

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

**Isolamento e Identificação de Actinobactérias de Solo Rizosférico de
Licania rigida Benth da Caatinga e Avaliação da Atividade
Antimicrobiana.**

Aluno: Elizianne Pereira Costa
Orientador: Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientador: Janete Magali de Araújo

Recife, fevereiro de 2012.

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

Isolamento e Identificação de Actinobactérias de Solo Rizosférico de *Licania rigida* Benth da Caatinga e Avaliação da Atividade Antimicrobiana.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia, linha de pesquisa Biomateriais e Microbiologia Básica e Aplicada.

Aluno: Elizianne Pereira Costa
Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientador: Janete Magali de Araújo

Recife, fevereiro de 2012.

Costa, Elizianne Pereira

Isolamento e identificação de actinobactérias de solo rizosférico de *Licania rigida* Benth da caatinga e avaliação da atividade antimicrobiana / Elizianne Pereira Costa. – Recife: O Autor, 2012.

58 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Janete Magali de Araújo

Dissertação (mestrado)– Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Actinomycetes 2. Biotecnologia 3. Caatinga . I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo II. Araújo, Janete Magali de III. Título.

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-086

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA
DE MESTRADO ACADÊMICO DE
ELIZIANNE PEREIRA COSTA

“Isolamento e Identificação de Actinobactérias de Solo da Caatinga e Avaliação da Atividade Antimicrobiana.”

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOTECNOLOGIA

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata ELIZIANNE PEREIRA COSTA aprovada.

Recife 28 / 02 / 2012

Prof^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE) – Orientadora

Prof^a Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha (UFPE) – Membro interno

Prof^a Dra. Cristina Maria de Souza Motta (UFPE) – Membro externo

Prof^a Dra. Maria Teresa dos Santos Correia (UFPE) – Suplente

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Divone e Ernandes, que me incentivaram desde o início de minha vida acadêmica, e a minha irmã, Elizabelle, que tanto me ajudou na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a meus pais, que me ensinaram que não há bem maior que o conhecimento.

A minha irmã, que me mostrou uma luz no fim do túnel sempre que não podia enxergar a solução dos problemas com meus próprios olhos.

A toda minha família, que são parte importante da formação de quem eu sou.

A minha Orientadora, Ana Porto, por me oferecer a oportunidade de orientação mesmo sem me conhecer.

A minha co-Orientadora, Janete Magali, que esteve comigo desde a graduação e foi quem me ensinou o amor pela pesquisa.

Aos amigos de laboratório que proporcionaram momentos ímpares dos quais nunca vou esquecer.

Aos técnicos do Departamento de Antibióticos, Fátima, Orlando, Luís e “Seu Zeca”, que tanto ensinaram a todos os alunos que passaram pelo segundo andar.

Aos grandes amigos, integrantes da “Liga da Justiça”: Rodrigo (Homem-Elástico), Erika (Mulher Invisível), Ygor (Homem-Tocha), Aline (Super Girl), Milca (Mulher Maravilha), Ramón (Incrível Hulk), e aos demais integrantes não-oficializados.

As minhas “filhotas” Camila Diniz e Camila Lins, que tanto me divertiram e tiraram o juízo, além da ajuda incondicional quando precisei.

A Luciana Lopes pela grande ajuda na parte prática dos experimentos e pela amizade dedicada, mesmo sob o efeito dos solventes da extração.

A Janaína Melo pelo apoio moral e intelectual durante a parte experimental do m estrado.

Aos colegas de Pós-Graduação com os quais dividi sorrisos e aperreios.

E a todos que tornaram este sonho possível.

EPÍGRAFE

A lógica do vento
O caos do pensamento
A paz na solidão
A órbita do tempo
A pausa do retrato
A voz da intuição
A curva do universo
A fórmula do acaso
O alcance da promessa
O salto do desejo
O agora e o infinito
Só o que me interessa.

Lenine.

