% dos casos, respectivamente (ANTUNES et al., 2004; MICELI et al., 2011).

Candidemia é a quarta infecção sanguínea mais recorrente em pacientes hospitalizados, sendo uma importante causa de mortalidade (MICELI et al., 2011). Os isolados de *Candida* possuem inúmeros fatores de virulência, como a formação de biofilme, e a produção de enzimas extracelulares como a proteinase e a fosfolipase (BALLAL & VINITHA, 2009).

Apesar de mais vantajosos que a anfotericina B, os compostos azólicos apresentam limitações como espectro de atividade e desenvolvimento de resistência. A resistência desta tem ocorrido, porém, em índices menos alarmantes que nos Estados Unidos. Devido a essas limitações, novos fármacos com amplo espectro vêm sendo desenvolvidos, entre eles: os triazólicos voriconazol e posaconazol e a classe equinocandina caspofungina e micafungina (SABLE et al., 2008).

O estudo de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos auxilia na seleção de fármacos mais adequado para o tratamento das infecções com a determinação da

resistência ou sensibilidade. Contudo, o conhecimento de cepas resistentes, conduziu mudanças nas diretrizes de tratamento em diferentes áreas geográficas, além disso, pode ser significativo no tratamento clínico (CUENCA-ESTRELLA et al., 2010; SOLECKA et al., 2012).

3) OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o potencial biotecnológico de actinobactérias com relação à produção de metabólitos bioativos frente a diferentes isolados clínicos fúngicos.

3.2 Específicos

- Selecionar actinobactérias produtoras de metabólitos secundários antifúngico;
- Avaliar a influência das condições de fermentação na produção dos metabólitos secundários;
- Determinar a concentração mínima inibitória do extrato bruto bioativo;
- Identificar a Actinobactéria produtora do composto bioativo.
- Pesquisar o envolvimento e/ou a produção de genes *pks* e *nrps* associados à produção de metabólitos secundários.

4) REFERÊNCIAS

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

AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, 1, 134. doi:10.3389/fmicb.2010.00134, 2010.

ANTUNES, A.; PASQUALOTTO, A.; DIAZ, M.; AZEVEDO, A.; SEVERO, L. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 46, n. 5, p. 239-241, 2004.

BALLAL, M. and VINITHA, M. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in candida species isolated from haematogenous samples. **The Journal of Hospital Infection**. 73(1) 94-95, 2009.

BELOQUI, A.; D'MARIA, P.D.; GOLYSHIN, P.N.; FERRER, M. Recent trend in industrial microbiology. **Current opinion in Microbiology**, Elsevier Ltd., 11:240-248, 2008.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal os Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BERNARDO, G. R. B. **Atividade Antifúngica de Actinobactérias Da Rizosfera de *Terminalia fagifolia* (Bioma Caatinga) Ativas Contra *Candida* Spp.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pernambuco. 2012.

BERVANAKIS, G. Detection and Expression of Biosynthetic genes in Actinobactéria. A thesis submitted for the degree of masters of science. Department of medical biotechnology school of medicine, faculty of health sciences. Flinders University, 2008.

BOUKAEW, S.; CHUENCHIT, S.; PETCHARAT, V. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. **BioControl**, v. 56, p.365-374, 2011.

BRION, J.P., EGGIMAN, P., GRILLOT, R., HERBRECHT, R., LORTHOLARY, O., PITTET, D., POULAIN, D., SOLLET, J.P., VOSS, A., VERWEIJ, P., WOLFF, M., Les candidoses systémiques. **1ère Journée Interdisciplinaire sur les \infecions Fongiques (JIDIF)** Optimed Editions, Paris 2001.

CALDERONE, R. A.; FRONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microb.** 9: 327-335, 2001.

CANE, D. E., WALSH, C. T., AND KHOSLA, C. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. **Science**, 282: 63–68, 1998.

COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infeccoes hematogenicas por *Candida spp.* **Rev Soc Bras Med Trop.** 36: 599-607, 2003.

COX, R.J.; GLOD, F. Fungal polyketide synthases in the information age. In: Tkacz JS, Lange L, editors. Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. New York: Plenum Publisher. p. 69-96, 2004.

CUENCA-ESTRELA, M.; GOMEZ-LOPES, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BERNAL-MARTINEZ, L.; CUESTA, I.; BUITRAGO, M.J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Comparison of the vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the sensititre yeastOne and etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. **J Clin Microbiol.** v. 48, n. 5, p. 1782-1786, May, 2010.

CHATER, K.T. Streptomyces inside –out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, [London], United Kingdom, v. 361, p. 761 – 798, 2006.

CLARDY, J. Discovery of new compounds in nature. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 151, n. 2, p. 201-210, 2007.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n.6, p. 3670-3695, 2013.

CROSA, J. H., AND WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev.** 66: 223–249, 2002.

CRUZ, P.L.R. et al. Triagem metabólica por PKS e NRPS em actinobactérias endofíticas de *Citrus reticulata*. **Química Nova**. vol. 38. no. 3. São Paulo, 2015.

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.

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

DUNKEL, N.; LIU, T.; BARKER, K.; HOMAYOUNI, R.; MORSCHHAUSER, 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.

DRAGO, L.; MOMBELLI, B.; VECCHI, E.; BONACCORSO, C.; FASSINA, M. C.; GISMONDO, M. R. *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor? **Int J Antimicrob Agents**, 16: 545-547, 2000.

DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVUM, A. An antifungal compound: 4` phenyl-1-naphthyl – phenyl acetamide from *Streptomyces* sp. DPTB16. **Medicine and Biology**. v. 15, n. 1, p. 7-12, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 26, n. 1, p. 15-22, 2009.

FIEDLER, H. P. et al. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the Actinomycete *Verrucosisspora*. **J. Antibiot**, v.61, n.3, p. 158-163, 2008.

FURLANETO, M. C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2011.

FLÄRDH K, BUTTNER MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology**. 36-49, 2009.

FREITAS, A. Brasil tem de três a quatro farmácias a mais por pessoa. **Infonet, Saúde, notícias**, 2012. Disponível em: <http://www.infonet.com.br/saude/ler.asp?id=135784>.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 306-317, 2008.

GIOLO, M.; SVIDZINSK, T. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

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**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

GRIGORYAN, L., HAAIJER-RUSKAMP, F. M.; BURGERHOF, J. G. M. Selfmedication with antimicrobial drugs in Europe. **Emerging Infectious Disease Journal**, 12: 452-459, 2006.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **DDT**, Brasília, v. 5, p. 294-300, 2000.

HILL, R.A. Marine natural products. **Annu Rep Prog Chem**, 101:124–136, 2005.

IMS HEALTH INSTITUTE. The Global Use of Medicines: Outlook Through. Disponível em: <http://www.imshealth.com/deployedfiles/ims/Global/Content/Insights/IMS%20Institute%0for%20Healthcare%20Informatics/Global%20Use%20of%20Meds%202011/Medicines_Outlook_Through_2016_Report.pdf>. 2013.

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

LECHEVALIER, H.A. & LECHEVALIER, M.P. **Introduction of the order Actinomicetales**. IN: Starr, m.p.; stolp,h.; truper, h.g.; balow,a.; schlegel, h.g. ed. **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, v. 2, p. 1915-2123, 1981.

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

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

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.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKGER, U. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clin Infect Dis** 38: 311-320, 2004.

MARAHIEL, M. A.; STACHELHAUS, T.; HENNING, D. M. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chem. Rev.** v. 97, p. 2651-2673, 1997.

MARTIN, J.F.; DEMAINE, A.L. Control os antibiotic synthesis. **Review Microbiology**, New York, v. 44, p. 230-251, 1980.

MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R. S.; ROCHA, M. F. G.; RABENHORST, S. H. B.; SIDRIM, J. J. C. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev Inst Med Trop.** S. Paulo, 48: 17-20, 2006.

MIAO, L.; KWONG, T.F.N.; QIAN, P.Q. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrimum* c.f. *saccharicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 72, 1063-1073, 2006.

MICELI, M.; DIAZ, J.; LEE, S. Emerging opportunistic yeast infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 142-151, 2011.

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

MORGAN, D. J., OKEKE, I. N., LAXMINARAYAN, R., PERENCEVICH, E. N.; WEISENBERG, S. Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. **Lancet Infectious Disease**, 11: 692-701, 2011.

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

MCCARTHY A.J, WILLIAMS S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in environment – a review. **Gene**, Amsterdam, v. 115, p. 189-192, 1990.

