



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A
AMAZÔNIA – CITA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ACTINOMICETOS DE
SOLOS AMAZÔNICOS

RAIMUNDO CARMO DE OLIVEIRA

RIO BRANCO - AC
ABRIL – 2018

RAIMUNDO CARMO DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ACTINOMICETOS DE SOLOS
AMAZÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Dra. Clarice Maia Carvalho

**RIO BRANCO - AC
ABRIL - 2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

O482p Oliveira, Raimundo Carmo de, 1977-
Potencial antimicrobiano de actinomicetos de solos amazônicos /
Raimundo Carmo de Oliveira. – 2018.
61 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de
Pós-Graduação, Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia - CITA.
Rio Branco, 2018.

Inclui referências bibliográficas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Clarice Maia Carvalho.

1. Streptomyces. 2. Metabólitos secundários. 3. Amazônia. I. Título.

CDD: 600

Bibliotecária: Maria do Socorro de O. Cordeiro

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ACTINOMICETOS DE SOLOS
AMAZÔNICOS**

RAIMUNDO CARMO DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 13 / 04/ 2018.

**Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho
Universidade Federal do Acre - UFAC**

**Profa. Dra. Leila Priscila Peters
Universidade Federal do Acre - UFAC**

**Profa. Dra. Luciana dos Santos Medeiros
Universidade Federal do Acre - UFAC**

À minha querida esposa Helena,
Aos meus filhos Helklis Vinícius e Elika,
Aos meus pais Manoel e Maria de Fátima.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte da sabedoria, sem Ele nada seria possível, por guiar meus passos, me conceder vida, e permitir a conquista desse título.

À Professora Dra. Clarice Maia Carvalho, pela orientação concedida durante a pesquisa, pela confiança em mim depositada, pela amizade construída durante esses dois anos de trabalho, sempre chegamos a um consenso.

À Universidade Federal do Acre, e ao programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia (CITA).

À CAPES, pela concessão de bolsa.

Aos meus pais, Manoel Portela de Oliveira e Maria de Fátima Carmo de Oliveira, por me apoiarem na realização dessa pesquisa.

A minha Esposa Helena Ventura Souza de Oliveira, por me incentivar a concretizar meus objetivos, pelo carinho e confiança.

Aos meus filhos, Helklis Vinícius Souza de Oliveira e Elika Souza de Oliveira, por me incentivarem nesse trabalho.

Ao professor Dr. Antônio Gilson Gomes Mesquita por disponibilizar o Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismo.

Ao professor Dr. Fernando Escócio por ter disponibilizado o Laboratório de Nanobiotecnologia para concentração dos extratos.

Ao professor Dr. Carromberth Carioca Fernandes pela doação de solventes, e pela amizade.

Ao Laboratório de Química da UFAC, na pessoa do técnico Joelton, sempre que possível concedeu reagentes para a realização da pesquisa.

Aos mestres: Geysel e Atilon, por terem contribuído nas técnicas de isolamento e ensaios antimicrobianos.

Ao Laboratório de Microbiologia e toda equipe: Leila, Sônia, Veluma, Vítor, Daniele, Gleison, Erlan, Iasmily, Bruna, Larissa, Fábio, Rodrigo, Sebastião, Fernanda, Rosy, pela amizade e convivência durante a execução da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Os patógenos microbianos resistentes são uma ameaça à saúde pública, alertando para a necessidade de descobrir nova classe química ou compostos com boa estabilidade e potência no combate a estes patógenos. Assim, foi analisado o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários produzidos por actinomicetos isolados de amostras de solos Amazônicos. Os actinomicetos foram isolados de 30 amostras de solos em meio de cultivo ágar amido caseína (AC) e ágar quitosana (AQ), a identificação foi realizada por meio da caracterização macroscópica e microscópica, e criopreservados a -80 °C. Os extratos metabólitos dos actinomicetos foram analisados pela técnica de difusão em ágar para atividade antimicrobiana, e os com atividade antagônica foram produzidos extratos em hexano, diclorometano e acetato de etila. Os extratos foram analisados quanto a atividade antimicrobiana e os com antagonismo positivo foram analisados quanto a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição e realizado bioautografia a fim de verificar o perfil da substância ativa. Os actinomicetos com atividade também foram analisados em relação à produção de biomassa e produção de metabólitos antimicrobianos. Foram obtidos 219 actinomicetos distribuídos entre os gêneros *Streptomyces*, o mais frequente, e *Nocardia*, *Thermomonospora*, *Frankia* e *Nocardioopsis*. Dos 153 extratos metabólitos em acetato de etila analisados, doze tiveram atividade antimicrobiana, sendo nove contra bactérias Gram positivas e cinco contra *Candida albicans*. A CIM variou de 15,62 a 250 µg/mL para as bactérias *S. aureus* e *S. pneumoniae*, e contra *C. albicans* foi de 312,5 µg/mL. Três extratos apresentaram CIM igual ao cloranfenicol contra *S. pneumoniae*. A bioautografia revelou que o fator de retenção (Rf) dos compostos ativos de *Streptomyces* 3098, *Streptomyces* 3333, *Streptomyces* 3323 são diferentes das drogas eritromicina, neomicina, amoxicilina, ciprofloxacina, nistatina e cetoconazol. A produção de metabólitos antimicrobianos está correlacionada com a fase estacionária da produção de biomassa com exceção do *Streptomyces* 3098. Os resultados sugerem que esses metabólitos podem ser novas moléculas e que futuramente poderão ser utilizadas no desenvolvimento de antibióticos pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Streptomyces*; Metabólitos secundários; Bioautografia.

ABSTRACT

Resistant microbial pathogens are a threat to public health, prompting the need to discover new chemical class or compounds with good stability and potency in combating these pathogens. Thus, the antimicrobial potential of secondary metabolites produced by actinomycetes isolated from samples of Amazonian soils was analyzed. The actinomycetes were isolated from 30 soil samples in agarose (CA) and chitosan agar (AQ) agar medium, identification was performed by macroscopic and microscopic characterization, and cryopreserved at -80 ° C. The extracts metabolites of the actinomycetes were analyzed by agar diffusion technique for antimicrobial activity, and those with antagonistic activity were produced extracts in hexane, dichloromethane and ethyl acetate. The extracts were analyzed for antimicrobial activity and those with positive antagonism were analyzed for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the microdilution technique and bioautography was performed in order to verify the profile of the active substance. Actinomycetes with activity were also analyzed in relation to biomass production and production of antimicrobial metabolites. A total of 219 actinomycetes distributed among the genera *Streptomyces*, the most frequent, and *Nocardia*, *Thermomonospora*, *Frankia* and *Nocardiopsis* were obtained. Of the 153 extracts metabolites in ethyl acetate analyzed, twelve had antimicrobial activity, nine against gram positive bacteria and five against *Candida albicans*. The CIM ranged from 15.62 to 250 µg / mL for *S. aureus* and *S. pneumoniae*, and against *C. albicans* was 312.5 µg / mL. Three extracts presented MICs equal to chloramphenicol against *S. pneumoniae*. Bioautography revealed that the retention factor (Rf) of the active compounds of *Streptomyces* 3098, *Streptomyces* 3333, *Streptomyces* 3323 are different from the drugs erythromycin, neomycin, amoxicillin, ciprofloxacin, nystatin and ketoconazole. The production of antimicrobial metabolites is correlated with the stationary phase of biomass production with the exception of *Streptomyces* 3098. The results suggest that these metabolites may be new molecules and that in the future may be used in the development of antibiotics by the pharmaceutical industry.

Keywords: *Streptomyces*; Secondary metabolites; Bioautography.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Linha do tempo de alguns antibióticos produzidos a partir de isolados de actinomicetos. Adaptado de: Guimarães et al., 2010; Procópio et al., 2012; Melo, 2013; Oliveira, 2015.....	18
Figura 2.	Características macroscópicas dos actinomicetos.....	23
Figura 3.	Demonstração do processo de microdiluição e diluição seriada para avaliação da Concentração Inibitória Mínima.....	33
Figura 4.	Análise quantitativa de actinomicetos isolados de solos Amazônicos de acordo com meio de Cultura.....	37
Figura 5.	Características macroscópicas de actinomicetos isoladas de solos amazônicos cultivados em meio de cultura ágar Batata-Dextrose.....	38
Figura 6.	Características microscópicas de actinomicetos isolados e identificados visualizados em objetiva de 1000 x. (A) <i>Streptomyces</i> sp. Cadeia de esporos aberta em espiral; (B) <i>Streptomyces</i> sp. Cadeia de esporos fechada e em espiral; (C) <i>Nocardia</i> sp. Cadeia de esporos curta e hifas fragmentadas; (D) <i>Thermomonospora</i> sp. Aglomerado de esporos não forma cadeia; (E) <i>Frankia</i> sp. Forma esporângios; (F) <i>Nocardiopsis</i> sp. Forma cadeia de esporos longas e apresenta hifas largas (BARKA et al., 2016)	38
Figura 7.	Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelos actinomicetos <i>Streptomyces</i> sp. 3098, <i>Streptomyces</i> sp. 3170, <i>Streptomyces</i> sp. 3333 e <i>Streptomyces</i> sp. 3323 contra as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> os isolados <i>Streptomyces</i> sp. 3134, <i>Streptomyces</i> sp. 3323 e Actinomiceto 3345 contra a levedura <i>Candida albicans</i>	41
Figura 8.	Bioautografia dos metabólitos de actinomicetos com atividade antibacteriana. 8a. Extrato DCM <i>Streptomyces</i> 3098; 8b. Extrato Hexano <i>Streptomyces</i> 3323; 8c. Extrato AcOEt <i>Streptomyces</i> 3333; 8d. Extrato DCM <i>Streptomyces</i> 3333. (A) sistema eluente em hexano, (B) sistema eluente hexano/acetato de etila (1:1), (C) sistema eluente em acetato de etila e (D) sistema eluente em acetato de etila/metanol (1:1), (Rf) fator de retenção, (CCD) cromatografia em camada delgada, teste contra <i>S. aureus</i> e <i>S. pneumoniae</i>	47
Figura 9.	Perfil cromatográfico em CCD revelado em UV 312 nm, drogas padrão e extratos metabólitos de actinomicetos. (A) Eritromicina; (B) Neomicina; (C) Amoxicilina; (D) Ciprofloxacina; (E) Extrato Hexano <i>Streptomyces</i> 3323; (F) Extrato DCM <i>Streptomyces</i> 3098; (G) Extrato DCM <i>Streptomyces</i> 3333; (H) Extrato AcOEt <i>Streptomyces</i> 3333; (I) Cetoconazol; (J) Nistatina; (K) Extrato DCM <i>Streptomyces</i> sp. 3323. (○) Substâncias bioativas e fármacos.....	48
Figura 10.	Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie <i>Streptomyces</i> 3098.....	49
Figura 11.	Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie <i>Streptomyces</i> 3323.....	50
Figura 12.	Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie <i>Streptomyces</i> 3333.....	50

Figura 13.	Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie <i>Streptomyces</i> 3134.....	51
Figura 14.	Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie actinomiceto 3345.....	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Triagem preliminar de extratos metabólitos de actinomicetos isolados de solos amazônicos com atividade antimicrobiana.....	40
Tabela 2. Atividade antibacteriana dos extratos de metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos <i>Streptomyces</i> 3098, <i>Streptomyces</i> 3323 e <i>Streptomyces</i> 3333, Frações Hexano, Diclorometano (DCM) e Acetato de etila (AcOEt).....	43
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima dos extratos de actinomicetos isolados de solos amazônicos com atividade antimicrobiana.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Amido Caseína
AcOEt	Acetato de etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
°C	Grau Celcius
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm ²	Centimetro Quadrado
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
FeSO ₄	Sulfato de Ferro
g	Gramma
G-C	Guanina-Citosina
K ₂ HPO ₄	Fosfato monobásico de potássio
Km	Quilômero
KNO ₃	Nitrato de Potássio
L	Litro
LB	Luria-Bertani
mg	Miligrama
mg. L ⁻¹	Miligrama por litro
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MH	Müller-Hinton
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
NaCl	Cloreto de Sódio
N.I.	Não Identificado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
AQ	Ágar Quitosana
Rf	Fator de retenção
RPM	Rotação por Minuto
SD	Sabouroud Dextrose
SDA	Sabouroud Dextrose Ágar
sp.	Espécie
spp.	Espécies
16S rRNA	Gene bacteriano usado como padrão para classificação e identificação
µg	Micrograma
µL	Microlitro
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Resistência microbiana	14
2.2 Antibióticos	17
2.3 Actinomicetos: Características Gerais	20
2.4 Classificação taxonômica	21
2.5 Actinomicetos de solo	21
2.6 Identificação	22
2.6.1 Características macroscópicas	22
2.6.2 Características microscópicas	23
2.6.3 Caracterização Bioquímica	24
2.6.4 Caracterização Molecular	24
2.7 Bioautografia	25
2.8 Estudos com Actinomicetos na Amazônia	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivo Específico	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Coleta	29
4.2 Isolamento e conservação	29
4.3 Caracterização Morfológica	30
4.4 Atividade antimicrobiana preliminar	30
4.5 Atividade antimicrobiana secundária	32
4.6 Concentração Inibitória Mínima	32
4.7 Bioautografia	34
4.8 Produção de Biomassa e Metabólitos bioativos	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Actinomicetos isolados	37
5.2 Atividade antimicrobiana preliminar	39
5.3 Atividade antimicrobiana secundária	43
5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	44
5.5 Bioautografia	45
5.6 Produção de Biomassa e metabólitos bioativos	49
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Bactérias patogênicas resistentes as drogas têm sido uma preocupação mundial, fato que exige pesquisar e descobrir novos produtos contra microrganismos patogênicos (KUMAR; JADEJA, 2016). Também a incidência de infecções graves relacionadas a fungos oportunistas aumentou, devido à resistência frente às atuais classes de antifúngicos, com destaque para *Candida* spp., sendo o quarto patógeno mais isolado em infecções sanguíneas (NUNES et al., 2011).

Bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, e Gram negativas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e a levedura *Candida albicans* são microrganismos de importância médica, pois estão envolvidos em infecções do trato urinário (ROSSI et al., 2011), endocardites, pneumonias e septicemias (LIMA et al., 2015), meningite, otite média e conjuntivite (SOTO-NOGUERÓN et al., 2016). Muitas vezes esses patógenos são capazes de levar o paciente a óbito devido a capacidade de adquirirem resistência aos antibióticos utilizados com frequência, fator que tem motivado a necessidade de descobrir novos antibióticos (GEBREYOHANNES et al., 2013).

Entre as fontes promissoras de novos antibióticos, a maior importância está nos produtos naturais microbianos, com destaque para actinomicetos, pois apresentam um amplo histórico na produção de metabólitos bioativos (SINGH et al., 2014). Desde que se iniciou a produção de antibióticos em 1940, actinomicetos tem desempenhado importante atividade antagônica à patógenos humanos (JANAKI et al., 2016), sendo responsáveis por mais de 50% dos antibióticos conhecidos (KUMAR; JADEJA, 2016), principalmente por espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* (SUBHAN et al., 2015).