RESUMO:

Actinobactérias são o grupo de micro-organismos com maior produção de substâncias de interesse biotecnológico, com maior destaque para a produção de antibióticos. Dentre estas bactérias, o gênero *Streptomyces* tem grande importância por ser o grupo com maior número de espécies produtoras de substâncias bioativas, sendo responsável pela maioria dos antibióticos de origem natural utilizados atualmente. Com o aumento dos casos de infecções causadas por bactérias multirresistentes, torna-se evidente a necessidade de novas substâncias com capacidade antibiótica com amplo espectro de ação e que possuam poucos efeitos colaterais. Deste modo, novos grupos de micro-organismos estão sendo investigados e para obtenção destes organismos busca-se ambientes pouco explorados. A Caatinga encontra-se, neste contexto, como ambiente pouco investigado e possuidor de grande potencial biotecnológico. Dessa forma, objetivou-se neste estudo, o isolamento de actinobactérias da rizosfera de *Licania rigida* Benth, e sua investigação de moléculas bioativas frente a patógenos humanos. Foram encontradas 212 colônias de actinobactérias, das quais 45 isolados foram submetidos a análise antimicrobiana em meio sólido pela técnica de bloco de gelose. Após a análise primária, foram selecionadas 11 linhagens com produção de metabólitos com amplo espectro de ação para cultivo submerso com agitação de 200rpm por 120 horas para avaliação da produção de metabólitos antimicrobianos. Observou-se que dos micro-organismos testados, o *Micrococcus luteus* UFPEDA100, apresentou-se sensível a maioria dos metabólitos das linhagens, enquanto que a *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396 apresentou-se resistente aos metabólitos produzidos pelos isolados. Os diâmetros dos halos de inibição obtidos pela técnica de bloco de gelose variaram entre 11mm e 33mm. Notou-se também a produção de substâncias antifúngicas com atividade frente a *Candida albicans* UFPEDA1007, *Candida krusei* UFPEDA1002 e *Malassezia furfur* UFPEDA1320. No cultivo em meio líquido, os onze isolados selecionados apresentaram produção de antibióticos nas primeiras 96 horas de cultivo, observando sua máxima produção nas primeiras 72 horas. O melhor halo de inibição encontrado foi de 27,5cm frente a *Staphylococcus aureus* UFPEDA02 e *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA71 pelas linhagens L21 (*Actinomadura* sp.) e L26 (*Streptomyces* sp.), respectivamente. A identificação dos grupos químicos revelou a presença de flavonóides e mono, tri e sesquiterpenos, entretanto a ausência de alcalóides. Com os resultados obtidos ficou evidente o potencial biotecnológico das linhagens de actinobactérias isoladas, mostrando a necessidade de investigação de novos habitats na produção de fármacos.

Palavras-chave: Actinobactérias, Atividade Antimicrobiana, *Licania rigida*, Caatinga.

ABSTRACT:

Actinobacteria are a group of micro-organisms with increased production of substances with biotechnological interest, most notably the antibiotics production. Among these bacteria, the genus *Streptomyces* had great importance for being the largest group of species producing bioactive substances, being responsible for most natural antibiotics used today. With the increasing incidence of infections caused by multidrug-resistant bacteria, it becomes evident the need for new antibiotics substances with a large spectrum of action and have few side effects. Thus, new groups of micro-organisms are being investigated and to obtain these organisms seek to a few explore environments. The Caatinga is, in this context, as the environment with little research and possessed of great biotechnological potential. Thus, the objective of this study, is the isolation of actinobacteria from the rhizosphere of *Licania rigida* Benth, and her investigation of bioactive molecules against human pathogens. We found 212 actinobacteria colonies, of which 45 isolates were subjected to microbial analysis in solid medium on agar block technique. After the primary analysis, we selected 11 lineages with production of metabolites with a large spectrum of action for submerged cultivate with agitation of 200rpm for 120 hours to evaluate the production of antimicrobial metabolites. It was observed that the micro-organisms tests analyzed, the *Micrococcus luteus* UFPEDA100, appeared sensitive to most metabolites of the strains, while *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396 were resistant to the metabolites produced by the isolates. The diameters of inhibition halos obtained by the agar block technique varied between 11mm and 33mm. It also showed the production of substances with antifungal activity against *Candida albicans* UFPEDA1007, *Candida krusei* UFPEDA1002 and *Malassezia furfur* UFPEDA1320. In cultivation on liquid medium, the eleven selected isolates showed production of antibiotics in the first 96 hours of culture, noting its maximum production in the first 72 hours. The best halo of inhibition was found to be 27.5 cm against *Staphylococcus aureus* UFPEDA02 and *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA71 by strains L21 (*Actinomadura* sp.) and L26 (*Streptomyces* sp.), respectively. The identification of chemical groups revealed the presence of flavonoids and mono-, tri- and sesquiterpenes, however the absence of alkaloids. With the results obtained it was evident the potential of biotechnological strains of actinobacteria isolated, showing the need for research into new habitats in pharmaceutical production.