NASCIMENTO, T. P.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Efeito da Fonte de Carbono e de Nitrogênio na Produção de Metabólitos Antimicrobianos por *Streptomyces* sp. **IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX**. 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat.Prod.**, 70, 461-477, 2007.

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

O`BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Currente Opinion in Biotechnology**. v. 22, p. 552-558, 2011.

PAPON, N.; NOEL, T.; FLORENT, M.; GIBOT-LECLERC, S.; JEAN, D.; CHASTIN, C.; VILLARD, J.; CHAPELAND-LECLERC, F. Molecular mechanism of flucytosine

resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 1, p. 369-371, 2007.

PEACOCK, L.; WARD, J.; RATLEDGE, C.; MARK DICKINSON, F.; ISON, A. How *Streptomyces lividans* use oils and sugars as mixed substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 157-166, 2003.

PEMÁN, J. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad a fluconazol de los aislamientos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. **Rev. Iberoam. Micol.** 28: 91–99, 2011.

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.

PICHOVA, I.; PAVLICKOVA, L.; DOSTAL, J.; DOLEJSI, E.; HRUSKOVA-HEIDINGSFELDOVA, O.; WEBER, J.; RUMML, T.; SOUCEK, M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur J Biochem.** 268: 2669-2677, 2001.

PROCÓPIO, R. E. L.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; AZAVEDO, J. L.; ARAÚJO, J. M. Antibiotics Produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 16 (5): 466–471. 2012.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L.; LI, W. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RAJU, A.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardriopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardriopsis* sp. **Chemistry European Journal**, v.16, p.3194 - 3200, 2010.

REX, J.; RINALDI, M.; PFALLER, M. Resistance of candida species to fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 39, p. 1-8, 1995.

RIZZETO, L.; GIOVANNINI, G.; BROMLEY, M.; BOWYER, P.; ROMANI, L.; CAVALIERI, D. Strain dependent variation of immune responses to *A. fumigatus*: definition of pathogenic species. *Plos One*. v. 8, n. 2, 2013.

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

SACIDO, A.; GENILLOUD, O. 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**, v. 49, p. 10-24, 2005.

SABLE, C. A., STROHMAIER, K. M., CHODAKEWITZ, J. A. Advances in Antifungal Therapy. **Annu. Rev. Med.** 59, p. 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.

SELPKE et al., A Single *Streptomyces* Symbiont Makes Multiple Antifungals to Support the Fungus Farming Ant *Acromyrmex octospinosus*. **Plos one**, v. 6, 1-8, 2011, 2011.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G., Candidiase. In: SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 265-274, 2004.

SOARES, E. C. L.; COSTA, E. P.; SILVA, L. C. N.; ARAÚJO, J. M. Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* Sp. UFPE 968. **Scientia Plena**, 8 (12): 01–07. 2012.

SOLECKA, J.; ZAJKO, J.; POSTEK, M. and RAJNISZ, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. **Cent. Eur. J. Biol.** 7(3): 373-390, 2012.

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

SCHWARZER, D., FINKING, R. AND MARAHIEL, M.A. Nonribosomal peptides: from genes to products. **Nat. Prod. Rep.** 20, 275–287, 2003.

Science Museum. **Brought to life. Exploring the history of medicine**. 2013.
Disponível em:
<<http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/people/alexanderfleming.aspx>>.

SPELLBERG, B., GUIDOS, R.; GILBERT, D. The epidemic of antibiotic resistant infections: A call to actions for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease**, 46: 155-164, 2008.

SYKES, R. Penicillin: from discovery to product. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 778-779, 2001.

TADDEI A.; RODRIGUEZ M. J.; MARQUEZVILCHEZ, E.; CASTELLI C. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. **Microbiological Research**. v.161 p. 222—231, 2006.

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

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

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

VAN BOECKEL, T.P. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **The Lancet Infectious Diseases**, 14(8):742 – 750. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7). 2014.

VAN de VEERDONK, F. L.; KULLBERG, B. J.; VAN de MEER, J. W.; GOW, N. A.; NETEA, M. G. Host-microb interaction: innate pattern recognition of fungal pathogens. **Curr Opin Microbiol**. v. 11, n. 4, p. 305-312, 2008.

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; BERGES, T.; HENNEQUIN, C.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolated of *candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 51, n. 3, p. 982-990, 2006.

WAKSMAN, S. A.; SCHATZ, A.; REYNOLDS, D. M. Production of Antibiotic Substances by Actinomycetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1213 (2010) 112-124. 2010.

WALSH, C.T. The chemical versatility of natural-product assembly lines. **Acc Chem Res.** 41:4–10, 2007.

WEBER, T.; WELZEL, K.; PELZER, S.; VENTE, A.; WOHLLEBEN, W. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. **Journal of biotechnonology.** v. 106, p. 221- 232, 2003.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Essential Medicines Biennial Report: 2008–2009. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/s16822e.pdf> Acesso em: 08 set. 2010.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K. I.; PARTE, A. **Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology.** vol. 5. Springer. 2012.

YAGUE, P.; LÓPEZ-GARCÍA, M. T.; RIOSERAS, B.; SÁNCHEZ, J.; MANTECA, Á. Pre-Sporulation Stages of Streptomyces Differentiation: State-of- the-Art and Future Perspectives. *FEMS. Microbiology Letters*, 342 (2): 79–88. 2013.

ZOMORODIAN, K.; HAGHIGHI, N.N.; RAJAEI, N.; PAKSHIR, K.; TARAZOOIE, B.; VOJDANI, M. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Med Mycol.** 49:208–11, 2011.

ZHAO, K. et al. The diversity and anti-microbial activity os endophytic Actinomycetes isolated from medicinal plants in panxis plateau, China. **Curr. Microbiol.** v. 62, p. 182-190, 2011.

5) ARTIGO

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ENVOLVIMENTO DE
GENES BIOSINTÉTICOS EM ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA
CAATINGA**

A ser submetido ao periódico “Journal of Applied Microbiology”
(Impacto: 2.386)

INVESTIGATION OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL AND INVOLVEMENT OF BIOSYNTHETIC GENES IN ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM CAATINGA

Vasconcelos, N.M.¹; Silva, M. V.²; Correia, M. T. S.²; Araújo, J.M.¹; Nascimento, M.S.⁴; Lima, G.M.S.^{1,3}

¹Genetics Laboratory, Dep. of Antibiotics - UFPE, PE, Brasil;

² Molecular Biology Laboratory, Dep. of Biochemistry – UFPE, PE, Brasil;

³ Laboratory Collection of Microorganisms (UFPEDA), Dep. of Antibiotics – UFPE, PE, Brasil;

⁴ Natural Products Laboratory, Dep. of Antibiotics – UFPE, PE, Brasil.

corresponding author: e-mail: gmslima@yahoo.com.br

ABSTRACT

The study aimed to investigate the antifungal potential produced by actinobacteria isolated from the rhizosphere of Caatinga against isolates of *Candida* spp. Of the 45 actinobacteria analyzed, only the PR-32 strain showed activity against clinical isolates of yeasts. Subsequently, this strain was grown in six different culture media and was observed best production of the metabolite in the medium 400 at 48 h of fermentation. The antifungal substance extracted from biomass with ethanol and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The lower evidenced MIC was 3.9 mg / mL for *Candida albicans* URM 6401. The kinetics of death reinforced the result of MIC and showed that in the period 4-8 h the extract inhibited the yeast. The isolated PR-32 was identified by polyphase methodology, showing typical morphological and biochemical characteristics of *Streptomyces*. By molecular analysis 16S rRNA was characterized as *Streptomyces* sp. The presence of non-ribosomal peptide gene (NRPS) with approximately 750 kb was confirmed. Given these results were conclude that *Streptomyces* sp. PR-32 is a promising isolate to produce antifungal compounds, it is possible to suggest that the biological activity of this secondary metabolite is regulated by the *nrps* gene.

Key-words: Secondary metabolite, MIC, Kinetics of death, NRPS, 16S rRNA.

INTRODUCTION

In recent decades, the number of opportunistic infections caused by *Candida* spp. species has increased considerably. Especially in patients with low immunity, these species can cause different types of infections, from mild oral disease to systemic candidiasis (Patel et al., 2012).

Although *C. albicans* is the most commonly found species in fungal infections (63-70%), recent studies have indicated non-albicans species associated with infections such as *Candida glabrata*, the second species most commonly found responsible for about 44% of fungal infections (Miceli et al., 2011).