Actinomicetos são bactérias filamentosas Gram-positivas formadoras de esporos, cosmopolitas, colonizando os mais variados ecossistemas, tais como águas, pedras, produtos

alimentícios, animais, plantas, construções, entre outros, mas o seu habitat principal é o solo (KUMAR; JADEJA, 2016).

Na Amazônia brasileira há poucos estudos com actinomicetos isolados de plantas e de solo, podendo citar trabalho realizado por Silva et al. (2012) e Silva et al. (2016) que demonstraram a importância dos actinomicetos amazônico para a produção de metabólitos secundários bioativos. No Estado do Acre não foram encontrados trabalhos com actinomicetos para a obtenção de antimicrobiano, reforçando a importância de estudar este grupo de microrganismos, pois, ambientes poucos explorados podem revelar novos antimicrobianos (MONCIARDINI et al., 2014). Assim, este trabalho teve por objetivo analisar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários produzidos por actinomicetos isolados de amostras de solos Amazônico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resistência microbiana

As doenças infecciosas são uma das principais causas de morte no mundo, com 13,3 milhões, representando 25% de todas as mortes (MAHAJAN; ALACHANDRAN, 2012). A propagação da resistência microbiana é uma ameaça à saúde humana, porque tem diminuído a eficácia de muitos antimicrobianos (MONCIARDINI et al., 2014), problema que estimula a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos, para combater os patógenos resistentes (HUANG et al., 2012). Os principais motivos relacionados ao aumento da resistência microbiana são tratamentos inadequados ou insuficientes (STORK et al., 2018), uso de antibióticos na pecuária para controle de patógenos e aumento nos rendimentos dos animais, motivo que tem ocasionado a disseminação de genes resistentes a partir de bactérias associadas a animais para bactérias humanas (VENTOLA, 2015), associados a resistência natural desenvolvida pelos microrganismos.

O genoma bacteriano se adapta rapidamente a novas condições ambientais, possuem mecanismos de defesa sob o estresse de antibiótico, como mutações, rearranjo genômico, transferência de genes e a recombinação, estando estas características relacionadas à evolução microbiana (STRAUME et al., 2015).

A resistência primária é um processo natural de defesa dos microrganismos, que limita a ação de antimicrobianos em atingir o alvo sem que haja exposição prévia ao antibiótico, como a membrana externa das bactérias gram-negativas com baixa permeabilidade (MUNITA; ARIAS, 2016). A resistência secundária é um processo decorrente de mudanças genéticas no organismo, está relacionado com a evolução, assim os microrganismos se adaptam a certas quantidades de um antibiótico que normalmente inibiria o seu crescimento, como mutação no local alvo da droga que pode inibir a ação da droga ou até inativa-la (STRAUME et al., 2015).

Bactérias podem adquirir resistência pelos processos de: 1) transdução, na qual o DNA bacteriano pode ser transferido de uma célula à outra pelo intermédio de um bacteriófago (VENTOLA, 2015); 2) transposição, pequenos segmentos de DNA que podem se mover de uma região da molécula de DNA para outra; 3) conjugação, processo que as bactérias realizam a transferências de DNA por interação física transferindo plasmídeo de uma célula para outra (MUNITA; ARIAS, 2016); e 4) transformação, processo no qual há lise de determinado microrganismo, com liberação de material genético para o meio, dessa forma, outra bactéria adquire DNA livre que contém genes de resistência e incorpora no seu genoma (STRAUME et al., 2015).

As mudanças no DNA podem ativar produção de enzimas microbianas que inativam os antibióticos, mudar a superfície de um microrganismo impedindo a ligação do antibiótico, ou ainda, não permitindo o antibiótico alcançar o interior da célula microbiana, ou ativar bomba de efluxo que elimina substâncias tóxicas do interior da célula (MUNITA; ARIAS, 2016)

Além dos mecanismos próprios, os microrganismos patogênicos podem adquirir resistência devido ao uso inadequado ou mesmo de uso adequado dos antimicrobianos existentes no mercado utilizados com frequência (VENTOLA, 2015). Antibióticos usados em situações terapêuticas não indicadas resultam em selecionar bactérias resistentes, diminuindo a potência dos mesmos (BIZUYE et al., 2013).

A resistência fúngica pode ser intrínseca ou adquirida. Intrínseca, o fungo traz a capacidade de desenvolver biofilme para sua proteção. Adquirida, devido a exposição dos antifúngicos usados na terapia antifúngica, que mesmo demonstrando os efeitos positivos curativo em alguns casos, cepas escapam e pode desenvolver resistência, relacionada a mutações em genes específicos para a ação dos antifúngicos (MCCARTHY et al., 2017)

A resistência fúngica pode ser por diminuição da concentração do fármaco atribuído principalmente a bomba de efluxo, no qual a droga é eliminada do meio intracelular por

transporte ativo (SANGLARD, 2016); mutações do gene *ERG11* pode alterar o alvo da droga, e reduzir a permeabilidade da membrana resultando em mudanças na composição do esterol da membrana, exemplo a mutação na enzima fúngica esterol 14 α -desmetilase que diminui a afinidade das drogas azóis (SANGLARD, 2016).

Entre os microrganismos que causam infecções hospitalares estão a levedura *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, (OLIVEIRA et al., 2010), e a bactéria *Streptococcus pneumoniae* é um patógeno causador de pneumonias e meningite (STRAUME et al., 2015).

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica do grupo dos cocos gram-positivos, *S. aureus* metilina resistente (MRSA) é responsável por mais mortes entre americanos que AIDS, doença de Parkinson, e homicídio juntos (VENTOLA, 2015). *S. aureus* possuem mecanismos de defesa contra algumas drogas, adquirem plasmídeos que codifica a β -lactamase, enzima que inativa antibióticos com anel β -lactâmico por hidrólise. A resistência de MRSA se deve à aquisição do gene *Meca*. Estas bactérias colonizam a pele, fossas nasais de pessoas saudáveis, entretanto, pode causar diversos tipos de infecções, tais como endocardites, pneumonias, meningite, septicemias, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas (LIMA et al., 2015).

Streptococcus pneumoniae é um diplococo gram-positivo encapsulado, onde o polissacarídeo capsular protege a bactéria da fagocitose e é um fator de virulência essencial. *S. pneumoniae* causa com maior frequência pneumonia, seguida de meningite, septicemia, otite média e conjuntivite (SOTO-NOGUERÓN et al., 2016).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa, faz parte da microbiota normal humana estando presente na nasofaringe e no trato intestinal, podendo causar graves infecções hospitalares, como pneumonia e infecções do trato urinário. A composição do polissacarídeo capsular de *K. pneumoniae* é que torna a cepa patogênica, as que não possui genes para a

formação de cápsulas resultando em uma bactéria praticamente não patogênica. O problema é que a composição do polissacarídeo capsular pode mudar rapidamente transformando em patogênica, sendo o complexo clonal 258 (CC258) o mais difícil de se tratar (EL BOUAMRI et al., 2015). A aquisição de genes de resistência a antibióticos e resistência intrínseca a várias classes de antibióticos limita as opções de tratamento para infecções causadas por *K. pneumoniae*, e também a resistência à colistina por mutações cromossômicas no gene *mcr-1* associado a plasmídeo, que ameaçam a eficácia da colistina como um antibiótico de última escolha para infecções por *Klebsiella* resistentes a vários medicamentos (EL BOUAMRI et al., 2015).

Escherichia coli é o agente patogênico gram-negativo mais comum em humanos, sendo o principal agente de infecções do trato urinário (AMADEU et al., 2009). Comumente está envolvido em infecções gástricas causando diarreia. Aproximadamente 14,7% são resistentes a medicamentos (RASHEED et al., 2014), estando presente principalmente em infecções nosocomiais (STORK et al., 2018)

Fungos do gênero *Candida* spp. vivem como sapróbio, comensais ou parasitas patogênicos nos seres humanos, sendo *C. albicans* a levedura mais comum detectada nos processos infecciosos das vias urinárias, seguidas por *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (SAVI; ONOFRE, 2009). Em condições normais, *C. albicans* está presente nos humanos como um organismo comensal sem causar danos à saúde, a candidíase se manifesta quando fatores fisiológicos, patológicos e mecânicos, modificam o relacionamento entre o hospedeiro e a microbiota natural (ROSSI et al., 2011).

2.2 Antibióticos

Os antibióticos aumentaram a expectativas de vida da população mundial (VENTOLA, 2015). A importância dos antibióticos ganhou destaque com a descoberta da Penicilina,

disponível comercialmente em 1941 produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, e em 1944 a estreptomicina isolada de *Streptomyces griseus*, foi o primeiro antibiótico de grande importância descoberto a partir de actinomiceto, ativo contra *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose (WAKSMAN et al., 1945; SUBHAN et al., 2015). Posteriormente, vários outros antibióticos foram descobertos sendo produzidos por actinomicetos, tornando esses microrganismos alvos de vários estudos com resultados promissores entre os microrganismos produtores de antibióticos (Figura 1) (GEBREYOHANNES et al., 2013; JANAKI et al., 2016).

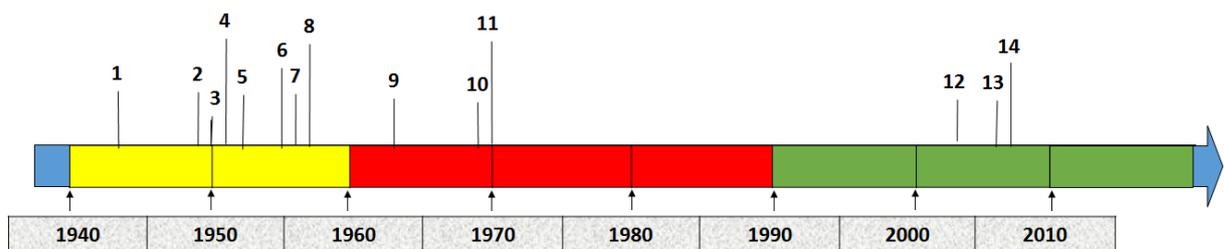


Figura 1. Linha do tempo de alguns antibióticos produzidos a partir de isolados de actinomicetos. Adaptado de: Guimarães et al., 2010; Procópio et al., 2012; Melo, 2013; Oliveira, 2015.

(1) Estreptomicina 1944 - *Streptomyces griseus*; (2) Clorafenicol 1949 - *S. venezuelae*; (2) Neomicina 1949 - *S. fradiae*; (3) Nistatina 1950 - *S. noursei*; (3) Tetraciclina 1950 - *S. aureofaciens*; (4) Viomicina 1951 - *S. vinaceus* e *S. capreolus*; (5) Eritromicina 1952 - *S. erythreus*; (5) Licomicina 1952 - *S. lincolnensis*; (6) Anfoterina B 1955 - *S. nodosus*; (7) Novobiocina 1956 - *S. niveus*; (7) Vancomicina 1956 - *S. orientalis*; (8) Canamicina 1957 - *S. kanamyceticus*; (8) Rifamicina 1957 - *Amycolatopsis mediterranei*; (9) Gentamicina 1963 - *Micromonospora purpurea*; (10) Fosfomicina 1969 - *S. fradiae*; (11) Ribostamicina 1970 - *S. ribosidificus*; (12) Daptomicina 2003 - *S. roseosporus*; (13) Platensimicina 2006 - *S. platensis*; (14) Abissomicinas 2007 - *Verrucosispora* sp.

Entre os anos 1945-1960 ficou conhecido como a era dourada dos antibióticos, por terem sido descobertos vários antibióticos importantes a partir de actinomicetos, principalmente do gênero *Streptomyces* (RAJA; PRABAKARANA, 2011). Após 1960, diminuiu o interesse das indústrias farmacêuticas em continuar a busca por antimicrobiano, passando a intensificar pesquisas em encontrar drogas relacionadas a terapia de doenças crônicas como diabetes e

hipertensão (VENTOLA, 2015), período que foi marcado por uma diminuição no desenvolvimento de novos antibióticos (OLIVEIRA, 2015). A partir de 1985 aumentou a incidência da resistência bacteriana motivo pelo qual a comunidade científica voltou a buscar e descobrir novos antibióticos, levando os pesquisadores a investigar fontes naturais ainda pouco exploradas (GUIMARÃES et al., 2010).

A busca por organismos obtidos em ecossistemas pouco explorado ou sem exploração, podem revelar nova diversidade química, como por exemplo, as Abissomicinas, grupo de antibióticos descobertos de actinomicetos marinhos no Japão e que apresenta resultados promissores contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (ASSIS et al., 2014). A descoberta de novo antibiótico se torna relevante se demonstrar novas estruturas químicas, revelando uma nova classe de antibiótico ou maior estabilidade e potencia dos compostos (MONCIARDINI et al., 2014).

A produção dos antibióticos pode estar relacionada com a interação com meio ambiente, pois, a evolução dos microrganismos e a produção dos metabólitos estão relacionadas com as mudanças sazonais do meio ambiente e com as transferências de genes entre estirpes, e ainda as bactérias são capazes de produzir compostos para competir com outros microrganismos que possam ganhar resistência aos atuais grupos de substâncias bioativas (RIDLEY et al., 2008).

A diferenciação morfológica, e a produção de vários metabólitos secundários, como os antibióticos, antitumorais e inibidores enzimáticos se inicia, quando os nutrientes se tornam limitados, no entanto em resposta a esta restrição alimentar, micélios vegetativos libertam pequenas moléculas que atuam como sinais para iniciar o crescimento de hifas aéreas, bem como para a produção de antibióticos (LI et al., 2016). O maior destaque como produtor de antibiótico são os actinomicetos, pois são capazes de sintetizar muitos metabólitos secundários bioativos com variedade de efeitos biológicos (RODRIGUES, 2006). Além de produtores de antibióticos, *Streptomyces* também fornecem compostos antitumorais promissores, que são

importantes em termos de tratamento de câncer, com destaque para actinomicina, mitomicina, antraciclina, bleomicina, compostos derivados do ácido aureolico, pentostatina e resistomicina (AFTAB et al., 2015). Por produzirem aproximadamente 70% dos antimicrobianos existentes (GEBREYOHANNES et al., 2013), além de fornecem compostos bioativos importantes de alto valor comercial, actinomicetos continuam sendo procurados frequentemente para desenvolvimento de novas substâncias bioativas (SINGH et al., 2014).