Keywords: Actinomycetes, Antimicrobial Activity, *Licania rigida*, Caatinga.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fonte: Paulo Ernani Ramalho Carvalho *In*: PEREIRA, 2011. 12
- Figura 2. Porcentagem de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Licania rigida* Benth (Oiticica) nos meios Arginina Vitamina modificado (AY), meio Czapeck modificado (MC) e meio Hickey-Tresner modificado (HT), nas temperaturas de cultivo de 37°C e 45°C. 29
- Figura 3. Porcentagem dos gêneros identificados segundo análise da cadeia de esporos das actinobactérias isoladas da rizosfera de *Licania rigida* Benth (Oiticica). 29
- Figura 4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de flavonóides presentes nos extratos acetotílicos de cinco linhagens de actinobactérias de *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fase móvel: Acetato de etila: Ácido fórmico:Ácido acético:Água (100:11:11:26). Revelador: reativo de Neu/UV365nm. 36
- Figura 5. Frações de mono e sesquiterpenos presentes na Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de extratos acetotílicos de cinco linhagens isoladas de *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fase móvel: Tolueno:Acetato de etila a 3% (97:10). Revelador: Vanilina Sulfúrica. 37
- Figura 6. Triterpenos observados na Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos acetotílicos de cinco linhagens de actinobactérias de *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fase móvel: Tolueno:Acetato de etila a 10% (90:10). Revelador: Liebermann. 38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Diâmetros dos halos de inibição obtidos na análise antimicrobiana em meio sólido pela técnica de bloco de gelose . 31
- Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição obtidos do líquido metabólico provenientes do cultivo submerso de onze linhagens de actinobactérias da rizosfera de *Licania rigida* Benth. (Oiticica), frente a patógenos humanos . 34

LISTA DE ABREVIATURA

AN	Agar Nutriente
ATCC	American Type Culture Collection
AY	Arginina Vitamina Agar Modificado
BHI	Brain-Heart Infusion
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
HT	Hickey-Tresner Agar Modificado
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
ISP2	Yeast extract-malt extract Agar
ISP4	Inorganic salts-starch Agar
MC	Meio Czapeck Modificado
MPE	Meio para Produção de Eurimicina
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
pH	Potencial hidrogeniônico
SAB	Sabouraud Dextrose Agar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
Geral	3
Específicos	3
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
Actinobactérias	5
Antibióticos	6
Flavonóides	7
Terpenos	8
Alcalóides	9
A Caatinga	10
Oiticica (<i>Licania rigida</i> Benth)	11
Rizosfera	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2. ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE <i>Licania rigida</i> BENTH. (OITICICA) FRENTE A PATÓGENOS HUMANOS	21
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
Isolamento dos Micro-organismos	25
Identificação das Actinobactérias	26
Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Sólido	26
Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Líquido	27
Extração do Metabólito Bioativo por Solventes Orgânicos	27
Identificação dos Grupos Químicos dos Extratos Brutos	28
RESULTADOS	28
Isolamento e Identificação dos Micro-organismos	28
Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Sólido	30
Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Líquido	33
Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Orgânicos	35

Análise dos Grupos Químicos dos Extratos Brutos	35
DISCUSSÃO	38
AGRADECIMENTOS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CONCLUSÕES	44
ANEXOS	
Anexo I: Normas da revista	45
Anexo II: Actinobactérias de Solo da Caatinga: Isolamento e <i>Screening</i> antimicrobiano	51
Anexo III: Influência da Temperatura e Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de Antibióticos por Actinobactérias da Rizosfera de <i>Licania rigida</i> Benth.	57

INTRODUÇÃO

A rizosfera é definida como o volume de solo influenciado pela presença de raízes em crescimento das plantas. É caracterizada por grandes flutuações ambientais que podem promover a elevada diversidade na comunidade microbiana da rizosfera, onde muitas dessas associações são espécies específicas, e, portanto, cada espécie de planta vai mostrar alguma novidade em termos de diversidade microbiana (JEFFRIES, 2004; UREN, 2007; HAWKES et al, 2007).