The increase in microbial resistance to antifungal agents is a major public health problem. And in this scenario there is a concern for introducing a limitation in the number of commercially available antifungal substance. Therefore, the motivation for the search for bioactive compounds derived from Microorganisms isolated from unexplored habitat (Singh et al., 2009).

Our research group has been investigating the actinobacteria diversity of the Caatinga with antifungal activity, whereas little is known about the diversity of these bacteria in this habitat. Importantly, extreme environmental conditions are a breeding ground and able to reveal the presence of Microorganisms producers of new bioactive molecules (Vasconcelos et al., 2015; Silva-Lacerda, et al., 2016).

The Caatinga is a relatively unexplored Brazilian biome characterized by hot and dry weather associated with irregular rainfall and concentrated in a short period of time thus represents a very peculiar habitat, with its own characteristics which biodiversity is extremely rich and still very underexplored (Araújo, 2011).

Actinobacteria are ubiquitous bacteria, often isolated from soil and are known for their industrial importance, since they are considered the main producers of different secondary metabolites including antibiotics, within this large group worth mentioning the *Streptomyces* genre responsible for producing about 39% all microbial secondary metabolites (Takahashi, 2004; Meena et al., 2013). The metabolic diversity of actinomycetes, is due to their extremely large genome, which has hundreds of transcription factors that control gene expression, allowing them to respond to specific needs (Goshi et al., 2012).

Streptomyces bacteria are among the more studied, due to the economic impact achieved through the metabolites produced. Important classes of active compounds of

microbial origin are synthesized by large multi-modular enzymes, polyketides (PKS) and non-ribosomal peptides (NRPS). These biosynthetic pathways have been extensively studied with respect to their ability to generate a wide range of compounds which have antimicrobial activity, anti-tumor, immunomodulating, siderophores or toxic properties (Koglin and Walsh, 2009). The NRPS are involved in the production of such important antibiotics as penicillin, vancomycin and cyclosporins and modulators PKS, which are closely related to the NRPS, that are described in erythromycin biosynthesis (Walsh, 2007).

Because of this the aim of our study was to evaluate the antifungal activity of different isolated actinobacteria Caatinga front of *Candida* spp. and correlating the involvement of *pks* and *nrps* genes in the production of bioactive metabolite.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Initially were used 45 actinomycetes strains isolated from the rhizosphere of Caatinga belonging to Collection of Microorganisms of the Department of Antibiotics UFPE (UFPEDA). To perform the the antifungal activity were used fungi assigned by Colection- URM of the Department of Mycology- UFPE to Collection *Candida peliculosa*- URM 6281; *C. albicans*- URM 6401; *C. guilliermondii*- URM 6403; *C. parapsilosis*- URM 6431; *C. glabrata*- URM 6392; *C. albicans*- URM 6395, and Microorganisms of the Department of Antibiotics UFPE (UFPEDA) *C. albicans* UFPEDA 1007.

Antifungal Activity:

Primary test: The antifungal activity was evaluated using the test method in agar block (Shirling and Gottlieb, 1996). Microorganisms were plated in the form of carpets on ISP-4 and ISP-2 media and incubated for 7 days at 37 °C. Then agar blocks of 10 mm in diameter were removed from the media and added to the plates containing Sabouraud (SAB) with 10⁶ CFU / ml of yeast (CLSI, 2008). The plates were incubated at 30 ± 2 °C

and the inhibition zones were measured after 48 h. The experiment was performed in triplicate.

Secondary test: The microorganism that showed better activity in the agar block was selected for the fermentation process and grown in ISP-2, M1, MPE (Kawamura et al., 1976) 400, 19 and OM media (Goodfellow and Fiedler, 2010). Kept under stirring at 200 rpm at 37 °C for 48 hours. Every 24 hours, 1 ml aliquots were taken for evaluation of pH, biomass and antimicrobial activity. For evaluation of the antifungal activity was performed the test disk paper with 10 mm of diameter moistened with 50 µl of fermented liquid and then transferred to previously seeded Petri dishes with 100 µL of standard suspensions of each yeast assay (10^6 UFC / ml) (Vasconcelos, et al., 2015). The test was performed in triplicate and the results were determined by arithmetic average of the diameters of the inhibition halos in millimeter (mm).

Extraction of bioactive metabolites: In the extraction of bioactive metabolites of cell mass and liquid, various chemical solvents were used. The cell mass was treated with acetone, ethanol, methanol, ethyl acetate and cyclohexane, at different pH 2.0, 7.0 and 9.0. As for the metabolic liquid used were ethyl acetate, chloroform, petroleum ether, ethanol and cyclohexane in different pH mentioned above. After extraction the pH of the extract was adjusted to 7.0. Then we performed the test of antifungal activity in paper disc as mentioned above (Vasconcelos et al., 2015).

Determination of Minimum Inhibitory Concentration

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract was performed using microdilution technique in multiwell plates (Vasconcelos et al., 2015). The extract was tested at concentrations of 3.9 µg / mL to 1000 µg/ mL. Then added 10 µL of the inoculum (10^6 CFU/ml) in all columns except column twelve that corresponds to the negative control. Was used as positive control the antifungal Amphotericin B. The minimal fungicidal concentration was determined by MIC assay of subcultivation in SAB media. The plates were incubated at 30 °C for 48 h (Koneman, et al., 2006). Each sample was tested in triplicate.

Determination of Kinetics of Death Time

The procedure for determining the kinetics of time death were accomplished using the methodology Klepser et al., (1998). The crude extract and Amphotericin B (used as positive control) were diluted in liquid SAB medium such that is obtained concentrations equivalent to $\frac{1}{2}$, 1X, 2X, and 4X MIC. At time intervals of 0, 4, 8 and 24 hours, an aliquot of these solutions were removed, diluted and plated out on Sabouraud dextrose agar plates were incubated at 30 °C for 48 hours. The assay was performed in duplicate. After this incubation period the number of colony forming units (CFU) on each plate were counted and multiplied by the dilution factor used to obtain thereby the number of CFU / mL. The curves average colony count were constructed by plotting (log CFU / mL) versus time (hours).

Polyphasic identification of Actinobacteria:

Cultural and micromorphological characterization: The cultural characteristics of strain such as growth and color of aerial mycelium were analyzed in media ALA Tryptone - yeast extract - agar (ISP-1), Extract-Malt - yeast extract - agar (ISP-2), Oatmeal - agar (ISP-3), inorganic salts - starch - agar (ISP-4), Glycerol - asparagine - agar (ISP-5), Peptone - Iron Extract - agar (ISP-6) and tyrosine - agar (ISP-7) and the ISP- 6 and ISP-7 media used to assess the production of melanoid pigments. The experiment was performed in triplicate. To identify the micromorphology the analyzed strain was cultivated by the microculture technique in accordance technique of Shirling and Gottlieb (1966), the cover slips were incubated at 37 °C in the period 7-10 days. A cover slip was removed to observe the formation of the spore chain - sporophores – at the optical microscope objective of 40x (WHITMAN et al., 2012).

Characterization Physiological and Biochemical: For the biochemical characterization was used different sources of carbon and nitrogen, and to the physiological characterization of the strain the ability to grow at different NaCl concentrations, temperatures and pH. The microorganism was incubated at 37 °C in 7 days (Shirling and Gottlieb, 1966).

16S rRNA analysis: DNA extraction was performed from the culture grown in ISP-2 medium liquid for 16 hours, 200 rpm at 37 °C. Subsequently, the sample was centrifuged and the DNA extraction was performed using the HiPurA TM Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Himedia) according to the manufacturer's instructions.

The sequence of the DNA was assessed by agarose gel electrophoresis then was performed 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction technique (PCR). The reaction mixture consisted of 50 ng of DNA, 5 pmoles of each oligonucleotide to Eubacteria fD1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991), 200 mM of dNTP, 1.5 mM of MgCl₂, 1X buffer, 1 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) to a reaction with a final volume of 25 µl. The reaction conditions were: 5 min denaturation at 94 °C; followed by 25 cycles of 1 min at 94 °C, 30s at 52 °C and 2 min at 72 °C, a final extension of 10 min at 72 °C. The amplification product was analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gel and visualized by transillumination, subsequently, the sample was sent to sequencing. The sample was sequenced by the Platform Sequencing-LABCEN / CCB/UFPE and the sequence compared with all sequences in the GenBank using Blast software from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). The sequence was aligned with Clustal software and the phylogenetic tree was constructed using mega 7.0. The topology was evaluated by bootstrap analysis (1000 resampling).