2.3 Actinomicetos: Características Gerais

Actinomicetos são bactérias filamentosas Gram-positivas formadoras de esporos e produtores de antibióticos (GEBREYOHANNES et al., 2013). Apresentam DNA rico em guanina e citosina (G+C > 72% no gênero *Streptomyces* e G+C de 64 a 72% no gênero *Nocardia*) e apresentam ampla diversidade morfológica (OLIVEIRA, 2015). São microrganismos cosmopolitas, colonizam os mais variados ecossistemas, águas, pedras, produtos alimentícios, animais, plantas, construções, no entanto o seu habitat principal é o solo (SATHEEJA; JEBAKUMAR, 2011).

Actinomicetos foram considerados formas de transição entre bactérias e fungos, devido à semelhança morfológica com os fungos filamentosos, pois muitos actinomicetos produzem micélio, principalmente espécies do gênero *Streptomyces*, e também se reproduzem por esporulação (ANANDAN et al., 2016). A diferença é que as células de actinomicetos são finas, DNA está organizada em um nucleóide procariótico, parede celular contém peptidoglicano e são sensíveis aos agentes antibacterianos (BARKA et al., 2016).

Apresentam um ciclo de vida que inicia com a germinação do esporo, dando origem ao micélio, formado por hifas ramificadas radial, que penetram no substrato para absorção dos nutrientes, metabolizando fontes orgânicas como: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos (BARKA et al., 2016). Esse micélio denominado vegetativo se

desenvolve em micélio aéreo, passando por diferenciações morfológicas e formação de esporos que ficam dispostos de formas variadas, desenvolvendo cadeia de esporos, esporângios e esporangiosporo (LI et al., 2016). Os esporos são a principal forma de multiplicação ou reprodução, são produzidos em grande número, contribuindo para a preservação da espécie, além de ser resistente a dessecações, motivo pelo qual sobrevivem em período de estiagem (VENTURA et al., 2007; FLARD; BUTTER, 2009). As colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de 7 a 10 dias para desenvolver as hifas aéreas (MELO, 2013).

2.4 Classificação taxonômica

As colônias de actinomicetos são formadas por uma massa de hifas, constituindo os micélios, semelhantes às dos fungos (KUMAR; JADEJA, 2016). São classificados dentro do filo e da classe Actinobacteria, que contém seis ordens, Acidimicrobiales, Rubrobacterales, Coriobacterales, Bifidobacteriales, Actinomycetales e Nitriliruptorales (SEMÊDO et al., 2001), 14 subordens (BARKA et al., 2016), 50 famílias, 197 gêneros e 1936 espécies (BORA; WARD, 2009). A ordem Actinomycetales é a mais importante como produtora de compostos bioativos, composta de aproximadamente 80 gêneros (SATHEEJA; JEBAKUMAR, 2011).

2.5 Actinomicetos de solo

Os actinomicetos estão adaptados a se desenvolverem com maior frequência em substratos sólidos, onde secretam enzimas extracelulares para obter as fontes de carbono, que são de baixa solubilidade e assim colonizar o substrato e desenvolver as hifas (PIRET; DEMAIN, 1988; BISPO, 2010). Na natureza, desempenham um papel importante na ciclagem de compostos orgânicos e também estão associados com a produção de matéria orgânica do solo (GOMES et al., 1996; SEMÊDO et al., 2001), ocorrendo frequentemente onde há materiais orgânicos em decomposição (SILVA et al., 2013).

São organismos saprófitos, que passam a maior parte de seus ciclos de vida como esporos caso as condições do meio seja limitadas em nutrientes, estão presentes em abundância nos solos alcalinos e solos ricos em matéria orgânica, podendo ser encontrados tanto na superfície do solo e em profundidades de mais de 2m abaixo do solo (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). A densidade populacional depende do seu habitat e das condições climáticas prevalecentes, sendo que a maioria dos actinomicetos crescem melhor a um pH entre 6 e 9, com crescimento máximo em torno da neutralidade (BARKA et al., 2016).

2.6 Identificação

A análise fenotípica está baseada na caracterização morfológica, ou bioquímica, que identifica o microrganismo até a categoria de gênero, podendo ocorrer identificação até o nível de espécie em alguns casos (BARKA et al., 2016). Pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), método para amplificação de material genético e comparação com o banco de dados, pode-se definir a espécie (KUMAR et al., 2014).

2.6.1 Características macroscópicas

As características macroscópicas se baseiam em observação do tamanho da colônia, consistência, forma, elevação, margens, cor do micélio aéreo e micélio substrato, pigmentos difusores para o meio e formação de melanina (SUBHAN et al., 2015) (Figura 2).

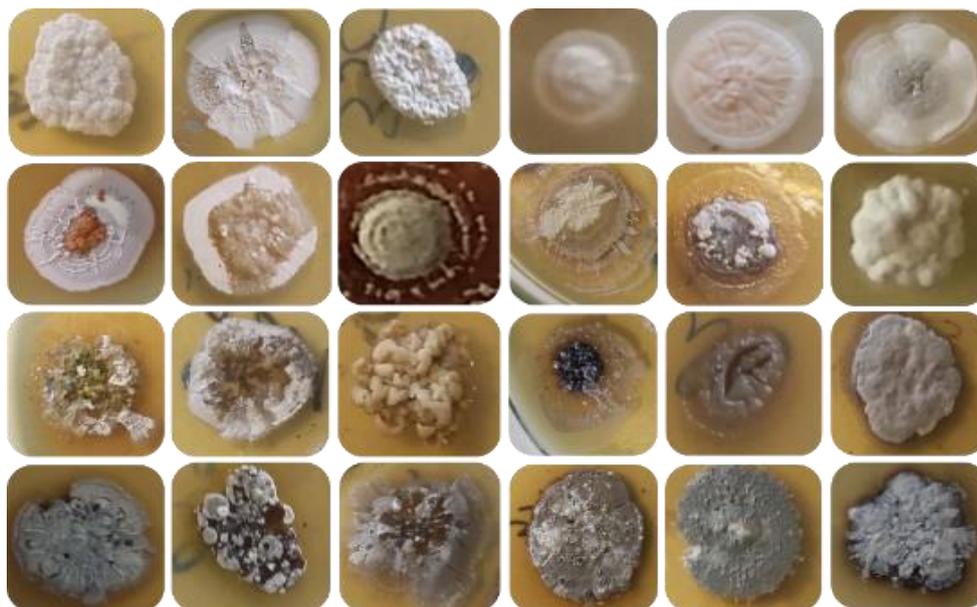


Figura 2. Características macroscópicas de actinomicetos.

2.6.2 Características microscópicas

Normalmente se observam como Gram positivas, as hifas, esporos, cadeia de esporos, a posição dos esporos, o número de esporos e esporângios, estas estruturas são importantes para o agrupamento taxonômico dos isolados e classificação dos actinomicetos, por exibirem diferenciações morfológicas (BARKA et al., 2016; LI et al., 2016).

O número de esporos por cadeia varia muito entre os gêneros de actinomicetos. *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* e *Promicromonospora*, produzem esporos isolados; *Microbispora* produz esporos em pares longitudinais; os gêneros *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya*, e alguns *Nocardia* têm cadeias de esporos curtas, enquanto *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Kitasatospora*, *Streptovercillium*, e alguns *Nocardia* produzem cadeias muito longas de até 100 esporos, e *Frankia* produz esporângios, que são essencialmente sacos de esporos (LI et al., 2016).

A diversidade morfológica dos actinomicetos está baseada nas suas estratégias reprodutivas, as quais levam à formação de uma variedade de estruturas de esporos, como artrósporos no gênero *Streptomyces*, endósporos no gênero *Thermoactinomyces*, aleuriósporos

característicos do gênero *Micromonospora* e os zoósporos móveis como em *Oerskovia*, *Geodermatophilus* e *Kitasatoa* (ENSIGN, 1978).

2.6.3 Caracterização Bioquímica

A utilização de diferentes açúcares como única fonte de carbono, controle do pH ótimo, temperatura, aeração e composição do meio de cultura são importantes para a identificação de gêneros e espécies conhecidas, pois as características fenotípicas de actinomicetos são influenciadas pelas composições dos meios de culturas (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966; BARKA et al., 2016). O método avalia a produção de diferentes enzimas extracelulares que estão relacionadas a expressão gênica do microrganismo, que podem degradar fontes de carbono específicas, assim diferenciando essas espécies de microrganismos (GOVINDARAJAN et al., 2014).

As características bioquímicas estão diretamente relacionadas com a atividade de enzimas microbianas e proteínas reguladoras. Sabendo que as enzimas e as proteínas são produtos de genes, a caracterização bioquímica de actinomicetos é entendido como a comparação indireta do genoma. Portanto é uma caracterização significativa para a identificação de actinomicetos (LI et al., 2016).

2.6.4 Caracterização Molecular

A classificação de actinomicetos baseada nas características morfológicas são insuficientes para determinar uma nova espécie, sendo atualmente utilizado tecnologia como a PCR, com amplificação do gene 16S rRNA utilizando iniciadores universais (GOVINDARAJAN et al., 2014). O gene 16S rRNA possui regiões conservadas que são comuns a várias espécies bacterianas, essas regiões conservadas são amplificadas utilizando pares de iniciadores (primers), objetivando o maior número possível de espécies bacterianas.

Mas os primers são específicos para certos grupos de bactérias, sendo assim, recomenda-se utilizar diferentes primers para amplificar diferentes frações de uma comunidade (FREDRIKSSON et al, 2013).

É comum a utilização dos primers universais, 27F 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e 1492R 5'GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' para a amplificação do gene 16S rRNA de actinomicetos (KUMAR et al., 2014; BALLAV et al., 2015). Mas para Sengupta et al. (2015) esses primer apesar de abranger um amplo número de espécies, não são eficientes para amplificação do gene 16S rRNA de todas as estirpes. E a utilização de outros iniciadores direto como AB1 (5'AGTGGCGAACGGGTG3'), projetado na segunda região conservada do gene 16S rRNA, em combinação com os primers inverso universal 1378R (5'CGGTGTACAAGGCCCG3') pode ajudar na definição de espécies. A sequência do gene 16S rRNA é comparada com as sequências de nucleotídeos de outras estirpes do banco de dados NCBI GenBank para construção da árvore filogenética (SINGH et al., 2014)

2.7 Bioautografia

A bioautografia é um método que combina a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com a difusão em Ágar ou aplicação direta de solução microbiana sobre a placa de CCD. O método é importante pois observa-se as substâncias de interesse para o isolamento e purificação dos metabólitos bioativos (BALOUIRI et al., 2016; VALLE-JR et al., 2016).

A separação de metabólitos bioativos de extrato bruto pode ser feita por CCD. São utilizados solventes de polaridade crescente como fase móvel. A placa CCD após a corrida cromatográfica é seca, revela-se em câmara UV 254 nm e 365 nm. Os pontos bioativos são confirmados por bioautografia (SHETTY et al., 2014)

Difusão em ágar é a transferência por difusão de agente antimicrobiano da CCD para uma placa de ágar, que ficará por um certo tempo 1-24 horas a temperatura a 4 °C para permitir

a difusão dos compostos no meio, remove-se a CCD, inocula o microrganismo a ser testado e incuba-se a placa a 37 °C por 18-24 horas. As zonas de inibição do crescimento aparecem nos locais, onde se encontra os compostos antimicrobianos na CCD definido o fator de retenção (Rf) (SHETTY et al., 2014; VALLE-JR et al., 2016).

Bioautografia direta, a placa CCD após eluição dos extratos é mergulhada ou pulverizada com uma suspensão microbiana. Com posterior incubação em condições úmidas e incubado a 25 °C durante 48h. Para visualizar o crescimento microbiano, são utilizados sais de tetrazólio que revelam células vivas. Os sais são pulverizados sobre o bioautograma, que é reincubado a 25 °C durante 24 h ou a 37 °C durante 3-4 h. Recomenda-se o meio ágar Mueller Hinton para dar um fluido médio suficiente para permitir uma melhor aderência à placa CCD e manter a umidade adequada para o crescimento bacteriano. Em geral, a bioautografia de CCD é uma técnica simples, eficaz e barata para a separação de uma mistura complexa e, ao mesmo tempo, localiza os constituintes ativos na placa de CCD (BALOUIRI et al., 2016).

7.8 Estudos com Actinomicetos na Amazônia

Na Amazônia, são poucas pesquisas relacionadas a estudos de actinomicetos para obtenção de biomoléculas, em especial antibióticos, e sabe-se que ambiente inédito pode revelar novas espécies e assim descobrir novos antibióticos. Na região, Matsuura (2004) analisou actinomicetos endofíticos, e revelou que produzem compostos antibacterianos e antifúngicos. Silva et al. (2012) trabalhou com actinobactérias de solos da região Amazônica, especificamente de Manaus e proximidades verificando atividade contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas. Trabalho realizado por Souza et al. (2009) confirma o potencial dos actinomicetos na região Amazônica revelando atividade contra os fungos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*. No Estado do Acre, não foram encontrados trabalhos com actinomicetos, o que reforça a importância de estudar este grupo de

microrganismos destacando a expressiva relação do grupo que são excelentes produtores de antimicrobianos, antitumoral entre outros compostos com atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários produzidos por actinomicetos isolados de amostras de solos Amazônicos.

3.2 Objetivo Específico

- 3.2.1 Analisar a frequência de actinomicetos isolados de amostras de solos Amazônicos;
- 3.2.2 Avaliar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários produzidos por actinomicetos isolados de amostras de solos Amazônicos frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* e ao fungo *Candida albicans*;
- 3.2.3 Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos de actinomicetos com indicativo de atividade antimicrobiana;
- 3.2.4 Definir perfil cromatográfico dos extratos com atividade antimicrobiana;
- 3.2.5 Averiguar a produção de biomassa e de metabólitos antimicrobianos dos actinomicetos com indicativo de atividade antimicrobiana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

Foram coletadas vinte amostras de solo em um fragmento florestal composto de vegetação secundária, localizado na Universidade Federal do Acre – Campus Rio Branco, Acre (S 09° 57.429' W 067° 52.412'), sendo as coletas realizadas em setembro e outubro de 2016. Adicional, dez amostras de solo coletadas de floresta primária localizada no município de Senador Guiomard, as margens da BR 364, a 27 Km de Rio Branco (S 10° 04. 002' W 067°36.306'), em novembro de 2016, totalizando 30 amostras. As amostras de solo foram realizadas de 0-10 centímetros de profundidade, armazenados em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Microbiologia (SUBHAN et al., 2015).

4.2 Isolamento e conservação

Foram pesados 2 g de cada amostra e suspenso em 18 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterelizada, agitada a 120 rpm por 1h a 28 °C. O sobrenadante foi diluído em solução de NaCl 0,85% estéril nas concentrações 10^{-1} e 10^{-2} , e 200 μ L da diluição 10^{-2} espalhado com alça de Drigalski (TADDEI et al., 2006) em dois meios de cultura para isolamento, ágar amido caseína- AC (amido 10g, caseína 0,3g, KNO₃ 2g, NaCl 2g, K₂HPO₄ 2g, MgSO₄ 0,05g, FeSO₄ 0,01g, ágar 15g para 1L) e ágar quitosana - AQ (quitosana 10g, KNO₃ 2g, NaCl 2g, K₂HPO₄ 2g, MgSO₄ 0,05g, FeSO₄ 0,01g, ágar 15g para 1L) (KUMAR; JADEJA, 2016). Em ambos os meios foi adicionado 100 mg. L⁻¹ do antifúngico Cercobim. As placas foram incubadas em estufa a 28±2 °C, e monitorado o crescimento bacteriano por 21 dias, verificando formação de hifas e esporos (TADDEI et al., 2006).