A microbiota do solo possui uma grande riqueza em enzimas e exerce um papel essencial no metabolismo do solo. Compostos orgânicos em exsudatos de raízes são continuamente metabolizados por micro-organismos associados a raiz, ao rizoplane e a rizosfera. A atividade microbiana resulta em alterações quantitativas e qualitativas da composição do exsudato da raiz devido à degradação de compostos e a liberação de metabólitos microbianos (DAJOZ, 2001; UREN, 2007).

Para a exploração de novas fontes de metabólitos bioativos, tem-se investigado novos habitats, como ambientes marinhos, halófilos, montanhas, ambientes árticos e desérticos (BOUDJELLA et al., 2006; ZHANG & ZENG, 2007; CAI et al., 2009; ABDELMOHSEN et al., 2010; DURAI PANDIYAN et al., 2010). Desta forma, trabalhos tem sido realizados na Caatinga nordestina, bioma pouco explorado e unicamente encontrado no Brasil, com o intuito de avaliar seu potencial biológico (ALBUQUERQUE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; CARTAXO et al., 2010).

Na Caatinga o solo é raso, rico em minerais, mas pobre em matéria orgânica, já que a decomposição desta matéria é prejudicada pelo calor e a luminosidade (MORAES, 2010). A vegetação se caracteriza por arbustos esbranquiçados, mas este bioma sofre com o intenso desmatamento. A Caatinga também é caracterizada por ser a região semi-árida mais populosa do mundo, com 20 milhões de habitantes (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012). Estas características sugerem grande potencial de biodiversidade, embora a ação antrópica esteja diminuindo suas possibilidades de exploração.

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos micro-organismos tornou-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vem crescendo de forma acelerada no cenário mundial (OLIVEIRA et al., 2006).

A biotecnologia tem revelado ser capaz de gerar enorme riqueza e influenciar todo um setor importante da economia (GAVRILESCU & CHISTI, 2005). As dificuldades de abastecimento e

comércio de diversos materiais forçaram os países a procurarem fontes biológicas como matéria-prima na produção de enzimas, alimentos, fármacos, biopesticidas, dentre outros (CAPALBO et al., 2001).

Os antibióticos, produtos do metabolismo secundário de micro-organismos que inibem o crescimento de outros organismos, foram descobertos acidentalmente em uma placa de Petri mofada em 1928 por Alexander Flemming. Durante a Segunda Guerra Mundial houve o desenvolvimento de um processo de produção de penicilina, entretanto apenas duas novas classes de antibióticos foi introduzida no mercado mundial nos últimos 30 anos: a linezolida da classe das oxazolidinonas, no ano de 2000, e a daptomicina, um lipopeptídeo cíclico, lançado no ano 2003 (SATO, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; HAMAD, 2010).

Além dos micro-organismos, os antibióticos podem ser produzidos por algas, líquens, plantas e mesmo células animais (MENDES et al., 2006).

Entre as bactérias produtoras de antibióticos, dá-se maior destaque para uma variedade de antibióticos produzidos por actinobactérias, especialmente o gênero *Streptomyces* (SATO, 2002). Morfologicamente, as actinobactérias possuem hifas aéreas que emergem da colônia a partir da superfície e liberam os esporos para a atmosfera. Ao encontrar nutrientes, o esporo germina e um ou dois tubos germinativos emergem e crescem para formar as hifas. Em resposta ao esgotamento de nutrientes e de outros sinais, a produção de metabólitos secundários e diferenciação morfológica são desencadeados (FLÄRDH & BUTTNER, 2009).

Após a resistência a antibióticos, a prioridade para as próximas décadas deve ser enfatizada no desenvolvimento de novas drogas e/ou a recuperação de moléculas naturais, que permitiria o controle de doenças causadas por patógenos. Preferivelmente, estas moléculas naturais apresentam um vasto leque de ações para vários agentes patogênicos, além de ser de fácil produção, e não induzir resistência microbiana (MARSHALL & ARENAS, 2003).

Deste modo, o presente trabalho visa avaliar o potencial biotecnológico da micro biota da rizosfera de *Licania rigida* Benth. da Caatinga nordestina para produção de compostos bioativos frente a patógenos humanos.

OBJETIVOS

Geral:

Analisar a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana por actinobactérias isoladas de solo rizosférico de *Licania rigida* Benth (Oiticica).