Potential evaluation of Actinobacteria by amplification of genes NRPS and pksII

For the amplification of sequences of the PKS and NRPS genes, degenerate oligonucleotides were used A3F (5'- GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'); A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3') and KS α (5'- TSGRCTACRTCAACGGSCACGG-3'), KS β (5'- TACSAGTCSWTCGCCTGGTTC-3'), respectively. The reaction consists of a mixture of 50 ng of DNA, 5 pmoles of each oligonucleotide, 200 mM of dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1X buffer, 1 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) in a final volume of 25 µL. The reaction conditions are: 5 min denaturation at 94 °C; followed by 30 cycles of 35 s at 94 °C , 40 sec at 55 °C and 2 min at 72 °C these cycles will be followed by a final extension of 7 min at 72 °C. The amplification product was analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gel and visualized by transillumination (GONZÁLEZ, 2005).

Results

Primary test

The result showed that the primary assay gives 45 strains of actinomycetes, only the PR 32 strain showed activity against pathogens, with inhibition zones ranging from 10 mm to 20 mm in ISP2 medium, other strains grew, but not produced bioactive metabolites (Figure 1). The presence of metabolite secondary active provided the formation of a clear halo around the disc, whose diameter indicated antimicrobial potential against certain microorganism test.

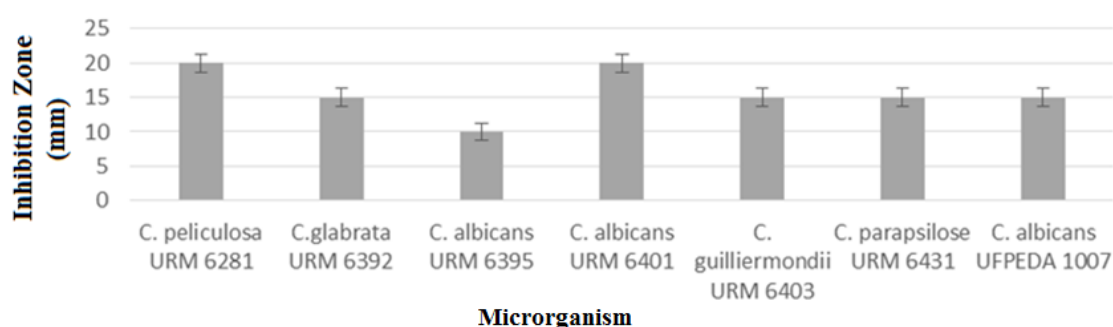


Figure 1: Mean values of the inhibition zones (in millimeters) of microorganisms test the primary test of PR-32 strain on ISP-2 medium.

Secondary test

The isolated PR-32 selected in primary assay was used to determine the best growth conditions as well as the best medium and cultivation time and for the production of the secondary metabolite. Isolated PR-32 when grown in medium 400 showed better activity in 48 h, pH 7.0 with inhibition zones ranging from 20 to 28 mm (Table 1). The ISP-2 medium and OM showed no antimicrobial activity against yeasts tests.

Table 1: Antifungal activity of isolated PR-32 during 96 hours of fermentation, the different culture media used, front yeasts tests.

PR- 32	<i>Candida albicans</i> <i>URM-6401</i>				<i>Candida guilliermondii</i> <i>URM-6403</i>				<i>Candida pelliculosa</i> <i>URM-6281</i>				<i>Candida albicans</i> <i>URM-6395</i>				<i>Candida parapsilosis</i> <i>URM-6431</i>				<i>Candida glabrata</i> <i>URM-6392</i>				<i>Candida albicans</i> <i>UFPEDA-1007</i>			
MEDIUMS	Activity (mm) (SD)*				Activity (mm) (SD)				Activity (mm) (SD)				Activity (mm) (SD)				Activity (mm) (SD)				Activity (mm) (SD)				Activity (mm) (SD)			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
MPE	20 (0,94)	19 (1,41)	17 (2,05)	14 (0,47)	20 (0)	15 (0)	10 (0)	10 (1,41)	23 (0,94)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (1,4)	11 (2,3)	11 (2,35)	10 (0)	18 (1,41)	10 (0)	13 (2,35)	9 (0,47)	16 (0,47)	10 (0)	10 (0)	9 (0,47)	23 (0,47)	16 (1,24)	15 (0,71)	9 (0,47)
M1	18 (1,63)	17 (2,05)	11 (1,41)	6 (4,49)	13 (2,35)	10 (0)	0 (0)	0 (0)	17 (2,16)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15 (0)	10 (0)	0 (0)	0 (0)	13 (1,41)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (0,47)	13 (2,35)	10 (0)	0 (0)
400	22,6 (2,05)	28 (1,41)	25 (0)	24,33 (0,94)	21,6 (2,35)	20 (0)	22,6 (0,47)	22,6 (0,47)	24,6 (0,47)	28 (14)	23 (0)	26 (0)	19,3 (0,4)	24,3 (0,9)	21,6 (2,35)	23,3 (2,3)	20,3 (0,47)	24,3 (0,94)	20 (0)	21,3 (0,94)	20 (0)	21 (1,4)	20 (0)	20 (0)	20 (0)	20 (0)	21 (1,4)	10 (0)
19	19,3 (0,94)	19,6 (0,47)	0 (0)	0 (0)	16,3 (1,69)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (2,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	15,3 (0,4)	13 (0)	0 (0)	0 (0)	14,6 (1,24)	14,3 (0,94)	0 (0)	0 (0)	15 (0)	12 (0)	0 (0)	0 (0)	13,3 (1,24)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*SD= Standard deviation.

Extraction of Bioactive Metabolite and Determination of Minimum Inhibitory Concentration

After determining the best fermentation conditions, the strain was subjected to extraction of the active principle. The result shows that ethanol was a better solvent that extracted the bioactive metabolite of biomass of *Streptomyces* PR- 32 having halos of 30 mm against the yeast *C. pelliculosa* 6281 URM at neutral pH. Extracts of the solvents obtained from metabolic liquid, had no activity against strains of *Candida* spp.

The antimicrobial activity of crude ethanol extract of biomass isolated PR-32 was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (Table 2). The ethanol extract exhibited an MIC value ranging from 3.9 µg / ml to 31.5 µg / mL against different fungal isolates. The control used was the antifungal amphotericin B showed that CMI of 7.8 µg / ml for all the strains. Were determined resistant to amphotericin B concentration ≥ 4 µg / ml (CLSI 2008). The final concentration of DMSO, solubilizing agent of extracts, used in the assay had no effect on inhibiting the growth of Microorganisms test.

Table 2: Values of minimum inhibitory concentration of crude extracts and positive control (amphotericin B), compared to fungi.

Test microorganisms	MIC and MFC (µg/mL) of ethanolic extract		MIC and MFC (µg/mL) of Amphotericin B	
	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>C. albicans</i> - URM 6401	3,9	7,8	7.8	15.6
<i>C. guilliermondii</i> - URM 6403	31.25	62.5	7.8	15.6
<i>C. pelliculosa</i> - URM 6281	7,8	15.6	7.8	15.6
<i>C. albicans</i> - URM 6395	31.25	62.5	7.8	15.6
<i>C. parapsilosis</i> - URM 6431	31.25	62.5	7.8	15.6
<i>C. glabrata</i> - URM 6392	15,6	31,25	7.8	15.6
<i>C. albicans</i> - UFPEDA 1007	15,6	31,25	7.8	15.6

Determination of Kinetics of Death Time

At the time of death activity kinetics of the crude ethanolic extract isolated PR -32 against strains of *Candida* spp., as well as the amphotericin B, it was observed that the concentration of 2X and 4X MIC values presents significant marked inhibition in the early hours test (4h to 8h period), highlighting a significant inhibitory activity of the extract. The concentration of $\frac{1}{2}$ MIC showed significant activity against the strains *C. parapsilosis* URM 6391 and *C. glabrata* 6392 URM for the period from 4 to 8hs test. After 24 h period showed fungicidal activity of the crude ethanolic extract isolated PR-32 constant at all concentrations tested, as well as in all isolates with the fungicidal activity of the positive control Amphotericin B compared to the isolates of *Candida* spp (Table 3).

Table 3: Kinetic curve crude extract death time ethanolic isolated PR 32 in Log10 base at concentrations of EB ½ MIC, EB MIC, EB 2X MIC, EB 4X MIC of amphotericin B and control the concentrations of ANF ½ MIC , ANF MIC, ANF 2X MIC, ANF 4X MIC front of the clinical isolates of *Candida* spp.