As colônias foram purificadas pelo método de estrias por esgotamento em placas contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (infusão de batata 200g, dextrose 20g, ágar 15g para 1l).

Os actinomicetos isolados foram mantidos em tubos de ensaios contendo meio de cultivo BDA em temperatura ambiente e para preservação, foram cultivados em caldo amido-caseína e criopreservados a -80 °C em microtubos de 2 mL adicionado de glicerol na concentração de 20% (SILVA et al., 2012; ATTA et al., 2015).

4.3 Caracterização Morfológica

Dos isolados obtidos foram observadas as características macroscópicas como forma, tamanho, cor das colônias (LI et al., 2016), esporulação do micélio aéreo e micélio substrato (BARKA et al., 2016). Após observações macromorfológicas, foi realizado microcultivo dos isolados utilizando meio de cultivo BDA e ágar aveia (aveia 30g, ágar 15g para 1L) (GOVINDARAJAN et al., 2014). Após 14 dias, foi realizada a coloração de Gram, sendo portanto, visualizadas as características microscópicas (SUBHAN et al., 2015), verificando as diferenciações morfológicas das hifas portadoras de esporos, disposição dos esporos e a estrutura da cadeia de esporos (LI et al., 2016).

4.4 Atividade antimicrobiana preliminar

Colônias isoladas de actinomicetos foram transferidas para tubos de ensaios contendo 3 mL caldo Amido Caseína e incubadas sob agitação de 120 rpm a 28 °C por 14 dias (ATTA, 2015). Após incubação, foi retirado 2 mL do cultivo e realizada extração por partição líquido-líquido com o solvente acetato de etila (AcOEt) na proporção de 1:1 (v/v) extraído duas vezes, obtendo-se uma fase orgânica e outra aquosa (DURAIPANDIYAN et al., 2010). A fase orgânica foi coletada e evaporada 37 °C até obter o peso constante, sendo obtido o extrato

AcOEt que foi solubilizado em 400 μ L de Dimetilsulfóxido 99,9 % (DMSO) para avaliação antimicrobiana.

Foi utilizado o teste de difusão em ágar *cup plate* para verificação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos de actinomicetos. As cepas padrões das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4952 e *Escherichia coli* ATCC 25922 adquiridas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), foram inoculadas em ágar Müller-Hinton (MH) e incubadas por 24 h a 37 °C, e após crescimento de três a cinco colônias foram inoculadas para um tubo contendo 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB) e incubada a 37 °C entre 4 – 6 horas, até alcançar ou exceder a densidade óptica de uma solução padrão de McFarland 0,5. A densidade óptica da cultura em crescimento foi ajustada com solução salina estéril 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland 0,5 (CLSI, 2003).

A suspensão bacteriana ajustada foi semeada sobre a placa de Petri contendo meio MH com ajuda de um swab e foram feitos poços de aproximadamente de 6 mm de diâmetro (LEE et al., 2014), e dentro destes depositados 20 μ L do extrato dos actinomicetos (OLIVEIRA, 2015). As placas foram armazenadas a 4 °C por 24 h, a fim de permitir a difusão do extrato no meio de cultivo, e posteriormente incubadas em estufa a 37 °C por 24 h (LEE et al., 2014). O halo de inibição proporcionado pelo extrato foi medido em milímetros e os ensaios realizados em três repetições.

Para atividade antifúngica, a cepa de *Candida albicans* ATCC 24433 foi cultivada em Ágar Sabouroud Dextrose (SDA) e após crescimento foi transferido de três a cinco colônias isoladas com uma alça para um tubo contendo 5 mL em caldo Luria-Bertani (LB) e a cultura foi incubada a 37 °C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de MacFarland 1. Com um swab estéril, a suspensão fungica ajustada foi aplicada sobre a placa de Petri contendo meio SDA (CLSI, 2002), feitos poços de aproximadamente 6 mm de diâmetro, e

nestes depositados 20 µL do extrato metabólito dos actinomicetos (SINGH et al., 2014). As placas foram armazenadas a 4 °C por 24 h a fim de permitir a difusão do extrato no meio de cultivo e então incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos em milímetros com régua de antibiograma e o ensaio realizado em três repetições (CLSI, 2002).

4.5 Atividade antimicrobiana secundária

Os actinomicetos com atividade antimicrobiana foram crescidos em maior escala para obtenção de extratos metabólitos para avaliação da concentração inibitória mínima e bioautografia.

Como pré-inóculo, 10 fragmentos com 1 cm² dos actinomicetos cultivados em meio de cultura BDA por 14 dias foram transferidos para Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo AC e incubado por 48 h a 28 °C e 120 rpm (WAHAAB et al., 2015). Este cultivo foi transferido para Erlenmeyer contendo 1000 mL de caldo AC para produção dos metabólitos, e incubados por 14 dias a 28 °C e 120 rpm (JANARDHAN et al., 2014). O cultivo foi filtrado em papel filtro e realizado partição líquido-líquido, utilizando três sistemas de extração dos metabólitos em solventes de polaridade crescente, um solvente por vez. 1) apolar hexano (HEX), 2) baixa polaridade diclorometano (DCM) e 3) média polaridade acetato de etila (AcOEt), proporção de 1:1 (v/v). As frações orgânicas foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida e seco a 40 °C (WAHAAB et al., 2015). Os extratos foram submetidos ao ensaio antimicrobiano conforme procedimento descrito no item 4.4. foram feitas três repetições.

4.6 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de actinomicetos com atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços estéreis.

Para atividade antibacteriana, foi distribuído 100 μ L de caldo MH em todos os poços da placa, e em seguida, adicionados 100 μ L de cada extrato na concentração de 2 mg/mL no poço teste para diluição em série, resultando em uma concentração inicial de 1 mg/mL. Seguiu o processo de diluição seriada por sete vezes, sendo homogeneizado e transferido 100 μ L para o próximo poço, e assim sucessivamente, resultando em concentrações final de 15,62 μ g/mL. A droga controle, Cloranfenicol 2 mg/mL, foi diluído de forma semelhante aos extratos. Foram adicionados 5 μ L do inóculo correspondente a cada cepa testada exceto para o controle negativo segundo norma M7-A6 (CLSI, 2003). O controle negativo continha somente 100 μ L de caldo MH, e o controle positivo 100 μ L de caldo MH e 5 μ L de inóculo. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h, após esse período foi adicionado em cada poço 20 μ L do reagente Resazurina (0,15 mg/mL), que indica crescimento microbiano quando muda a coloração azul para o vermelho (OLIVEIRA et al., 2013; RISS et al., 2016) (Figura 3).

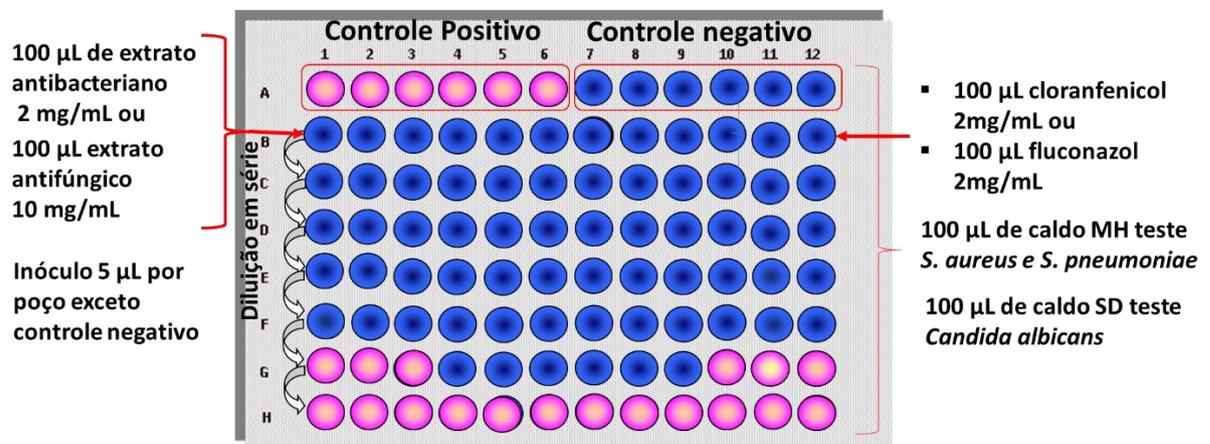


Figura 3. Demonstração do processo de microdiluição e diluição seriada para avaliação da Concentração Inibitória Mínima.

Para avaliação da CIM dos extratos com atividade antifúngica, foram distribuídos 100 μ L de caldo Sabouraud Dextrose (SD) em todos os poços da placa, adicionado 100 μ L do extrato na concentração de 10 mg/mL, resultando em uma concentração inicial de 5 mg/mL, e seguiu o processo de diluição seriada por dez vezes, sendo homogeneizado e transferido 100 μ L para o próximo poço, assim sucessivamente, resultando na concentração final de 9,76

µg/mL. A droga controle, Fluconazol 2 mg/mL, da mesma maneira que o extrato. Foi adicionado 5 µL de inóculo de *C. albicans* em todos os poços, exceto para o controle negativo, segundo norma M27-A2 (CLSI, 2002). O controle negativo continha somente 100 µL de caldo SD, e o controle positivo 100 µL de caldo SD e 5 µL inóculo. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 48 h, após esse período foi adicionado em cada poço 20 µL do reagente Resazurina (0,15 mg/mL), que indica crescimento microbiano quando muda a coloração azul para o vermelho (OLIVEIRA et al., 2013; RISS et al., 2016).

Para ambos os testes foi verificado o efeito do solvente DMSO à 10% sobre a cepa microbiana, sendo realizado diluições em serie nas mesmas condições dos extratos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 Bioautografia

Foram aplicados 20 µL dos extratos com atividades antimicrobianas em placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Sílica Gel 60), eluídas usando diferentes sistemas: hexano, hexano-acetato de etila (AcOEt) (1:1), AcOEt, AcOEt-Metanol (MeOH) (1:1), e analisadas em câmera ultravioleta (UV) 312 nm.

A bioautografia das substâncias eluídas em CCD, contra as bactérias *S. aureus* e *S. pneumoniae* foi por difusão em ágar MH, e para *C. albicans* em ágar SD. Os extratos eluídos em CCD foram colocadas com o lado silicado em contato uniformemente com o meio de cultura, mantidos na geladeira por 12h para difusão dos compostos. As placas de CCD foram removidas, e então semeados os microrganismos teste e incubado durante 24 h a 37 °C. Para as zonas de inibição, indicação de composto bioativo, foram calculados os fatores de retenção (Rf). Técnica adaptada de Shetty et al. (2014) e Valle-Jr et al. (2016).

Também foi realizado comparação dos extratos ativos com drogas padrão sendo utilizado eritromicina, neomicina, amoxicilina, ciprofloxacina, cetoconazol e nistatina, em

placa CCD, eluído em AcOEt, verificando o perfil cromatográfico, e revelado em UV 312 nm e calculado o fator de retenção (R_f) que é divisão da corrida cromatográfica do metabólito (CM) pela corrida do eluente (CE) ($R_f = CM / CE$), o R_f varia de 0 a 1 (KAGAN; FLYTHE, 2014).

4.8 Produção de Biomassa e Metabólitos bioativos

Os actinomicetos com atividade antimicrobiana foram crescidas em placa de Petri contendo meio de cultura ágar AC até formação de esporos, e então adicionado sobre o micélio solução NaCl (0,9 %)/Tween 80 (0,1%) e realizada contagens dos esporos em câmara de Neubauer (WADEWAR; PATIL, 2013). A suspensão de esporo foi inoculada em quantidade para obter uma concentração de 10^6 esporos/mL em 14 tubos de ensaio contendo 2,7 mL de caldo amido-caseína (BORODINA et al., 2008) e incubados sob rotação de 120 rpm e temperatura de 28 °C por 14 dias (CUNHA, 2010). A cada 24 horas foi retirado um tubo do sistema e o cultivo transferido para microtubo de 2 mL e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos (SASTRY et al., 2003; LEE et al., 2014). O sobrenadante do centrifugado foi transferido para tubo para extração dos metabólitos secundários e o sedimento da centrifugação adicionado 2 mL de água destilada e agitado em vórtex e centrifugado novamente, sendo este procedimento realizado duas vezes. O sobrenadante resultante da segunda e terceira centrifugação foi descartado e o sedimento foi seco em estufa á 40 °C até obter peso constante. A massa foi definida calculando a diferença entre o peso do tubo de 2 mL vazio e depois com a massa microbiana seca, proporção de mg/2,7 mL de caldo AC.

O sobrenadante da primeira centrifugação foi submetido a extração dos metabólitos secundários com acetato de etila 1:1 (v/v) e o solvente foi evaporado a 37 °C (SINGH et al., 2014).

Procedimento foi realizado por 14 dias para cada morfoespécie em triplicata. Os extratos metabolitos de actinomicetos foram testados quanto a atividade antimicrobiana utilizando teste de difusão em ágar *cup plate* descrito no item 4.4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Actinomicetos isolados

Foram obtidos 219 isolados de actinomicetos, sendo 48,85% do gênero *Streptomyces*, 20,09 % *Nocardia* sp., 4,1 % *Thermomonospora* sp., 4,1 % *Nocardiopsis* sp., 2,28 % *Frankia* sp. e 20,54 % de actinomicetos não identificados (N.I.) a nível de gênero, mas apresentaram todas as características macromorfológicas de actinomicetos. Os isolados foram obtidos em maior frequência em meio de cultura AC, com exceção de morfoespécies do gênero *Nocardia* spp. que foram mais frequentes em AQ (Figura 4).