Específicos:

- Isolar actinobactérias de solo rizosférico de *Licania rigida* Benth;
- Identificar as actinobactérias em nível de gênero por meio de micromorfologia;
- Analisar a atividade antimicrobiana das actinobactérias em meio sólido frente a diferentes micro-organismos patogênicos humanos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das actinobactérias de *Licania rigida* Benth através de cultivo submerso frente a diferentes micro-organismos patogênicos humanos;
- Extrair o metabólito bioativo dos isolados através de tratamento com diferentes solventes orgânicos;
- Identificar os grupos químicos presentes nos extratos brutos das actinobactérias de *Licania rigida* Benth.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Actinobactérias

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas com muitos aspectos semelhantes aos de fungos filamentosos: ambos crescem com um micélio vegetativo e dispersam esporos. Estas semelhanças são provavelmente um resultado de adaptações de nichos ecológicos semelhantes, apesar de ter mecanismos subjacentes e diferentes origens evolutivas (CUNHA, 2009 ; FLÄRDH & BUTTNER, 2009).

No ciclo de vida de actinobactérias, esporos liberados pelas colônias ao encontrarem condições favoráveis para crescimento, liberam um ou dois tubos germinativos para crescimento de novas hifas. Em resposta ao esgotamento de nutrientes e de outros sinais, a produção de metabólitos secundários e diferenciação morfológica são iniciados (FLÄRDH & BUTTNER, 2009).

As actinobactérias abundam no solo e poeira, são heterótrofos importantes na decomposição da matéria orgânica, mas também existem actinobactérias parasitas, que causam enfermidades graves ao homem, plantas e animais. Há várias enfermidades associadas as actinobactérias e incluem a colonização sem relevância clínica (muitos gêneros), enfermidades pulmonares (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*), infecções sistêmicas (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*), micetoma (*Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Streptomyces* e *Nocardia*), infecções cutâneas (*Nocardia*, *Dermatophilus*), infecções oportunistas (a maioria dos gêneros), enfermidade de Whipple (*Tropheryma*) e a neumonite alérgica (actinomicetos termófilos) (MURRAY et al., 2006). Contudo, outras espécies de actinobactérias produzem antibióticos. Sato (2002) mostra que as actinobactérias são os maiores produtores de antibióticos, com 4.600 compostos produzidos, sendo o gênero *Streptomyces* o responsável pela produção dos antibióticos (de uso humano e veterinário) e antitumorais mais importantes (FUERTES, 2004). Muitos trabalhos recentes descrevem alta incidência de inibição de patógenos por actinobactérias, inclusive com a descrição de novos metabólitos antimicrobianos (BARKE et al, 2010; DURAIANDIYAN et al, 2010; AL-HUMIANY, 2011; DE et al, 2011; HOZZEIN et al, 2011).

Recentemente, tem-se reportado outro tipo de actinobactérias adaptadas especificamente ao mar (GANDHIMATHI et al., 2008; ABDELMOHSEN et al., 2010). A indústria farmacêutica tem estado isolando o mesmo tipo de compostos, sem encontrar moléculas diferentes e o descobrimento de actinobactérias de habitats pouco explorados abriu um novo campo de estudo para obter outros tipos de drogas (JENSEN, 2003).

Antibióticos

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de micro-organismos que inibem o processo de crescimento de outros micro-organismos. Essa inibição é conhecida há muito tempo, sendo a penicilina descoberta acidentalmente em uma placa de Petri mofada em 1928 por Alexander Fleming, o que lançou uma nova era na medicina. Durante a Segunda Guerra Mundial a demanda de quimioterápicos para tratar as infecções levou ao desenvolvimento de um processo de produção de penicilina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; SATO, 2002).

Demerec em 1948 mostra-se preocupado que a utilização indiscriminada de antibiótico induza ao surgimento cada vez maior de bactérias resistentes aos antibióticos utilizados na época. Essa preocupação vem aumentando atualmente, uma vez que a experiência com doenças infecciosas no último meio século mostra que a introdução de uma nova classe de antibióticos eficaz e seguro, leva a uso generalizado e o desenvolvimento de resistência (WALSH, 2003).