	<i>Candida albicans</i> <i>URM-6401</i>				<i>Candida guilliermondii</i> <i>URM-6403</i>				<i>Candida pelliculosa</i> <i>URM-6281</i>				<i>Candida albicans</i> <i>URM-6395</i>				<i>Candida parapsilosis</i> <i>URM-6431</i>				<i>Candida glabrata</i> <i>URM-6392</i>				<i>Candida albicans</i> <i>UFPEDA-1007</i>			
MIC	Time				Time				Time				Time				Time				Time				Time			
	0h	4h	8h	24h	0h	4h	8h	24h	0h	4h	8h	24h	0h	4h	8h	24h	0h	4h	8h	24h	0h	4h	8h	24h	0h	4h	8h	24h
EB ½ MIC	3,48	3,32	3,66	3,71	3,48	3,85	4,32	4,32	3,24	3,19	3,24	3,24	3,55	3,55	4,27	4,27	2,90	2,65	2,60	2,54	2,65	2,54	2,39	2,39	3,35	3,34	3,51	3,51
EB MIC	3,42	3,41	3,33	3,33	3,43	3,51	3,50	3,61	3,13	3,09	3,09	3,09	3,54	3,29	3,24	3,24	2,69	2,65	2,30	2,17	2,54	2,47	2,39	2,39	3,32	3,31	3,38	3,38
EB 2X MIC	3,23	3,19	3,14	3,15	3,31	3,25	3,24	3,24	2,97	2,95	2,92	2,92	3,67	3,20	3,04	3,04	2,81	2,69	2,39	2,30	2,47	2,39	2,30	2,17	3,29	3,16	3,16	3,17
EB 4X MIC	3,17	2,95	2,87	2,87	3,39	3,11	3,10	3,10	2,97	2,81	2,77	2,77	3,66	3,17	3	3	2,59	2,30	2,17	2,17	2,47	2,39	2,30	2,30	3,29	3,20	3,09	3,11
ANF ½ MIC	3,30	3,68	3,70	3,73	3,48	3,55	4,32	4,32	3,26	3,25	3,29	3,29	3,56	3,55	4,27	4,27	2,69	2,39	2,30	2,30	2,54	2,39	2,30	2,30	3,31	3,49	3,52	3,53
ANF MIC	3,37	3,48	3,49	3,60	3,44	3,76	3,77	3,80	3,19	3,14	3,14	3,14	3,55	3,30	3,25	3,20	2,65	2,60	2,54	2,39	2,47	2,39	2,30	2,30	3,34	3,47	3,49	3,49
ANF 2X MIC	3,27	3,24	3,30	3,35	3,37	3,35	3,32	3,33	3,13	3,09	3,07	3,07	3,67	3,21	3,06	3,05	2,60	2,54	2,47	2,17	2,54	2,39	2,17	2	3,33	3,46	3,46	3,47
ANF 4X MIC	3,21	3,20	3,09	3,04	3,46	3,26	3,25	3,25	3,04	3	2,97	2,97	3,65	3,14	2,95	2,95	2,59	2,30	2,17	2,17	2,47	2,30	2,17	2,17	3,36	3,38	3,37	3,37

Identification of the genes that encode enzymes *PKS* and *NRPS*

The presence of *PKS* and *NRPS* genes was investigated. Genes that are involved in the biosynthesis of antibiotics produced by Actinobacteria. *Streptomyces* sp. PR - 32 amplified for the *NRPS* gene. The amplification products were demonstrated by the presence of approximately 750 bp. *Streptomyces* sp. PR - 32 showed no amplification for *pks* gene.

Cultural, Morphological and Molecular identification of Actinobacteria

The microorganism PR-32 was able to use as a single source of carbon D-xylose, lactose, L-arabinose, L-rhamnose, maltose, mannitol, D-melezitose, trehalose, glucose and sucrose, as the nitrogen sources used were histidine serine and asparagine, not being able to consume arginine, cysteine, phenylalanine, L-methionine, threonine, valine and proline. The strain was able to grow in NaCl concentrations ranging from 2 to 12%, with growth being decreased at higher concentrations of this salt, having the best growth on medium ISP-2 staining pale gray aerial mycelium in temperature 37 °C and pH 7, the isolated PR-32 showed no melanoid pigment production.

The microorganism PR- 32, presented typical chemical and morphological properties of members of the genus *Streptomyces*. In the evaluation of macroscopic characteristics showed that the isolate was identified as belonging to the genus *Streptomyces*, as presented in the analysis of optical microscopy spiral and branched mycelia. After sequencing compared to all sequences in the GenBank, the sample showed 99% similarity with strain *Streptomyces mutabilis* NBRC 12800 (Figure 2). Although it has similar biochemical characteristics, the isolated PR-32 showed phenotypic characteristics, such as color of aerial mycelium in various different media, so identified by sequencing *Streptomyces* sp. PR- 32 (Table 4).

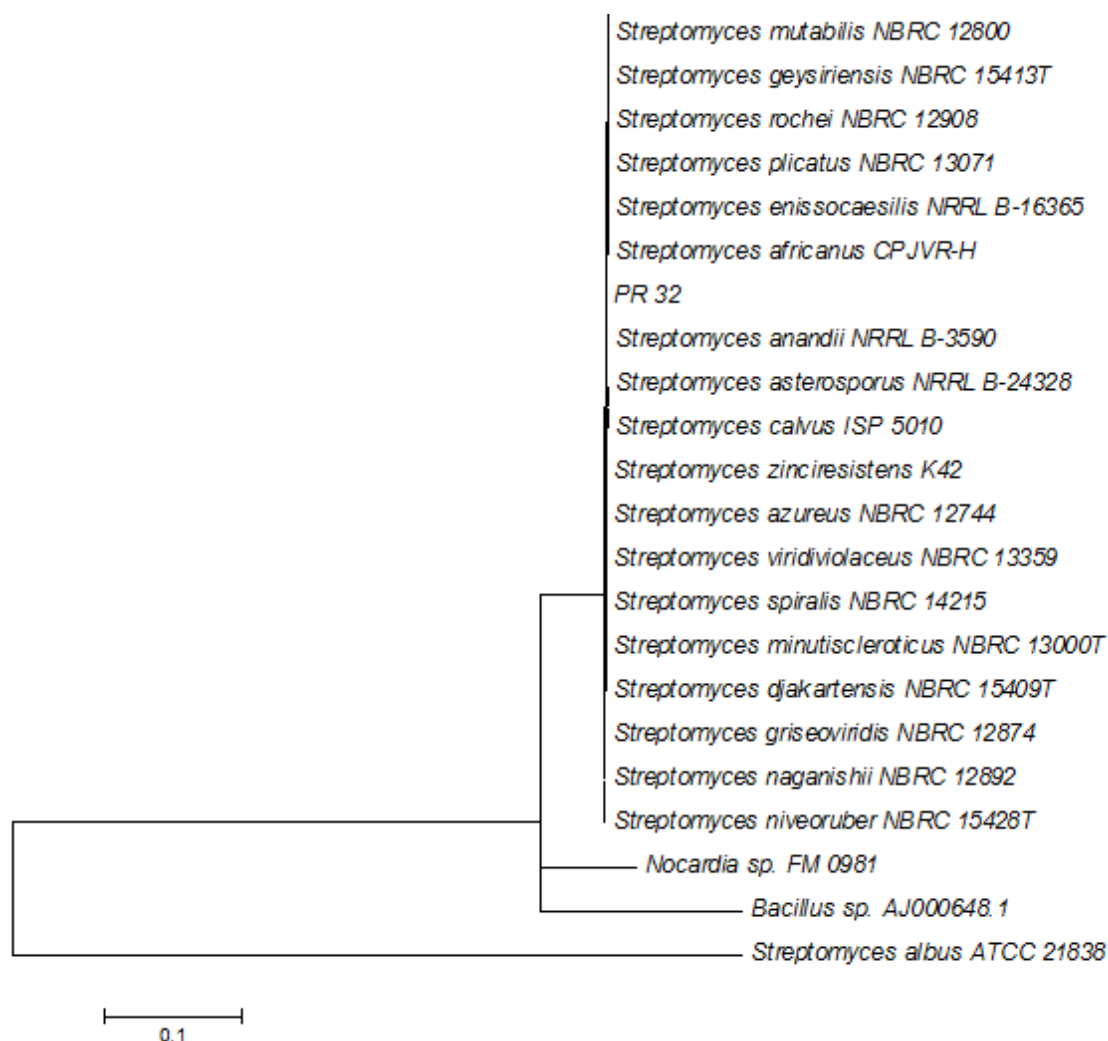


Figure 2: Neighbor-joining based on the partial sequence of the 16S rDNA, showing phylogenetic relationships between *Streptomyces* sp. PR- 32 with other species of *Streptomyces*. Bar, sequence divergence of 0.1%.