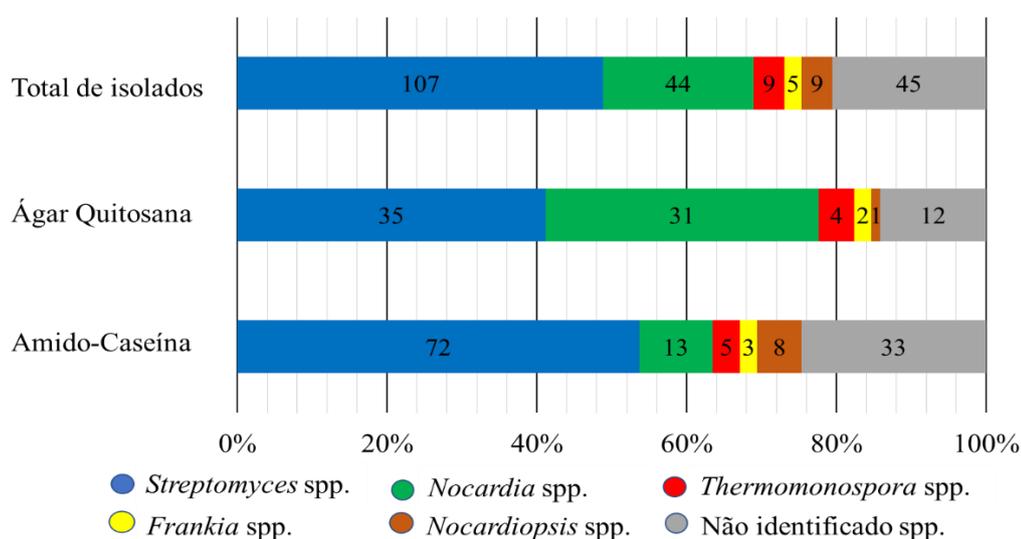


Figura 4. Análise quantitativa de actinomicetos isolados de solos Amazônicos de acordo com meio de Cultura.

Os 219 actinomicetos foram classificados em 153 morfoespécies, por caracterização macroscópica (Figura 5) e microscópica (Figura 6), das quais foram identificadas 111 (72,54%) em nível de gênero. *Streptomyces* spp. foram mais frequentes, seguido de *Nocardia* spp., *Thermomonospora* spp., *Frankia* spp. e *Nocardiopsis* spp. (LI et al., 2016).

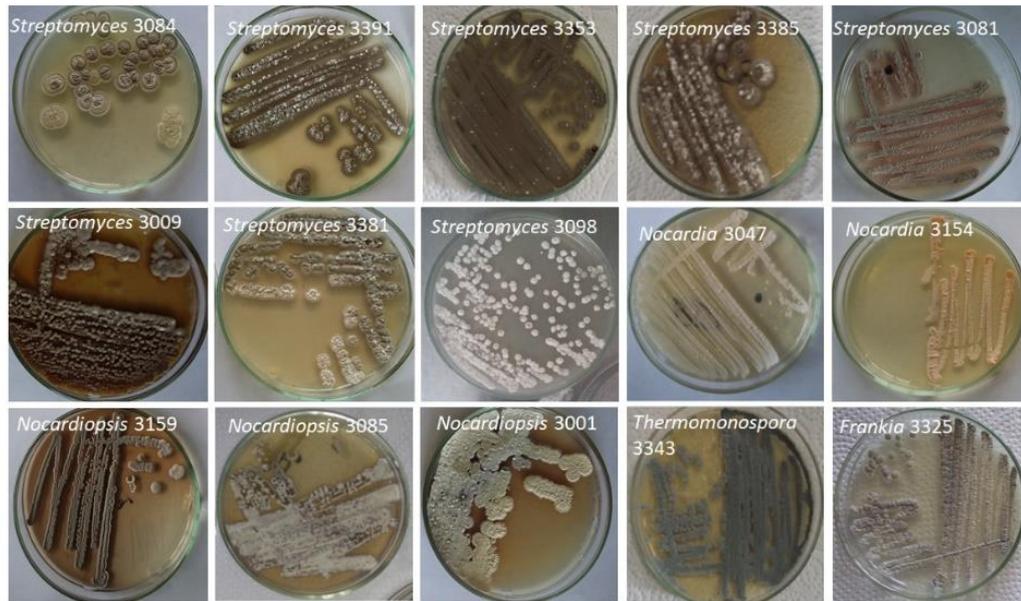


Figura 5. Características macroscópicas de actinomicetos isolados de solos amazônicos cultivados em meio de cultura ágar Batata-Dextrose.

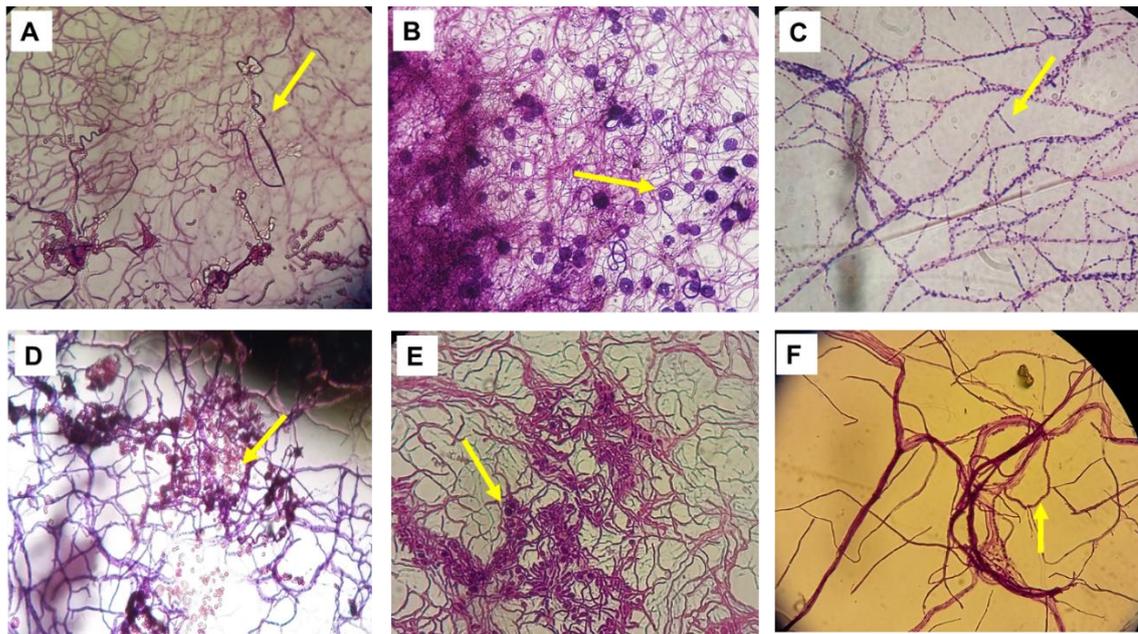


Figura 6. Características microscópicas de actinomicetos isolados e identificados visualizados em objetiva de 1000 x. (A) *Streptomyces* sp. Cadeia de esporos aberta em espiral; (B) *Streptomyces* sp. Cadeia de esporos fechada e em espiral; (C) *Nocardia* sp. Cadeia de esporos curta e hifas fragmentadas; (D) *Thermomonospora* sp. Aglomerado de esporos não forma cadeia; (E) *Frankia* sp. Forma esporângios; (F) *Nocardioopsis* sp. Forma cadeia de esporos longas e apresenta hifas largas (BARKA et al., 2016).

Em estudo realizado no Vietnã, clima tropical e subtropical, Hop et al. (2011) isolaram 1882 actinomicetos e 57% destes foram identificados como *Streptomyces* spp. resultado

semelhante ao encontrados neste trabalho, onde 48,8% dos isolados pertencem a este gênero.

No Brasil, o gênero *Streptomyces* é frequentemente o mais isolado com os meios padrões utilizados para o isolamento de actinomicetos (SEMÊDO et al., 2001; RODRIGUES, 2006), seguido do gênero *Nocardia* (RODRIGUES, 2006; AZUMA, 2011). Azuma (2011), observou que os gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*, foram os mais isolados de solo do litoral com característica arenosa, úmida e salina na região Sul do Brasil e confirmado no presente trabalho.

O meio de cultura AC apresentou maior frequência de isolados dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardiopsis*, enquanto que no meio de cultivo Ágar Quitosana as morfoespécies do gênero *Nocardia* foram mais frequentes. Os gêneros *Frankia* e *Thermomonospora* a frequência foi semelhante para ambos os meios utilizados no isolamento (Figura 4). A importância da utilização de meios de culturas diferentes tem relação com a obtenção de diferentes microrganismos, pois, fontes nutricionais diversas possibilita maior isolamento de espécies, por aumentar as chances dos microrganismos se desenvolverem (KUMAR et al. 2014).

Não foi possível classificar todas as morfoespécies isoladas, através da metodologia utilizada para a identificação, pois, os métodos convencionais definidos por caracterização macroscópica e microscópica são limitados. Assim, não permite caracterizar em nível de espécies, e também alguns gêneros, pelo fato que a morfologia muitas vezes não permite enquadrar aos táxons definidos (SILVA et al., 2013; LI et al., 2016). Para uma análise mais detalhada e completa é necessário a realização de caracterização molecular dos isolados (BARKA et al., 2016).

5.2 Atividade antimicrobiana preliminar

Do total de 153 extratos de actinomicetos doze (7,84%) demonstraram atividade antimicrobiana, nove morfoespécies com atividade antibacteriana contra bactérias Gram

positivas, cinco contra *C. albicans* e nenhuma contra bactérias Gram negativas, sendo o principal gênero produtor de antimicrobiano *Streptomyces* (Tabela 1).

O extrato AcOEt da morfoespécie *Streptomyces* 3323 foi o mais eficiente para as duas bactérias Gram positivas analisadas, seguido de *Streptomyces* 3098, *Streptomyces* 3333, *Streptomyces* 3170 (Tabela 1) (Figura 7). Cinco extratos foram antagônicos para *C. albicans*, e dois demonstraram atividade para bactérias Gram-positivas e para *C. albicans* (Tabela 1). Foi verificada atividade antibacteriana alta em quatro extratos de actinomicetos, atividade média em um extrato e baixa em quatro extratos, e para a *Candida albicans* a atividade foi baixa em todos extratos (Tabela 1).

Tabela 1. Triagem preliminar de extratos metabólitos de actinomicetos isolados de solos amazônicos com atividade antimicrobiana.

Actinomiceto Isolado	Zona de inibição (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Streptomyces</i> 3098	26 ± 0,0	25,3 ± 1,9	-
<i>Streptomyces</i> 3141	11,3 ± 0,9	11,3 ± 0,9	-
<i>Streptomyces</i> 3170	22 ± 1,6	22 ± 0,0	-
<i>Streptomyces</i> 3223	10,6 ± 0,9	10 ± 1,6	-
<i>Streptomyces</i> 3273	14 ± 0,0	13 ± 0,8	-
<i>Streptomyces</i> 3317	10,6 ± 0,9	12 ± 1,6	-
<i>Streptomyces</i> 3333	22 ± 1,6	26 ± 1,6	-
<i>Streptomyces</i> 3323	42 ± 0,0	42 ± 0,0	12,0 ± 0,0
Actinomiceto 3195	10 ± 1,6	9,3 ± 0,9	10 ± 1,6
<i>Streptomyces</i> 3134	-	-	12 ± 0,0
<i>Streptomyces</i> 3200	-	-	10,6 ± 1,6
Actinomiceto 3345	-	-	12,6 ± 0,9
Clorafenicol 2 mg/mL	44 ± 0,0	42,6 ± 0,9	-
Fluconazol 2 mg/mL	-	-	30 ± 0,0

A análise da variância ANOVA e teste Tukey foi realizada com programa PAST 3.15 para (HAMMER et al., 2001). ANOVA revelou o F calculado de 214, com $p < 0,05$, e a análise através do teste de Tukey, comparando as médias entre os halos de inibição contra as bactérias patogênicas mostrou estatisticamente que o extrato obtido de *Streptomyces* 3323 teve atividade

antibacteriana igual ao cloranfenicol, no ensaio preliminar contra as bactérias *S. aureus* e *S. pneumoniae*. Os extratos *Streptomyces* 3098, 3170 e 3333 foram iguais e ambos demonstraram menor atividade antibacteriana que o controle (cloranfenicol), e maior atividade que os extratos obtidos de *Streptomyces* 3141, 3223, 3273, 3317 e actinomiceto 3195, que são iguais e tiveram menor atividade antibacteriana que o cloranfenicol. Os extratos com atividade contra *C. albicans* são iguais de acordo com o teste de Tukey e tem menor atividade que a droga controle fluconazol (Tabela 1).

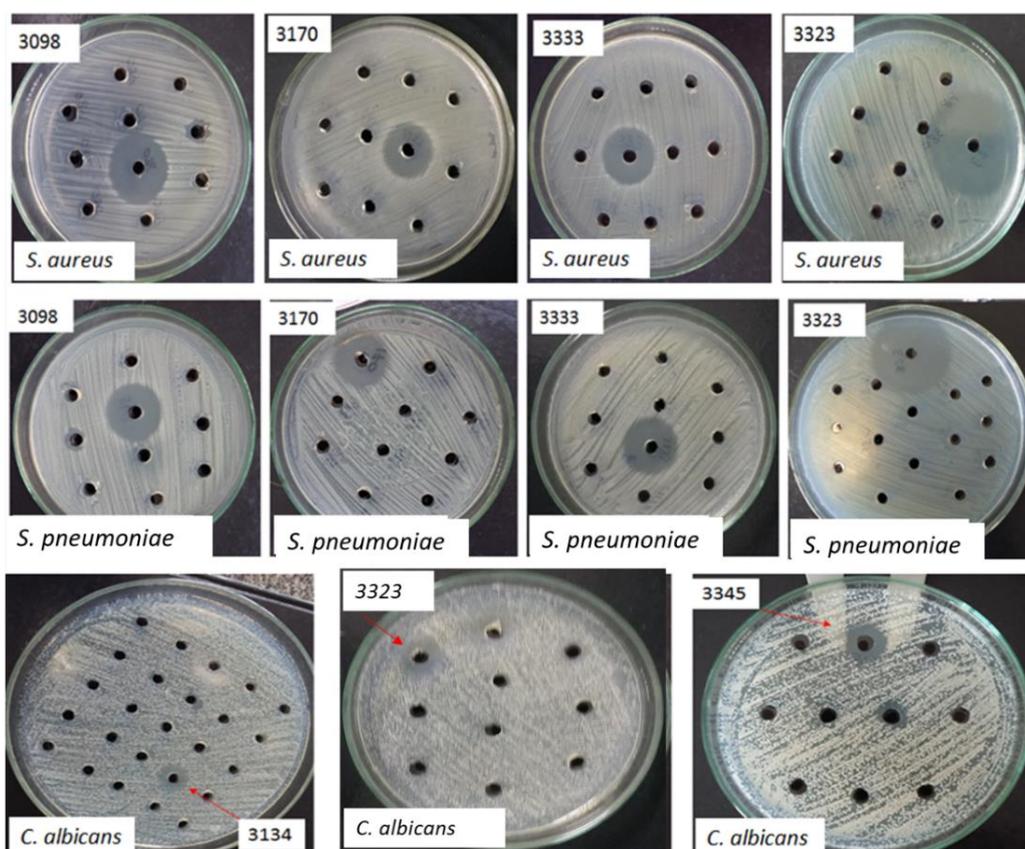


Figura 7. Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelos actinomicetos *Streptomyces* 3098, *Streptomyces* 3170, *Streptomyces* 3333 e *Streptomyces* 3323 contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e os isolados *Streptomyces* 3134, *Streptomyces* 3323 e Actinomiceto 3345 contra a levedura *Candida albicans*.