Os antibióticos são agrupados em classes de acordo com os mecanismos de ação na superfície das células microbianas ou dentro das células. Quatro grandes alvos são estudados: (i) a biossíntese da parede celular bacteriana é inibida por antibióticos β -lactâmicos e a classe vancomicina de glicopeptídeos; (ii) ribossomos bacterianos são seletivamente bloqueados na subunidade 30S por aminoglicosídeos e tetraciclinas e nas subunidades 50S pela família de antibióticos macrolídeos; (iii) a família quinolona, atua bloqueando a replicação do DNA bacteriano por desestabilizar intermediários catalíticos nas reações catalizadas pela DNA topoisomerase, e; (iv) a via biossintética da coenzima folato, essencial por prover unidades monoméricas para a síntese de DNA, é bloqueado por drogas sulfa e trimetoprim enquanto peptídeos catiônicos rompem a integridade da membrana (WALSH, 2003).

O setor de medicamentos anti-infecciosos apresenta três classes distintas: antibióticos, antivirais e antifúngicos, sendo que a maior em vendas é a de antibióticos (MENDES, 2006). Em 2010, as vendas de produtos farmacêuticos somaram um total de U\$856,4 bilhões no mundo, com 6,23% deste valor comercializado na América Latina (IMS, 2011).

A produção de antibióticos é uma das áreas mais importantes na investigação da microbiologia industrial. Cada ano detectam-se aproximadamente 300 novas substâncias com atividade antibiótica, das quais 30-35% são componentes secundários de antibióticos já conhecidos (SATO, 2002).

A terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, notadamente

das plantas superiores, das toxinas animais e dos micro-organismos. Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

Desde o início dos anos 1960, apenas quatro novas classes de antibióticos foram introduzidos no mercado, e aproximadamente U\$ 30 bilhões em antibióticos comercializados no mundo ainda é proveniente de classes de antibióticos descobertos há meio século, sendo os "novos" antibióticos derivados de adaptações químicas de antibióticos já estabelecidos (FICHBACH & WALSH, 2009).

Os antibióticos podem apresentar diversas utilizações, dentre elas ação contra infecções provocadas por micro-organismos, antitumoral (agentes citostáticos), contra doenças de plantas, conservantes de alimentos, estimuladores de crescimento animal, ferramentas na bioquímica e biologia molecular (SATO, 2002).

A antibioticoterapia pode ser dividida em três categorias gerais: profilaxia, uso empírico, e terapia definitiva, entretanto, na medida em que os antibióticos são usados rotineiramente, as bactérias evoluem para sobreviver aos fármacos. Este fato pode ser observado desde o início do uso de sulfonamidas na década de 30 (FREITAS, 1989; GALLAGHER & MACDOUGALL, 2011).

Desde o início da quimioterapia, o número de cepas resistentes tem aumentado. Pode ocorrer resistência múltipla e cruzada, isto é, desenvolver-se resistência a um antibiótico e simultaneamente a outros que tenham o mesmo mecanismo de ação (SATO, 2002). Após a resistência a antibióticos, a prioridade para as próximas décadas deve ser centrada no desenvolvimento de fontes de drogas e / ou a recuperação das moléculas naturais, que permitiria a coerência e o bom controle de doenças causadas por patógenos. Preferivelmente, estas moléculas devem ser naturais, com um vasto leque de ações ao longo de vários agentes patogênicos, fácil de produzir, e não induzir resistência a (MARSHALL & ARENAS, 2003).

Utilizam-se métodos químicos e genéticos para melhoramento de fármacos visando a superação da resistência bacteriana, entretanto, para obtenção de moléculas novas é necessária a realização de investigações em novos ambientes e em diferentes grupos de micro-organismos.

Outros grupos de produtos naturais são investigados para utilização no tratamento da saúde humana. Estes grupos são compostos químicos, de origem animal, vegetal ou microbiana e possuem amplas aplicações farmacêuticas. Destes compostos naturais, quase metade é proveniente de plantas, com ênfase na busca por agentes anticancerígenos, seguidos da prospecção de agentes anti -infeciosos (HARVEY, 2008).

Os flavonóides são um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos e constituem uma importante classe de polifenóis abundantes entre os metabólitos secundários dos vegetais . A maioria dos flavonóides apresenta 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C. Esta estrutura básica permite uma série de padrões de substituições e variações no anel C, dando origem aos subgrupos: flavonóis, flavonas, catequinas, flavonas, antocianidinas e isoflavonas (HAVSTEEN 2002; HERRMANN, 2002).