Table 4: Phenotypic and biochemical that differentiate the isolated *Streptomyces* sp. PR-32 from the nearest phylogenetic estirper.

Characteristic	<i>Streptomyces</i> sp. PR- 32	<i>Streptomyces mutabilis</i>
Aerial spore mass colour Oatmeal agar (ISP 3)	Light Brown	Gray/ White
Aerial spore mass colour Yeast-extract-malt extract agar (ISP 2)	Light Gray	White
Growth on sole carbon sources		
D-melezitose	+	+
D-xylose	+	+
Lactose	+	+
L-arabinose	+	+
L-rhamnose	+	+

Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Glucose	+	+

Growth on sole nitrogen sources

Arginine	-	-
Cysteine	-	-
Phenylalanine	-	-
Histidine	+	+
L-methionine	-	-
Serine	+	+
Threonine	-	-
Valine	-	-
Proline	-	-
Asparagine	+	+

All of the data are from the present study, apart from the morphological data on the reference strains which were taken from Whitman et al., 2012.

+ With growth; - No growth.

Discussion

Epidemiological studies have shown a considerable increase in infections caused by yeasts. Yeasts are considered commensal agents of the normal microbiota and its pathogenicity is the result of changes in host defense mechanisms that induce changes in behavior of the fungus (Ashman, 2008; Richardson and Rautemaa 2009; Homsani et al., 2013).

The transformation of the yeast from commensal to infectious agent occurs mostly with the increase of the number of invasive procedures breaking natural protective barrier, the extensive use of broad spectrum antimicrobials and the most debilitated people and susceptible to opportunistic micro-organisms (Barbedo and Sgarbi, 2010).

As such, research on the medicinal value of natural products is being extensive worldwide, especially in extreme and unexplored environment, since the resistance to such compounds become a major public health problem, each increasing the number of micro-organisms resistant to antimicrobial current (Soares et al., 2012).

The Caatinga, an exclusively Brazilian biome and little explored, becomes the target of research to elucidate its biological potential in the search for new secondary compounds from natural products. It is elucidated that microorganisms, and especially actinomycetes are

an unlimited source of natural products, such as secondary metabolites that are important source of compounds with therapeutic potential (Wu et al., 2007).

Secondary metabolites such as antibiotics, are synthesized by several pathways and also genetically distinct species, its production affected by different environmental conditions. The fermentation parameters such as time, temperature, pH and nutrients may be modified aiming to increase the amount of the produced secondary metabolites (Pfefferle et al., 2000).

The importance of actinomycetes in the soil, especially the *Streptomyces* genus, has been reported by our research group to present a biotechnological potential as the production of antibiotics. Their action is particularly evident in the culture medium, by producing inhibition zones, where it forms a zone free of microbial growth, around the colony of actinobacteria which synthesizes the antibiotic (Vasconcelos et al., 2015; Silva- Lacerda et al., 2016).

Several natural products produced by *Streptomyces* are synthesized by large enzymes, known as non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) and polyketide synthase (PKS). The present study correlated the presence of antimicrobial compounds produced by microorganism s isolated from the rhizosphere of the Caatinga with the presence of genes encoding NRPS, suggesting that production of the bioactive compound may occur via non-ribosomal.

Peptides non-ribosomal and polyketides represent important classes of compounds produced by bacteria, fungi and plants. The polyketides and non-ribosomal peptides make up the chemical structure of many drugs: antibacterial, antifungal, anticancer drugs, immunosuppressants, cholesterol-lowering agents, analgesics, neurotoxins, antiparasitic and virulence determinants (RIX et al., 2002; Hill, 2005).

The biological activity of non-ribosomal peptide (NRPS) is probably enhanced by the presence of non-proteinogenic amino acids, as demonstrated by some peptides (Kawakami and Murakami, 2012). Unlike the synthesis of ribosomal peptides, NRPS enzymes are able to select and incorporate over 100 amino acids. Additionally, these amino acids may be further modified by themselves, thereby increasing the diversity of molecules generated. As a result, the NRPS are an important source of new bioactive molecules (Koglin and Walsh, 2009).

The peptide compounds produced via non-ribosomal have a broad spectrum of activity and a great importance for the pharmaceutical industry. Examples of compounds of this

class are vancomycin, penicillin, and bleomycin (an antitumor substance) (Jenke-Kodama et al., 2005). The PKS and NRPS genes are widely studied because they are involved in the biosynthesis of ribosomal pathways from antibiotics of actinobacteria. Through molecular research *Streptomyces ansochromogenes* TUR-10 showed amplification biosynthetic genes for both having excellent activity for *Candida* spp., indicating that the production of bioactive compound has been produced by ribosomal pathways. (Vasconcelos et al., 2015).

The production of bioactive metabolites may be interfered as the carbon source used in the experiment for the growth of the microorganism (Sanchez and Demain, 2002). The evaluation of the production of secondary metabolites in the primary assay is important that it be done in the best environment for the growth of actinobacteria and time required for sporulation, as the formation of these metabolites is also associated with the formation of hyphae and spores (Elliot and Talbot, 2004). The ISP-2 medium used in the primary assay, presented antimicrobial activity against *Candida* spp. however, in the fermentation process showed no activity. ISP-2 medium provides the best results in the static cultivation, however, in growing for agitation is a media that less induce the production of bioactive metabolite (Salh e Al-Zahrani, 2007).

The composition of the culture medium, allows the cell growth, can affect not favorably the antibiotic production. Studies have aimed the importance of identifying the best growing conditions and composition of the culture medium to increase production of antimicrobial substances (Kim et al., 2006; Roes and Meyers, 2005).

In fermentation, the medium 400 used has in its composition more carbon than nitrogen in a ratio of carbon: nitrogen 11, 3: 1, thereby providing a high concentration of glucose. Additionally, it is reported that means of liquid cultures with higher amounts of glucose in their composition becomes more favorable for the production of antimicrobial compounds (Cunha et al., 2009). According Goodfellow and Fiedler (2010) the medium 400 promotes the production of new secondary metabolites by *Streptomyces*.

Another factor that influences the production of antimicrobial metabolites is the pH of the culture medium. The pH presented in media MPE, M1, 400 and 19 in the fermentation processes had a variation of the neutral state for basic, results in the literature show that pH values ranging from neutral state for basic, positively influence the production of bioactive metabolites (Reddy et al., 2011;. Oskay, 2009). Mangamuri et al., (2012) evaluated the *Streptomyces cheonanensis* activity against *C. albicans* and observed improved production of bioactive compounds in 96 hours of fermentation at pH 7.0.

The extraction of bioactive metabolite according to Soares et al., (2012) may be cited as an example, some antibiotics obtained from the extraction of the cell mass: antimicrobial and antitumor produced by *Streptoverticillium* sp. (13 UFPEDA 729) which was extracted with the solvent ethanol in pH 7.0. Also with Levorin, antifungal aromatic heptaene produced by *Streptomyces levoris* 99/23 (Kuljbakh et al., 1969) was extracted from the biomass and recently obtained a mutant of *Streptomyces levoris* 99/23, where 80% of Levorin was extracted from the biomass and 20 % of metabolic liquid. This shows the importance of identifying where the antibiotic is being produced by the microorganism during the extraction process (Kozhuharova and Koleva, 2008).

Studies in Turkey show high amounts of microorganisms isolated from the soil with antifungal activity, of the various strains, 16 belonged to the genus *Streptomyces* having to be effective against different yeast with inhibition zones ranging from 12 to 20 mm (Oskay, 2009). Note the high incidence of the genus *Streptomyces* with antagonistic activity against fungi, confirming the industrial potential of their secondary metabolites (Cuesta et al., 2010).

The predominance of the genus *Streptomyces* in soil is justified for being a actinomycetes group that does not have many nutritional requirements. Other genera of actinomycetes can be isolated using more complex culture media with more sources of carbon and nitrogen. The predominance of the genus *Streptomyces* in soil, has also been reported by several researchers worldwide (Sanchez; Demain, 2002; Ceylan, Okmen and Ugur, 2008; Velho-Pereira and Kamat, 2012).

It is noted that the colonization of actinomycetes are higher in the rhizosphere soil compared to normal soil due to exudates which attracts the majority of Microorganisms (Travis 2003). The antibiotic activity of the bioactive extract of *Streptomyces* sp. PR-32 can be explained based on the fact that actinomycetes from the rhizosphere exhibits a broad spectrum of antifungal activity.