O fato de não haver inibição contra bactérias Gram negativas pode estar relacionado à membrana externa desta que são complexas e possuem resistência natural (MUNITA; ARIAS, 2016).

A atividade antibacteriana do extrato Hexano de *Streptomyces* 3323 foi semelhante ao apresentado pela droga controle cloranfenicol, revelando ser um potente antimicrobiano (Tabela 1). Os dados desta pesquisa corroboram com os resultados obtidos por Salamoni (2009), Silva et al. (2012) e Singh et al. (2014), trabalhando com actinomicetos de diferentes ambientes e estes produziram metabólitos bioativos somente contra bactérias Gram positivas.

Diferentemente do observado neste trabalho, actinomicetos isolados por Azuma (2011) no Paraná, foram mais ativos contra *C. albicans* e também tiveram atividade contra bactérias Gram negativas. A composição do ambiente amostral tem relação com os isolados e com a produção de metabólitos secundários. Para Kumar et al. (2014) os microrganismos produzem moléculas bioativas de acordo com suas necessidades e o ambiente é um fator relevante para tal, a competição com outros organismos e a composição dos substratos também influenciam a produção dos metabólitos.

Cinquenta por cento (50%) dos actinomicetos isolados por Souza et al. (2009), produziram compostos antagônicos a *C. albicans* e no trabalho de Silva et al. (2012) 12,3 % dos isolados inibiram bactérias Gram positivas, 1,3 % foram antagônicas a Gram negativas, na região amazônica próximo a Manaus, diferente desse trabalho. O motivo de diferente frequência de atividade contra *C. albicans*, pode ter relação com as características das substâncias utilizadas nos bioensaios antimicrobianos, pois, foi utilizado para a extração dos metabólitos acetato de etila que tem média polaridade, objetivando futuro isolamento dos metabólitos bioativos, que segundo Kagan; Flythe (2013) os compostos polares podem ser difíceis de separar em sílica. Souza et al. (2009) e Silva et al. (2012) testaram substâncias de maior

polaridade pois, aplicaram 100 μ L do caldo metabólitos, portanto mistura de várias substâncias e alta polaridade.

5.3 Atividade antimicrobiana secundária

Na triagem antimicrobiana secundária, os extratos em DCM e AcOEt de *Streptomyces* 3098 e 3333 apresentaram atividade antimicrobiana na concentração de 2 mg/mL, enquanto de *Streptomyces* 3323 somente o extrato em Hexano apresentou atividade (Tabela 2).

Para atividade antifúngica, somente o extrato em DCM de *Streptomyces* 3323 apresentou atividade na concentração de 10 mg/mL (halo de $22 \pm 0,0$) e 50 mg/mL ($30 \pm 0,0$). Os extratos de *Streptomyces* 3134 e do Actinomiceto 3345 não apresentaram atividade em nenhuma das três concentrações analisadas (2, 10 e 50 mg/mL). A droga controle Fluconazol 2 mg/mL teve halo de $30 \pm 0,0$.

Tabela 2. Atividade antibacteriana dos extratos de metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos *Streptomyces* 3098, *Streptomyces* 3323 e *Streptomyces* 3333, Frações Hexano, Diclorometano (DCM) e Acetato de etila (AcOEt).

Actinomiceto Isolado	Extrato orgânico 2 mg/mL	Zona de inibição (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptomyces</i> 3098	Hexano	-	-
	DCM	$21,3 \pm 0,9$	$21,3 \pm 0,9$
	AcOEt	$12,6 \pm 0,9$	$12,6 \pm 0,9$
<i>Streptomyces</i> 3323	Hexano	$30 \pm 1,6$	$28,6 \pm 0,9$
	DCM	-	-
	AcOEt	-	-
<i>Streptomyces</i> 3333	Hexano	-	-
	DCM	$28,6 \pm 2,5$	28 ± 0
	AcOEt	$30,6 \pm 2,5$	$28,6 \pm 0,9$
Clorafenicol	2 mg/mL	$44 \pm 0,0$	$42,6 \pm 0,9$

A ANOVA indicou que há diferença entre as médias pois o F calculado foi de 300,3 com $p < 0,05$, O extrato *Streptomyces* 3323 fração Hexano e o extrato *Streptomyces* 3333

frações DCM e AcOEt são iguais estatisticamente, demonstraram menor atividade antibacteriana que o controle (cloranfenicol) nas mesmas concentrações, sendo o melhor resultado contra as bactérias *S. aureus* e *S. pneumoniae* na triagem secundária, seguido do extrato *Streptomyces* 3098 fração DCM e fração AcOEt que demonstraram menor atividade antimicrobiana em relação a droga controle cloranfenicol.

Os extratos das morfoespécies *Streptomyces* 3098, *Streptomyces* 3323 e *Streptomyces* 3333 demonstraram estabilidade dos compostos antimicrobianos durante os processos de triagem primária e secundária pois, os halos de inibição frente aos patógenos foram semelhantes após os dois processos de extração, mostrando-se promissores para continuação da pesquisa e isolamentos de compostos. As morfoespécies *Streptomyces* 3134 e Actinomiceto 3345 não revelaram atividade antimicrobiana na triagem secundária, possivelmente os compostos são instáveis e foram degradados no processo de produção do extrato devido ao aquecimento a 40 °C sob pressão reduzida (método utilizado no processo de concentração dos extratos) utilizando rotaevaporador, sendo esse o diferencial entre a triagem primária e a secundária. Segundo Vijayakumari et al. (2013), em estudo comparando três diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C) para produção de metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana, verificou que a temperatura de cultivo a 30 °C é a melhor para a produção de metabólitos bioativos e a temperatura de 35 °C os compostos não demonstraram atividade contra *Candida albicans*.

5. 4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) variou de 15,62 a 250 µg/mL para as bactérias *S. aureus* e *S. pneumoniae*, sendo o extrato AcOEt de *Streptomyces* 3333 que demonstrou o menor valor do CIM para as duas bactérias testadas. Três extratos apresentaram valores de CIM igual ao da droga controle cloranfenicol contra *S. pneumoniae*. O Extrato testado contra *C. albicans* apresentou valor de CIM 2,5 vezes maior que a droga fluconazol (Tabela 4).

Os resultados da CIM demonstram potencial para produção de antibiótico por apresentarem CIM relativamente baixa para extrato bruto com misturas de substâncias.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima dos extratos de actinomicetos isolados de solos amazônicos com atividade antimicrobiana.

Extrato teste	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida Albicans</i>
<i>Streptomyces</i> 3098 DCM	31,25	15,62	-
<i>Streptomyces</i> 3323 Hexano	125	250	-
<i>Streptomyces</i> 3333 DCM	62,5	15,62	-
<i>Streptomyces</i> 3333 AcOEt	15,62	15,62	-
<i>Streptomyces</i> 3323 DCM	-	-	312,5
Cloranfenicol	7,81	15,62	-
Fluconazol	-	-	125

5.5 Bioautografia

No ensaio de bioautografia de contato, a atividade antibacteriana dos compostos separados por CCD foi determinada. Os extratos de actinomicetos com atividade antibacteriana foram utilizados para bioautografia. Atividade antibacteriana significativa para o extrato DCM de *Streptomyces* 3098 contra *S. aureus* e *S. pneumoniae* foi demonstrado por compostos com valores de Rf de 0,7 e 0,75 na bioautografia com eluente acetato de etila/metanol (1:1), como evidente pela zona clara indicativa de inibição (Figura 8).

Na fração em hexano de *Streptomyces* 3323 foi visualizado somente um composto com atividade contra *S. pneumoniae* e *S. aureus*, com Rf de 0,73 no eluente hexano/acetato de etila (1:1) (Figura 8). A bioautografia contra *C. albicans*, a fração DCM de *Streptomyces* 3323 inibiu o crescimento em toda a extensão da corrida cromatográfica da CCD em contato com o SDA,

indicando o que pode haver múltiplas substâncias bioativas ou uma substância que tenha maior afinidade pela fase fixa (sílica) da CCD.

Os extratos obtidos de *Streptomyces* 3333 em DCM e AcOEt apresentaram perfil cromatográfico semelhante em CCD, sendo comprovada pela bioautografia onde o composto com atividade contra *S. aureus* e *S. pneumoniae* dos extratos apresentaram Rf igual nos diferentes sistemas eluentes, indicando que provavelmente seja o mesmo composto nos dois extratos (Figura 8).

O tamanho da placa e o sistema de solventes ou séries de sistemas de solventes podem apresentar diferentes números de compostos separados em um cromatograma e revelar Rfs diferentes (KAGAN; FLYTHE, 2013). Portanto foram utilizados cinco sistemas de eluente no extrato Hexano *Streptomyces* 3323 e quatro nos extratos dos outros actinomicetos e as placas foram produzidas com as mesmas dimensões para cada sistema eluente. Assim objetivou separar os compostos e estimar a polaridade dos mesmos de acordo com as zonas de inibição revelada em ágar contra os patógenos testes, a ainda se os compostos bioativos estão em Rf isolados o que facilita na purificação do composto.

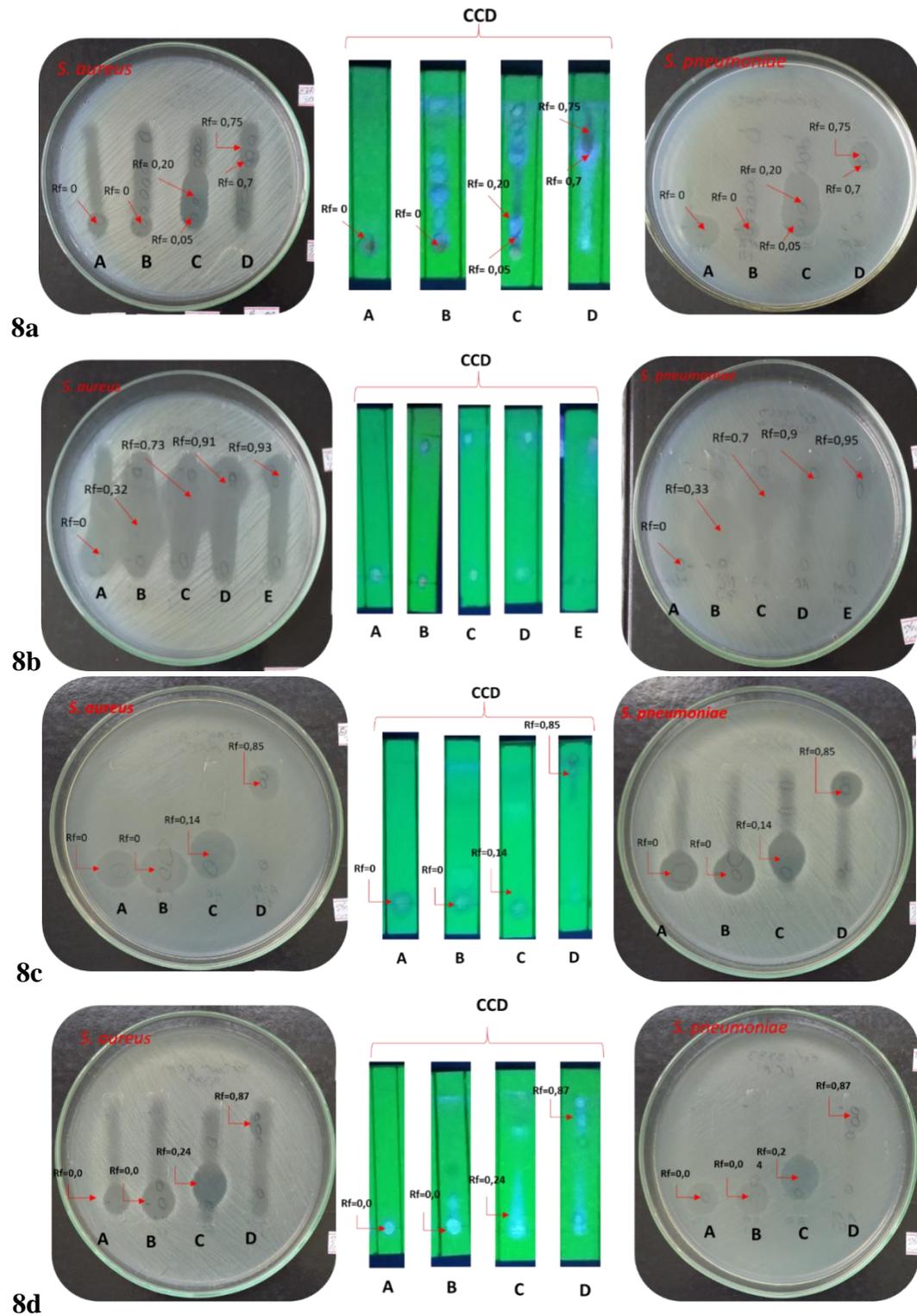


Figura 8. Bioautografia dos metabólitos de actinomicetos com atividade antibacteriana. **8a.** Extrato DCM *Streptomyces* 3098; **8b.** Extrato Hexano *Streptomyces* 3323; **8c.** Extrato AcOEt *Streptomyces* 3333; **8d.** Extrato DCM *Streptomyces* 3333. (A) sistema eluente em hexano, (B) sistema eluente hexano/acetato de etila (1:1), (C) sistema eluente em acetato de etila e (D) sistema eluente em acetato de etila/metanol (1:1), (Rf) fator de retenção, (CCD) cromatografia em camada delgada, teste contra *S. aureus* e *S. pneumoniae*.

Análise entre os fármacos, eritromicina, neomicina, amoxicilina e ciprofloxacina utilizados na terapia antimicrobiana e os extratos de actinomicetos, revelou que as substâncias bioativas dos extratos apresentam Rfs diferentes dos fármacos, com exceção do extrato AcOEt de *Streptomyces* 3333, onde o composto ativo se manteve na base semelhante a três dos quatro fármacos antibacterianos analisadas (Figura 9). O extrato DCM de *Streptomyces* 3323, com atividade contra *C. albicans*, apresentou três substâncias com Rf diferentes dos antifúngicos cetoconazol e nistatina (Figura 9). A substância bioativa foi definida conforme os dados obtidos na bioautografia em sistema eluente acetato de etila.