Sua função na planta está relacionada a proteção contra radiação ultra-violeta (UVB), além do grupo das antocianinas terem função ecológica, atuando como agentes atrativos de insetos polinizadores, garantindo a preservação de muitas espécies nativas (PEIXOTO NETO & CAETANO, 2005). No entanto, observa-se a produção, por parte de actinobactérias, de flavonóides com capacidade antibacteriana (JIANG et al, 1997). Na saúde humana possuem função de anticancerígenos, antioxidantes, anti-inflamatórios e no tratamento da osteoporose (WISEMAN, 2006; MACHADO et al 2008).

Terpenos

Terpenos são hidretos de carbono de fórmula geral $(C_5H_8)_n$. No entendimento amplo do termo são incluídas nessa classe as substâncias oxigenadas, principalmente alcoóis, aldeídos ou cetonas, derivadas dos hidretos de carbono terpênicos (AMARAL, 1995). Com o surgimento de um grande número de compostos com diferentes grupos funcionais, tem-se induzido o uso do termo “terpenóide” ao invés de “terpeno”, pois a terminação (-eno) denota melhor hidretos de carbono (MARCANO & HASEGAWA, 2002).

Os terpenos podem encontrar-se sós na fonte vegetal ou formando glicosídeos, sendo estes mais frequentes em triterpenos (MARCANO & HASEGAWA, 2002). Entretanto, na literatura há relatos de Actinobactérias produtoras de substâncias pertencentes a esta classe química (SUNESSON et al, 1997; DÜRR et al, 2006).

Os terpenos classificam-se de acordo com a estrutura da molécula, em acíclicos, quando possuem a cadeia carbônica aberta, e em cíclicos, com a cadeia carbônica fechada. Estes últimos classificam-se em monocíclicos, quando tem um só anel; dicíclicos, quando tem dois anéis , etc (AMARAL, 1995).

Monoterpenos são biogeneticamente derivados de duas unidades de isopreno e estão distribuídos em uma grande variedade de sistemas vivos: plantas, micro-organismos, insetos; alguns tem função específica no indivíduo produtor e vários apresentam atividades biológicas de natureza distinta como antissépticos, anti-helmíntico, expectorantes, diuréticos e sedativos (MARCANO & HASEGAWA, 2002).

Os sesquiterpenos se encontram em fungos, insetos, plantas superiores e organismos marinhos e podem apresentar estruturas abertas ou formar anéis. Podem apresentar ação anti-helmíntica e antimicrobiana (MARCANO & HASEGAWA, 2002; GELINSKY et al 2007).

Os triterpenos tem sido estudados rigorosamente devido em parte, a sua relação com os esteroides, os quais tem chamado poderosamente a atenção desde três quartos de século, quando se conheceu que os hormônios sexuais humanos pertencem a este grupo de compostos. Os triterpenos se encontram amplamente distribuídos na natureza tanto no reino vegetal como no reino animal. Possuem ação antioxidante e anti-inflamatória (MARCANO & HASEGAWA, 2002; CARVALHO et al 2009; DUDHGAONKAR et al, 2009).

Os terpenos são constituintes de óleos essenciais obtidos de folhas, flores, cascas ou medulas vegetais. Estes óleos são empregados em perfumaria, medicina e culinária (AMARAL, 1995).

Alcalóides

Os alcalóides podem ser definidos como bases nitrogenadas, que surgem na formação ou transformação de matérias protéicas. Apesar de serem um grupo amplo e diversificado encontrado em plantas, podem também ser encontrados em alguns fungos. Os alcalóides compreendem uma grande família de mais de 15.000 metabólitos secundários que contem nitrogênio e se encontram aproximadamente em 20% das espécies de plantas vasculares (PEIXOTO NETO & CAETANO, 2005; ZEIGER & TIAZ, 2007).

Estes compostos atuam, principalmente, para a proteção da planta contra insetos, herbívoros, nematóides, fungos e bactérias fitopatogênicas (PEIXOTO NETO & CAETANO, 2005). Contudo, nem todos os alcalóides que aparecem nas plantas são produzidos pelas mesmas. Muitas herbáceas hospedam fungos endofíticos que crescem no apoplasto e sintetizam uma grande variedade de alcalóides (ZEIGER & TIAZ, 2007).