For the evaluation of the characteristics of new antimicrobial agents studies of the kinetics of death is of great value (Pfaller et al., 2004). The activity of kinetic of the death of *Streptomyces* sp. PR-32 has fungicidal activity against *Candidas* spp. in the early hours of the test (period of 4h to 8h) in varying concentrations as well as the control Amphotericin B. In the research conducted by Lemos (2008) Amphotericin B antibiotic, had its maximum fungicidal activity of the death kinetics of up to 6 hours incubation at equivalent concentrations MIC for three isolates of *Candia albicans*, is clinically important to find fungicidal compounds which are fungistatic, particularly in immunocompromised patients,

because the prophylactic fungistatic drugs have been associated with increased drug resistance often in clinical isolates (Monk and Goffeau, 2008).

The identification of Actinomycetes may be made to genus level by micromorphologic analysis of the spore chain which is specific for each genus (Meena et al., 2013). The Actinomycetes produce filaments shaped like a mycelium hyphae of fungi (Olmos et al., 2013). Bouizgarne et al., (2009).; Sudha; Selvam (2011).; Zhong et al., (2011) demonstrated that the genus *Streptomyces* is rather found in the rhizosphere of plants and easily identified by the presence of the spore chain which may be in different forms such as spiral, verticillate or straight (Suzuki, 2000; Maier, 2009). Research conducted by Raju et al., (2010), isolated 71 actinomycetes from the rhizosphere and found that 76.1% of the isolates were belonging to the genus *Streptomyces* spp. The production of antibiotics is the main property of the genus *Streptomyces*, as well as antiviral, antitumor and immunosuppressive substances (Procopio et al., 2012).

In conclusion, the results suggest that secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. PR-32 represents an untapped source of compounds with antifungal activity against the yeast, which can be a resource in the development of therapeutically natural products.

Conflict of Interest

No conflict of interest is declared.

References

- Araújo, S. M. S. (2011). A região semiárida do nordeste do Brasil: Questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. Revista Eletrônica-Revista Científica da FASETE, v.5, n.5, p. 89-98.
- Ashman, R.B. (2008). Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. Front Biosci. 13:3334–51.
- Barbedo, L. S.; Sgarbi, D. L. S. (2010). Candidíase. DST – J Bras Doenças Sex Transm., v. 22, n. 1, p. 22-38.
- Boubetraa, D.; Sabaoua, N.; Zitouni, A.; Bijani, C.; Lebrihi, A.; Mathieue, F. (2013) Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research. 168. 223–230.

Bouizgarne, B.; Lanoot, B.; Loqman, S.; Sproer, C.; Klenk, H. P.; Swings, J.; Ouhdouch, Y. (2009). *Streptomyces marokkonensis* sp. Nov. isolated from rhizosphere soil of *Argania spinosa* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 59, p. 2857–2863.

Bauer A.W. et al. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. v.45 n.4 p.493–496.

Ceylan, O.; Okmen, G.; Ugur, A. (2008). Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. EurAsian Journal of BioSciences. V. 2, p. 73-82.

CLSI. (2008). 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.

Cuesta, G., R. García, M. Abad y F. Fornes. (2010). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. Article in press. Journal of Environmental Management 1-5 p.

Cunha, I. G. B.; Peixoto Sobrinho, T.J.S.; Silva, R.E.A.; Amorim, E.L.C.; Araujo, J.M. (2009). Influência do meio de cultura na produção do metabólito bioativos do endofítico *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. Revista Brasileira de Farmacia. 90(2):120-123.

Elliot, M. A.; Talbot, N. J. (2004). Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. Current Opinion in Microbiology, Amsterdam, v. 7, p. 594-601.

González, I.; Ayuso-Sacido, A.; Anderson, A. and Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 401-415.

Goshi, K.; Uchida, T.; Lezhava, A.; Yamasaki, M.; Hiratsu, K.; Shinkawa, H.; Kinash, H. (2002). Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. J Bacteriol. 184:3411–3415.

Goodfellow, M.; Fiedler, H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. Antonie van Leeuwenhoek, vol. 98, no. 2, pp. 119–142.

Goodman e Gilman. (2010). The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, 201.

Hernández, I.M.; Fernadez, M.C.; Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A.N.; Rastrelli, L. (2005). Polyprenylated Benzophenone Derivatives from Cuban Propolis. Journal of Natural Products. v. 68, n. 1, p. 931 – 934.

Hill, R.A. (2005). Marine natural products. Annu Rep Prog Chem, 101:124–136.

Hozzein, W. N.; Rabie, W.; Ali, M. I. A. (2011). 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.

Homsani, F.; Barbosa, G.M.; Fernades, L.; Siqueira, C.M.; Santos, L.H.; Neufeld, P.; EL-Bach, T; Santos, A.L.S.; Holandino, C. (2013). Bioterápicos de Candida. *Revista de Homeopatia*. 76 20-22.

Jenke-Kodama H, Sandmann A, Müller R and Dittmann E (2005). Evolutionary implications of bacterial polyketid synthases. *Mol. Biol. Evol.* 22: 2027-2039.

Jork, H. et al. (2006). 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.

Kawamura T, Tago K, Beppu T and Arima K (1976). Antiviral antibiotic S15-1. Taxonomy of the producing strain and study of conditions for production of the antibiotic. *J. Antibiot.* 29: 242-247.

Kawakami, T.; Murakami, H. (2012). Genetically encoded libraries of nonstandard peptides. *J. Nucleic Acids*, doi:10.1155/2012/713510.

Kim, M.H.; Kong, Y.J.; Baek, H.; Hyun, H.H. (2006). Optimization of culture conditions and medium composition for the production of Micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5. *J. Biotechnol.* 121, 54–61.

Klepser, M. E.; Ernst, E. J.; Lewis, R. E.; Ernst, M. E.; Pfaller, M. A. (1998). Influence of test conditions on antifungal time kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1207-1212.

Koch, E. and Löffler, I. (2009). Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. *J. Phytopathol.* 157, 235-242.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, et al. (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins.

Kozhuharova, L. and Koleva, V.G.L. (2008). Isolation, purification and characterization of Levorin produced by *Streptomyces levoris* 99/23. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1.5.

Koglin, A.; Walsh, C.T. (2009). Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* 26, 987–1000.

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

Kuljbakh, V.O.; sokolov, L.B.; sveshnikov, J.F.; kuznestsova, A.O.; kuznestsova, L.; malinovskaja, N.; penza and raigorodskaja, V.J. e kholodova, G.V. (1969). Method for extracting the antibiotic Levorin from a culture medium. United States Patent Office. 15.

Kumar et al. (2014). In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. *BMC Microbiology*. 14:291.

Le Roes M, Meyers PR (2005). *Streptomyces pharetrae* sp. nov., isolated from soil from the semi-arid Karoo region. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 488 – 493.

Lemos, J.A. (2008). Efeitos de antifungicos na atividade de proteinase de isolados de *candida albicans* obtidos da mucosa bucal de pacientes hiv positivos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goias, Goiânia – GO.

Lima, C.S.A.; Silva, R.F.; Abreu, S.M.B.; Sena, K.X.F.R.; Nascimento, S.C. and Amorim, E.L.C. (2002). Atividade antimicrobiana e antitumoral de *Streptomyces* sp. (DAUFPE 13. 729). *Rev. Lect.* 20 (2): 161-165.

Maier, R. M.; Pepper, I. L. (2009). Distribution of Microorganisms in soil. In: *Environmental microbiology*. Academic Press, San Diego. 2ªed. p. 57-76.

MangamurI, U.K.; Poda, S.; Naragani, K.; Muvva, V. (2012). Influence of Cultural Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Streptomyces cheonanensis* VUK-A Isolated from Coringa Mangrove Ecosystem. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, v. 6, p. 99-111.

Meena, B.; Rajan, L. A.; Vinithkumar, N. V.; Kirubakaran, R. (2013). Novel Marine Actinobacteria from Emerald Andaman & Nicobar Islands: a Prospective Source for Industrial and Pharmaceutical Byproducts. *BMC Microbiology*, 13: 1-17.

Miceli, M.H.; Diaz, J.A.; Lee, S.A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, p. 142-151.

Monk, B.C.; Golfeau, A. (2008). Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science*. 321, 367-369.

Nedialkova, D.; Naidenova, M. (2005). Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *J Cult Collect*. 4:29–35.

Mohammadi, R.; Mirhendi, H.; Rezaei-Matehkolaei, A.; Ghahri, M.; Shidfar, M.R.; Jalalizand, N. (2013). Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol*. 51 (6):657-63.