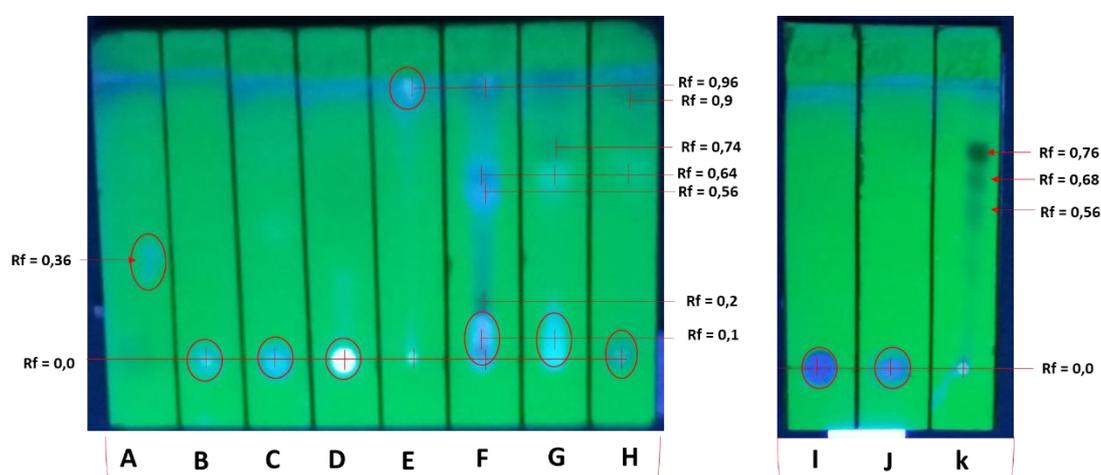


Figura 9. Perfil cromatográfico em CCD revelado em UV 312 nm, drogas padrão e extratos metabolitos de actinomicetos. (A) Eritromicina; (B) Neomicina; (C) Amoxicilina; (D) Ciprofloxacina; (E) Extrato Hexano *Streptomyces* 3323; (F) Extrato DCM *Streptomyces* 3098; (G) Extrato DCM *Streptomyces* 3333; (H) Extrato AcOEt *Streptomyces* 3333; (I) Cetoconazol; (J) Nistatina; (K) Extrato DCM *Streptomyces* sp. 3323. (○) Substancias bioativas e fármacos.

A bioautografia em CCD é uma técnica simples, eficaz para a separação de mistura complexa de compostos ao mesmo tempo que localizam os constituintes ativos na placa CCD, importante para a busca de antimicrobianos (BALOUIRI et al., 2016). Segundo Valle Jr et al. (2016) a CCD não fornece medidas específicas, mas é um excelente método de identificação e localização de compostos com atividade antibacteriana, e para Shetty et al. (2014) a bioautografia de contato é empregada para detectar se um único composto ou múltiplos compostos são responsáveis pela atividade antibacteriana ou antifúngica.

5.6 Produção de Biomassa e metabólitos bioativos

A morfoespécie *Streptomyces* 3098 teve o crescimento inicial da biomassa com 2 mg, mantendo-se em crescimento até o oitavo dia de cultivo. Do oitavo ao décimo quarto dia de cultivo a biomassa permaneceu em fase estacionária com aproximadamente 4 mg. A produção dos metabólitos bioativos foi maior do quarto ao nono dia de cultivo, com pico de produção no nono dia, sendo a produção dos metabólitos estimada através da medição dos halos de inibição frente às bactérias *S. pneumoniae* e *S. aureus* (Figura 10).

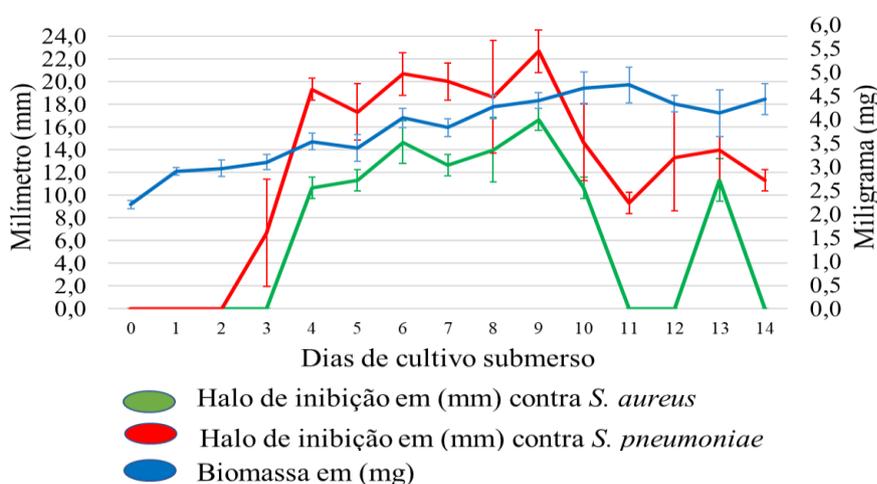


Figura 10. Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie *Streptomyces* 3098.

A morfoespécie *Streptomyces* 3323 teve crescimento exponencial do primeiro ao terceiro dia de crescimento com aumento de biomassa. Do terceiro ao quinto dia houve diminuição da biomassa, e estabilizando a biomassa a partir do sexto dia de cultivo apresentando pequenas variações até o décimo quarto dia. Os metabólitos bioativos demonstraram atividade antimicrobiana a partir do primeiro dia de crescimento, permanecendo estável a produção até ao décimo dia, pois, apresentaram halos de inibição semelhantes, e do décimo ao décimo quarto dia de crescimento houve leve aumento na produção de antimicrobiano, sendo o décimo quarto dia o que demonstrou maior inibição (Figura 11).

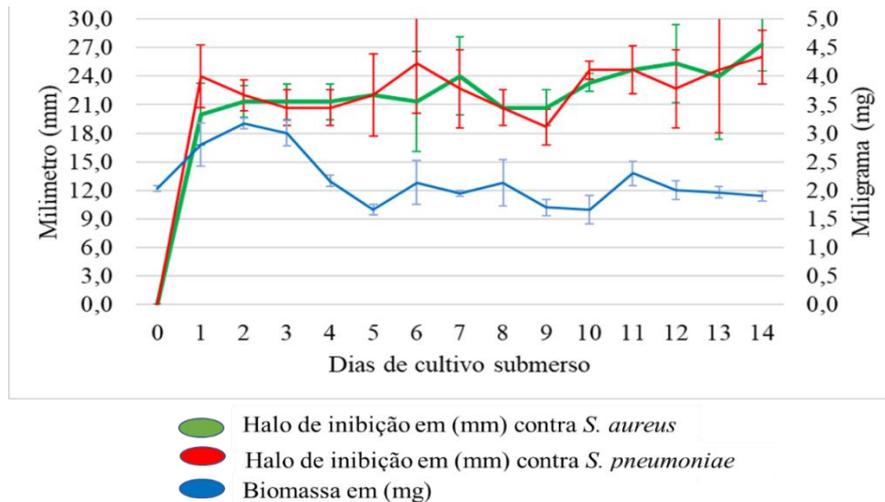


Figura 11. Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie *Streptomyces* 3323.

A morfoespécie *Streptomyces* 3333 demonstrou alto crescimento, aproximadamente 100% ao da biomassa inicial inoculada no primeiro dia, do segundo ao quarto dia de cultivo houve diminuição da biomassa, e do sexto dia de cultivo até décimo quarto a biomassa se manteve estável próximo de 4 mg. A produção de compostos bioativos iniciou no segundo dia de cultivo, diminuindo a produção no terceiro e quarto dia, entrando na fase exponencial de produção do quinto ao sexto dia de crescimento, estabilizando a produção até ao décimo segundo dia, o décimo quarto dia foi o que apresentou maior halo de inibição para as bactérias testes (Figura 12).

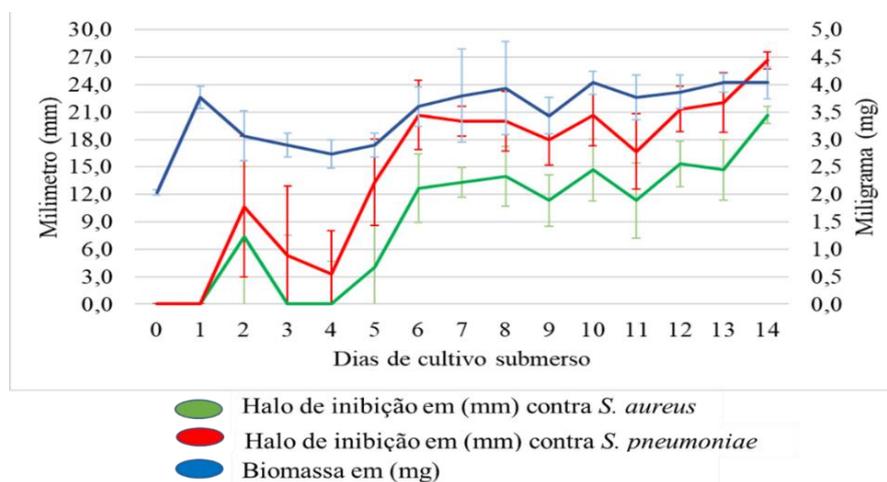


Figura 12. Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie *Streptomyces* 3333.

A morfoespécie *Streptomyces* 3134 apresentou maior produção da biomassa no segundo dia de crescimento com 3 mg e a partir do sétimo dia a biomassa se manteve estável em aproximadamente 2,2 mg. A produção dos metabólitos apresentou maior halo (18 mm) de inibição contra a *C. albicans* ao terceiro dia de cultivo, momento em que a biomassa começa a decrescer, e estabilizando a produção dos metabólitos bioativos a partir do sexto dia de crescimento com halo de 12 mm (Figura 13).

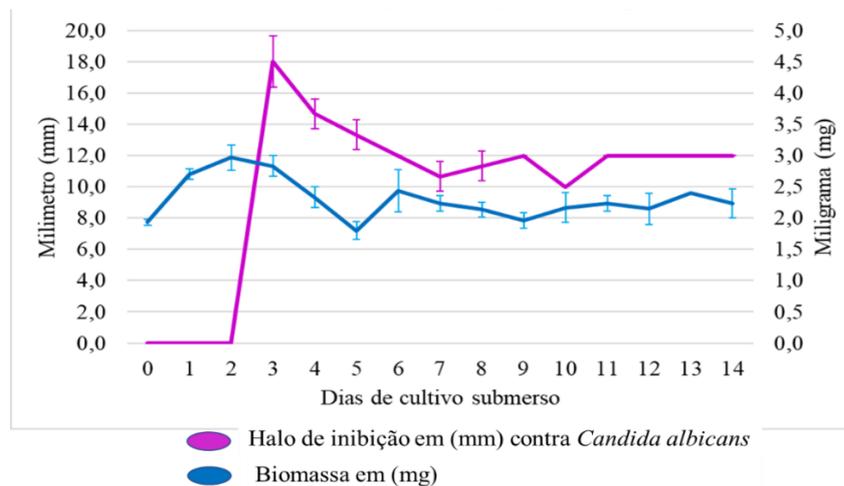


Figura 13. Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie *Streptomyces* 3134.

A morfoespécie actinomiceto 3345 demonstrou crescimento exponencial do início da inoculação até o oitavo dia de cultivo, atingindo aproximadamente 12 mg e a partir do oitavo dia, a biomassa apresentou pequenas variações estabilizando-se até o décimo quarto dia. Os metabólitos bioativos demonstraram dois picos de produção, um no oitavo e nono dia e outro nos dias 13 e 14 de cultivo submerso (Figura 14).

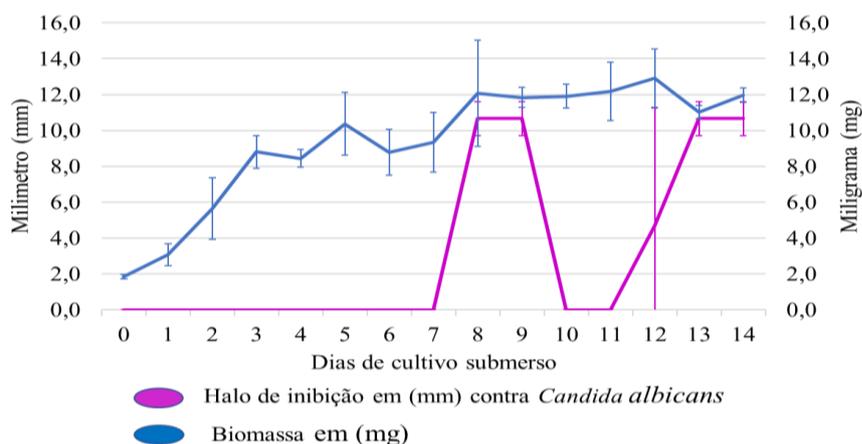


Figura 14. Produção de Biomassa e de metabólitos da morfoespécie actinomiceto 3345.

As morfoespécies *Streptomyces* 3098 e *Streptomyces* 3333 demonstraram crescimento da biomassa semelhantes adquirindo 2x a massa inicial (Figuras 10 e 12), diferente das morfoespécies *Streptomyces* 3134 e *Streptomyces* 3323 que apresentaram uma curva de crescimento entre os dias (1-5) e do dia (6-14) se mantendo com aproximadamente a mesma massa inicial do inóculo (Figuras 13 e 11). A morfoespécie actinomiceto 3345 apresentou crescimento da biomassa diferente das outros quatro morfoespécies, com crescimento exponencial até o oitavo dia e adquirindo biomassa 6x a massa inicial inoculada (Figura 14).

Actinomicetos são conhecidos como microrganismos de crescimento lento, sendo observado aumento notável na produção de biomassa até 4 dias de incubação (SENGUPTA et al., 2015), semelhante ao observado neste trabalho, com exceção da morfoespécie Actinomiceto 3345.

Para Sengupta et al. (2015), geralmente os actinomicetos produzem metabólitos secundários após a obtenção da fase estacionária, que está de acordo com três das cinco morfoespécies estudadas nesta pesquisa, e ainda, a produção de metabólitos secundários bioativos ocorre em período de tempo diferentes dependendo da espécie, também observado neste trabalho. A eficiência da atividade antimicrobiana diminuiu consideravelmente após um certo tempo de incubação, que pode ser devido à degradação de compostos bioativos, fato observado apenas com as morfoespécies *Streptomyces* 3098 e *Streptomyces* 3134.

Wadetwar; Patil, (2013) verificaram a produção de antibiótico de *Streptomyces violaceorubidus* durante 12 dias, ao terceiro dia iniciou a produção e ao sétimo dia teve a produção máxima, entrando em fase estacionária e decrescendo a produção de antibiótico. No entanto, relacionando com esse trabalho que das cinco espécies analisadas, apenas uma teve produção dos metabólitos ao terceiro dia de cultivo, não houve produção máxima ao sétimo dia e para duas espécies houve diminuição de concentração após a fase estacionária, pressupõe-se que não é possível determinar tempo de produção de antibióticos de espécies diferentes de

actinomicetos pois, cada espécie variou o período de produção. Mas a análise dos dados revela o período de produção entre 1-8 dias de cultivo, assim como o crescimento da biomassa.

6. CONCLUSÕES

O solo da Amazônia é importante fonte de actinomicetos demonstrando diversidade de morfoespécies sendo o gênero *Streptomyces* o mais frequente.

Actinomicetos isolados de solos amazônicos produzem compostos antimicrobianos, tanto antifúngicos como antibacterianos, e os extratos demonstram concentrações inibitórias mínimas semelhante à droga padrão cloranfenicol.

A CCD dos extratos ativos de actinomicetos mostrou que eles geralmente apresentam apenas um composto bioativo, o que facilita o processo de purificação.

A produção de metabólitos antimicrobianos dos actinomicetos com indicativo de atividade antimicrobiana geralmente estava correlacionada com a fase estacionária da produção de biomassa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTAB, U.; ZECHEL, D. L.; SAJID, I. Antitumor compounds from *Streptomyces* sp. KML-2, isolated from Khewra salt mines, Pakistan. **Biological Research**, v.48, n. 1, p. 48-58, 2015.

AMADEU, A. R. O. R. M.; SUCUPIRA, J. S.; JESUS, R. M. M.; ROCHA, M. L. P. Infecções do Trato Urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade da *Escherichia coli* como agente causador dessas infecções. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, v. 41, n. 4, p. 275-277, 2009.

ANANDAN, R.; DHARUMADURAI. D.; MANOGARAN. G. P. An Introduction to Actinobacteria. In: DHANASEKARAN, D AND JIANG, Y. **Biochemistry, genetic and Molecular Biology Actinobacteria – Basic and Biotechnological Applications**.2016, 398p.

ASSIS, D. A. M.; REZENDE, R. P.; DIAS, J. C. T. 2014. Use of metagenomics and isolation of actinobacteria in Brazil's Atlantic rainforest soil for antimicrobial prospecting. **ISRN Biotechnology**, v. 2014, n. 909601 p.1-7, 2014.

ATTA, H. M. Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n.1, p. 12–22, 2015.

ATTA, H. M.; EL-SAYED, A. S.; EL-DESOUKEY, M. S.; HASSAN, M.; EL-GAZAR, M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 360-371, 2015.

AZUMA, M. V. P. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. PR**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD.; C.; KLENK, H.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZELD, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n, 1, p. 1-43, 2016.

BISPO, A. S. R. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no estado da Bahia e seu potencial biotecnológico na produção de enzimas lignocelulolíticas**. 2010.107 f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas , Bahia, 2010.

BIZUYE, A.; MOGES, F.; ANDUALEM, B. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 5, p. 375-381, 2013.

BORA, N. M.; WARD, A. C. The actinobacteria. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H. (Ed). **Practical handbook of microbiology**. 2. ed. Boca Raton. 2009, p. 373- 443.

BORODINA, I.; SIEBRING, J.; ZHANG, J.; SMITH, C. P.; KEULEN, G. V.; DIJKHUIZEN, L.; NIELSEN, J. Antibiotic Overproduction in *Streptomyces coelicolor*A3(2) Mediated by Phosphofructokinase Deletion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 37, p. 25186-25199, 2008.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, v. 22, n. 15, 2002.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1987-1898 USA, v. 23, n. 1, 2003.

CUNHA, M. N. C.; SILVA, N. M. V.; TEIXEIRA, M. F. S.; MOTA, R. A.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Actinomicetos produtores de inibidores de β -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1312-1319, 2010.

DURAIKANDIYAN, V.; SASI, A. H.; ISLAM, V. I. H.; VALANARASU, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, n. 1, p.15-20, 2010.

EL BOUAMRI, M.C.; ARSALANE, L.; EL KAMOUNI, Y.; ZOUHAIR, S. Antimicrobial susceptibility of urinary *Klebsiella pneumoniae* and the emergence of carbapenem-resistant strains: A retrospective study from a university hospital in Morocco, North Africa. **African Journal of Urology**, v. 21, n. 1, p. 36-40, 2015.

ENSIGN, J. C. Formation, Properties, and germination of actinomycetes spores. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, n.1, p.185-219, 1978.

FLARD, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 36-49, 2009.

FREDRIKSSON, N. J.; HERMANSSON, M.; WILÉN, BM. The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

GEBREYOHANNES, G.; MOGES, F.; RAJA, N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 426-435, 2013.

GOMES, R. C.; MANGRICH, A. S.; Coelho, R. R. R.; LINHARES, L. E. Elemental, functional group and infrared spectroscopic analysis of actinomycete melanin's from Brazilian soils. **Biology Fertility of Soils**, v. 21, n. 1, p. 84-88, 1996.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 189–216, 1983.

GOVINDARAJAN, G.; SANTHI, V. S.; JEBAKUMAR, S. R. D. Antimicrobial potential of phylogenetically unique actinomycete, *Streptomyces* sp. JRG-04 from marine origin. **Biologicals**, v. 42, n. 6, p. 305-311, 2014.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESO, 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.

HAMMER, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**. v.4, n.1, 2001.

HOP, D. V.; SAKIYAMA, Y.; BINH, C. T. T.; OTOGURO, M.; HANG, D. T.; MIYADOH, S.; LUONG, D. T.; ANDO, K. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 9, p. 599-606, 2011.

HUANG, X.L.; ZHUANG, L.; LIN, H.P.; GOODFELLOW, M.; HONG, K. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 41, p. 9855-9864, 2012.

JANAKI, T.; NAYAK, B. K., GANESAN, T. Antibacterial activity of soil actinomycetes from the mangrove *Avicennia marina*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 1, p. 267-271, 2016.

JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; VISWANATH, B.; SAIGOPAL, D. V. R.; NARASIMHA, G. Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. **Biotechnology Research International**, v. 2014, n. 217030, p. 1-8, 2014.

KAGAN I. A.; FLYTHE M. D. Thin-layer Chromatographic (TLC) Separations and Bioassays of Plant Extracts to Identify Antimicrobial Compounds. **Journal of Visualized Experiments**, v. 85, n. e51401, p. 1-8, 2014.

KUMAR, P. S.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 30, n. 9, p. 435-446, 2014.

KUMAR, R. R.; JADEJA, V. J. Isolation of Actinomycetes: A complete approach. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 606-618, 2016.

LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Biology of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 71-100, 1967.

LEE L. H.; ZAINAL, N.; AZMAN, A. S.; ENG, S. K.; GOH, B. H.; YIN, W. F.; MUTALIB, N. S. A.; CHAN, K. G. Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from

Tropical Mangrove Sediments in Malaysia. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 14 pages, 2014.

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, C. Morphological indentation of Actinobacteria. In: DHANASEKARAN, D AND JIANG, Y. **Biochemistry, genetic and Molecular Biology “Actinobacteria – Basic and Biotechnological Applications**. 2016, p. 59-86.

LIMA, M. F. P.; BORGES, M. A.; PARENTE, R. S.; JÚNIOR, R. C. V.; OLIVEIRA, M. E. *Staphylococcus aureus* E AS INFECÇÕES HOSPITALARES – REVISÃO DE LITERATURA. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p.32-39, 2015.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 4, p. 240-253, 2012.

MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum. 2004. 55 f, Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimento, Campinas, SP, 2004.**

MCCARTHY, M. W; DENNING, D. W; WALSH, T. J. Future Research Priorities in Fungal Resistance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 3, p. 484-492, 2017.

MELO, J. G. S. **Caracterização química e avaliação de atividade biológica dos metabólitos de actinobactéria endofítica isolada de *Momordica charantia* L.**2013.112 f. tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; SONIA MAFFIOLI, SOSIO, M.; DONADIO, S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, v.7, n. 3, p. 209–220, 2014.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**. v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.

NUNES, E. B.; NUNES, N. B.; MONTEIRO, J. C. M.; PAES, A. L. V. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23-30,2011.

OLIVEIRA, A. C.; KOVNER, T. C.; SILVA, S. R. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 2, p. 97-104, 2010.

OLIVEIRA, R, B, F. **Análise das atividades antimicrobiana e citotóxica de Actinobactérias isoladas de diversos habitats**. 2015. 151 f, Dissertação (Mestrado em Biologia da relação Parasito-Hospedeiro) — Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito Hospedeiro, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. O.; LIANZA, M. C. S.; FERNANDES, H. M. B.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; SOUZA, I. A. Atividade Antifúngica de Extratos Isolados de *Streptomyces* spp. Obtidos em Solos Paraibanos Contra Leveduras do Gênero *Candida* spp. **Biofar, Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 51-58, 2013.

PIRET, J. M.; DEMAÏN, A. L. Actinomycetes in biotechnology: an overview. In: **Actinomycetes in Biotechnology**. (Eds: Good fellow, M., Williams S. T. & Mordarski, M.). *Academic Press*, London, 1988, p. 461-482.

PROCÓPIO, R. E. L.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 16, n. 5, p. 466–471.2012.

RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and Drug-An Overview. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 2, p. 75-84, 2011.

RASHEED, M. U.; THAJUDDIN, N.; AHAMED, P.; TEKLEMARIAM, Z.; JAMIL, K. ANTIMICROBIAL DRUG RESISTANCE IN STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM FOOD SOURCES. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V. 56, n. 4, p. 341-346, 2014.

RIDLEY, C. P; LEE, H. Y.; KHOSLA, C. Evolution of polyketide synthases in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 12, p. 4595-4600, 2008.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays**. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

RODRIGUES, K. **Identificação, Produção de Antimicrobianos e Complexos Enzimáticos de Isolados de Actinomicetos**. 2006.119 f. Dissertação (mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente), Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROSSI, T.; LOZOVVOY, M. A. B.; SILVA, R. V.; FERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

SALAMONI, S P. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Isolados de *Streptomyces* e Estudo de Produção de Moléculas Bioativas**.2009. 151f. Tese (Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**. v. 3, n. 11, 2016.

SASTRY, M.; AHMAD, A.; KHAN, M. I.; KUMAR, R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. **Research Account**, v. 85, n. 2, p.162-170, 2003.

SATHEEJAS, S. V.; JEBAKUMAR S. R. D. Phylogenetic analysis and antimicrobial activities of *Streptomyces* isolates from mangrove sediment. **Journal of Basic Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 71-79, 2011.

SAVI, A. P. C. D. C.; ONOFRE, S. B. Identificação das leveduras do gênero *Candida* pelo método cromógeno CHROMagar® *Candida* obtidas de pacientes com infecção das vias urinárias. **Revista Brasileira de Análise clínicas**, v. 41, n. 4, p. 279-281, 2009.

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

SENGUPTA, S.; PRAMANIK, A.; GHOSH, A.; BHATTACHARYYA, M. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. **BioMed Central Microbiology**, v. 15, n. 170, p. 1-16, 2015.

SHETTY, P. R.; BUDDANA, S. K.; TATIPAMULA, V. B.; NAGA, Y. V. V.; AHMAD, J. Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 303-312, 2014.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Method for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; CARVALHO, C. M.; AZEVEDO, J. L.; PROCÓPIO, R. E. The Effect of Varying Culture Conditions on the Production of Antibiotics. **Fermentation Technology**, v. 1, n. 3, p. 100-105, 2012.

SILVA, J. M.; CLEMENTINO, E. L.; CUNHA, M. N. C.; PORFÍRIO, K. P. S.; MOTA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; PORTO, C. S. Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p.805-810, 2016.

SILVA, M. S.; SALES, A. N.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed Research International**, v. 2013, p.1-10, 2013.

SINGH, L. S.; SHARMA, H.; TALUKDAR, N. C. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. **BioMed Central Microbiology**, v. 14, n. 278, p. 1-13, 2014.

SOTO-NOGUERÓN, A.; CARNALLA-BARAJAS, M. N.; SOLÓRZANO-SANTOS, F.; ARRENDONDO-GARCÍA, J. L.; ARZATE-BARBOSA, P.; TINOCO-FAVILA, J. C.; ANZUREZ-GUTIÉRREZ, A.; ECHÁNIZ-AVILES, G. *Streptococcus pneumoniae* as cause of infection in infants less than 60 days of age: serotypes and antimicrobial susceptibility. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 42, p. 69-73, 2016.

SOUZA, J.V.B.; MORIYA, R.Y.; SOUZA, E.S. Bioprospecção de substâncias antifúngicas produzidas por actinomycetes Isolados da Região Amazônica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 94-102, 2009.

STORK, C.; KOVÁCS, B.; RÓZSAI, B.; PUTZE, J.; KIEL, M.; DORN, Á.; KOVÁCS, J.; MELEGH, S.; LEIMBACH, A.; KOVÁCS, T.; SCHNEIDER, G.; KERÉNYI, M.; EMÖDY,

L.; DOBRINDT, U. Characterization of Asymptomatic Bacteriuria Escherichia coli Isolates in Search of Alternative Strains for Efficient Bacterial Interference against Uropathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 214, p. 1-18, 2018.

STRAUME, D.; STAMSÅS, G. A.; HÅVARSTEIN, L. S. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 371–380, 2015.

SUBHAN, S. A.; WAHAB, A.; MUJAHID, T. Y.; ABBAS, T.; KHAN, I.; IDREES, S. Screening of actinomycetes from indigenous soil for Production of extracellular metabolites. **International Journal of Current Research**, v. 7, n. 1, p.12078-12083, 2015.

TADDEI, A.; RODRIGUEZ, M. J.; MÁRQUEZ-VILCHEZ, E.; CASTELLI, C. Isolation and identification of *Streptomyces spp.* from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I. **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, p. 222-231, 2006.

VALLE JR, D. L.; PUZON, J. J. M.; CABRERA, E. C.; WINDELL L. RIVERA1, W. L. hin Layer Chromatography-Bioautography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Antimicrobial Leaf Extracts from Philippine *Piper betl* L. against Multidrug-Resistant Bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p.1-7, 2016.

VENTOLA C, L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**. v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA. G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology end Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VIJAYABHARATHI, R.; BRUHEIM, P.; ANDREASSEN, T.; RAJA, D. S.; DEVI, P. B.; SATHYABAMA, S.; PRIYADARISINI, V. B. Assessment of resistomycin, as an anticancer compound isolated and characterized from *Streptomyces aurantiacus*AAA5. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 920-926, 2011.

VIJAYAKUMARI, S. J.; SASIDHARANNAIR, N. K.; NAMBIAN, B.; MOHANDAS, C. Optimization of media and temperature for enhanced antimicrobial production by bacteria associated with *Rhabditis* sp. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 136-141, 2013.

WADETWAR, R. N.; PATIL, A. T. Production of antibiotic from actinomycetes isolated from Nagpur region and optimization of parameters to increase the yield. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 8, p. 3094-3098, 2013.

WAHAAB, F.; SUBRAMANIAM, K.; JAWAHAR. M. Comparative efficacy of macrolides containing marine actinomycetes formulation versus ciprofloxacin ophthalmic solution in controlling *Pseudomonas aeruginosa* induced conjunctivitis on rabbit model. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 3, n. 1-2, p. 26-35, 2015.

WAKSMAN, S. A.; REILLY, H.C. Microbial antagonisms and antibiotic substances. **Soil Science**, v. 59, n. 6 p. 482, 1945.