NCBI. (2012). National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Nikolouli, K.; Mossialos, D. (2012). Bioactive compounds synthesized by nonribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome mining and metagenomics. *Biotechnol Lett.* 34:1393-1403.

Olmos, E.; Mehmood, N.; Haj Husein, L.; Goergen, J. L.; Fick, M.; Delaunay, S. (2013). Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* v.36, n.3, p.259-272.

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

Parsley, L.C.; Linneman, J.; Goode, A.M.; Becklund, K.; George, I.; Goodman, R.M.; Lopanik, N.B.; Liles, M.R. (2011). Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil acidobacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 78:176-187.

Patel, P.K.; Erlandsen, J.E.; Kirkpatrick, W.R.; Berg, D.K.; Westbrook, S.D.; Loudon, C. (2012). The changing epidemiology of oropharyngeal candidiasis in patients with hiv/aids in the era of antiretroviral therapy. *AIDS Res Treat.* doi:262471.

Procópio, R. E. L.; Silva, I. R.; Martins, M. K.; Azavedo, J. L.; Araújo, J. M. (2012). Antibiotics Produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16 (5): 466–471.

Pfaller, M.A.; Sheehan, D.J.; Rex, J.H. (2004). Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: Lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microbiol Rev.* 17:268-80.

Pfefferle, C.; Theobald, U.; Gürtler, H. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, v.80, p.135-142.

Raju, A.; Piggott, A. M.; Conte, M.; Tnimov, Z.; Alexandrov, K.; Capon, R. J. (2010). Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. *Chemistry European Journal*, v.16, p.3194 - 3200.

Reddy, N. G.; Ramakrishna, D.P.N; Rajagopal, S.V. (2011). Optimization of culture conditions of *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) for the production of antimicrobial metabolites. *Egyptian Journal of Biology.* v. 13, pp 21-29.

Richardson, M.; Rautemaa, R. (2009). How the host fights against *Candida* infections. *Front Biosci (Schol Ed).* 1:246–57.

- Rix, U.; Fischer, C.; Remsing, L.L.; Rohr, J. (2002). Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 19:542–580.
- Monk, B.C.; Goffeau, A. (2008). Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science.* 321:367–9.
- Salh, H.M; & Al-Zahrani. (2007). Studies on the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Jazan JKUS Sciences, vol. 19, p. 127-138.
- Saadoun, I.; Gharaibeh, R. (2003). The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotic-resistant bacteria. *J Arid Environ.* 53:365–371.
- Sanchez, S.; Demain, A.L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology.* v. 31, p. 895-906.
- Scher, J. M.; Speakman, J. B.; Zapp, J.; Becker, H. (2004). Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S. F. Gray. *Phytochemistry.* v. 65, p. 2583-2588.
- Schwarzer, D., Finking, R.; Marahiel, M.A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* 20, 275–287.
- Silva-Lacerda, G.R.; Santana, R.C.F.; Vicalvi-Costa, M.C.F.; Solidônio, E.G.; Sena, K.X.F.R.; Lima, G.M.S. (2016). Antimicrobial potential of caatinga biome actinobacteria isolated from the rhizosphere of *Caesalpinia pyramidalis*. *Genetics and Molecular Research.*
- Singh, L.S.; Mazumder, S.; Bora, T.C. (2009). Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J Myc Med.* 19:225–233.
- Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Almeida, A.M.F.; Silva, D.H.S; Bolzani, V.S.; Gianinni, M.J.S.M. (2007). The use of Standard methodology for determination of antifungal activity of Natural Products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology,* v. 38, p. 391-397.
- Shirling EB and Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 16: 313-340.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 285–295.
- Sridhar, S. R.; Rajagopal, R. V.; Rajavel, R.; Masilamani, S.; Narasimhan, S. (2003). Antifungal activity of some essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v. 51, p. 7596-7599.

Soares, E. C. L.; Costa, E. P.; Silva, L. C. N.; Araújo, J. M. Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* Sp. UFPE 968. *Scientia Plena*, 8 (12): 01–07. 2012.

Sudha, S.; Selvam, M. (2011). Antibacterial activity of a new *Streptomyces* sp. SU isolated from rhizosphere soil. *Journal of Pharmacy Research*, v. 4, n. 5, p. 1515-1516.

Suzuki, S.; Yamamoto, K.; Okuda, T.; Nishio, M.; Nakanishi, N.; Komatsubara, S. (2000). Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora*. strains in soil. *Actinomycetologica* 14, 27-33.

Takahashi, Y. (2004). Exploitation of new microbial resources for bioactive compounds and discovery of new actinomycetes. *Actinomycetology*. 18:54–61.

Travis, D. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology*. 132: 44-53.

Tsavkelova, E.; Oeser, B.; Young, L. O.; Israeli, M.; Sasson, Y.; Tudzynski, B.; Sharon, A. (2012). Identification and Functional Characterization of Indole-3-acetamide-mediated IAA Biosynthesis in Plant-associated *Fusarium* Species. *Fungal Genetics and Biology*, 49 (1): 48–57.

Vasconcelos, N.M.; Fontes, J.M.; Lins, M.R.C.R.; Bernardo, G.R.B.; Araújo, J.M.; Lima, G.M.S. (2015). *Streptomyces ansochromogenes* Tur-10 produces a substance with antifungal bioactivity. *Genetics and Molecular Research* 14 (2): 5435-5444.

Velho-Pereira, S.; Kamat, N. M. (2012). Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified "Cross-Streak" method. *Nature Precedings*, p. 1-16.

Vinhal-Freitas, I. C, Wangen, D. R. B, Ferreira; A. S, Corrêa, G. F, Wendling, B. (2010). Microbial and enzymatic activity in soil after organic composting. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, v.34, n.3, p.757-764.

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

Walsh, C.T. The chemical versatility of natural-product assembly lines. **Acc Chem Res.** 41:4–10, 2007.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.

Whitman, W. B.; Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H. J.; Trujillo, M. E.; Ludwig, W.; Suzuki, K. I.; Parte, A. *Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology*. vol. 5. Springer. 2012.

Wu, X. C.; Chen, W. F.; Qian, C. D.; Li, Q.; Li, P.; Wen, Y. P. (2007). Isolation and Identification of Newly Isolated Antagonistic *Streptomyces* sp. Strain AP19-2 Producing Chromomycins. *The Journal of Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 499-504.

Zhong, K.; Gao, X. L.; Xu, Z. J.; Gao, H.; Fan, S.; Yamaguchi, I.; Li, L. H.; Chen, R. J. (2011). Antioxidant activity of a novel *Streptomyces* strain Eril2 isolated from the rhizosphere of *Rhizoma curcumae* Longae. *Current Research in Bacteriology*, v. 4, n. 2, p. 63-72.

Zaoutis, T.E.; Greves, H.M.; Lautenbach, E.; Bilker, B.; Coffin, S.E. (2004). Risk factors for disseminated candidiasis in children with candidemia. *Pediatr Infect Dis J*. 23(7):635–41.

Zomorodian, K.; Rahimi, M.J.; Pakshir, K.; Motamedi, M.; Ghiasi, M.R.; Rezashah, H. (2011). Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. *J Global Infect Dis*. 3(4):357-60.

6) CONCLUSÕES

- A *Streptomyces* sp. PR- 32 apresentou uma boa atividade antifúngica. A linhagem foi escolhida por apresentar a melhor produção de metabólito tanto no ensaio primário como no ensaio secundário; o melhor meio neste último ensaio foi o meio 400 em 48 horas de fermentação para a produção do composto bioativo.
- O solvente etanol em pH 7,0 foi o mais eficiente para extração do composto bioativos da biomassa da linhagem *Streptomyces* sp PR- 32. A concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto apresentou uma variação de 3,9 µg/mL a 31,25 µg/mL frente a *Candida* spp. A cinética de morte reforçou o resultado da CMI e mostrou que no período de 4-8 h o extrato inibiu as cepas de *Candida* spp.
- Através da técnica de microcultivo, cultural e molecular, foi possível identificar a linhagem PR- 32 como *Streptomyces* sp. Os resultados desta caracterização sugerem uma possível espécie nova, contudo outras análises precisam ser realizadas.
- Foi evidenciada a presença do gene *nrps* com aproximadamente 750 kb. Diante destes resultados podemos concluir que *Streptomyces* sp PR-32 é um isolado promissor para produção de compostos antifúngicos, sendo possível sugerir que a atividade biológica deste metabólito secundário é regulado por peptídeo sintase não ribossomal (NRPS).