Algumas linhagens de actinobactérias podem produzir alcalóides, sendo estes compostos investigados como anticonvulsivos (NAIK et al, 2001), com propriedades protetoras em células neurais (KIM et al, 1997) bem como serem produzidos como toxinas (Tabekman et al, 1995).

No tratamento da saúde humana são empregados como analgésicos, anti-infecciosos e antineoplásicos, destacando-se os indólicos (vincristina, vimblastina) que possuem alto valor comercial (PEIXOTO NETO & CAETANO, 2005; BING et al, 2009)

A Caatinga

Nas regiões de Caatinga, o clima é quente com prolongadas estações secas. A diversidade de espécies é comparativamente menor em relação a outros biomas, entretanto, estudos recentes revelam um alto número de espécies endêmicas, contudo, a lista de espécies existentes na Caatinga é incompleta devido a falta de estudos na região (IBAMA, 2010; MORAES, 2010; CONSELHO NACIONAL DA RESERVA DA BIOSFERA DA CAATINGA, 2010).

O bioma Caatinga localiza-se na região do semi-árido ocupando uma área aproximada de 826.411 km², abrangendo 09 estados nordestinos (Piauí, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), além da região norte do estado de Minas Gerais. Essa região abrange 60% da área do Nordeste e 13% do Brasil (CONSELHO NACIONAL DA RESERVA DA BIOSFERA DA CAATINGA, 2010; CORRÊA, 2010).

A Caatinga tem sido ocupada desde os tempos do Brasil-Colônia, por meio de doações de terras, fornecendo condições para a concentração fundiária. Aproximadamente, 56% da população nordestina vive atualmente no polígono das secas, perfazendo 16% da população brasileira, contando com o norte de Minas Gerais (IBAMA, 2010).

O solo local é pobre em matéria orgânica, e das terras recobertas com a Caatinga, 50% são de origem sedimentar, ricas em águas subterrâneas. A precipitação média é de 250 a 1000mm e o déficit hídrico elevado durante todo o ano (MORAES, 2010; CONSELHO NACIONAL DA RESERVA DA BIOSFERA DA CAATINGA, 2010).

A vegetação se caracteriza por arbustos tortuosos, com aspecto seco e esbranquiçado por quase todo ano. Em 2008, a vegetação remanescente da área era de 53,62%. Dados do monitoramento do desmatamento no bioma realizado entre 2002 e 2008 revelam que, neste período, o território devastado foi de 16.576 km², o equivalente a 2% de toda a Caatinga (MORAES, 2010; CORRÊA, 2010).

A Caatinga encontra-se bastante alterada, com a substituição de espécies vegetais nativas por cultivos e pastagens. A principal causa da destruição da Caatinga provém da extração da mata nativa, que é convertida em lenha e carvão vegetal destinados principalmente aos pólos gesseiro e cerâmico e ao setor siderúrgico. Entretanto, o desmatamento e as queimadas são ainda práticas comuns no preparo da terra para a agropecuária que, além de destruir a cobertura vegetal, prejudica a manutenção de populações da fauna silvestre, a qualidade da água, e o equilíbrio do clima e do solo. Essas atividades são, principalmente, exercidas pelos moradores locais, tidos como a maior concentração de população pobre do Brasil. Dados mais recentes estimam que nos últimos 15 (quinze) anos 40.000 km² (4.000.000 ha) de Caatinga foram devastados devido à interferência do homem na região. Ainda, estima-se que anualmente 653.000 ha são devastados (IBAMA, 2010; CONSELHO NACIONAL DA RESERVA DA BIOSFERA DA CAATINGA, 2010).

Apesar de ocupar grande área do território nacional, há poucos estudos sobre a microbiota desta região, não sendo encontrados na literatura trabalhos científicos de isolamento de micor-organismos rizosféricos.

Oiticica (*Licania rigida* Benth)

Licania rigida Benth (Oiticica) é uma planta facilmente encontrada na região da Caatinga, sendo encontrada entre os estados do Piauí até Pernambuco. Apresenta-se como uma planta de grande porte, podendo chegar a 15m de altura e sua copa atinge de 15 a 20m de diâmetro (Figura 1). Sua madeira é branca, com fibras entrelaçadas e resistentes a esmagamento, sendo utilizada pela população local na produção de rodas de carro de boi e pilões (MELO et al, 2006; DUQUE, 2004; BRAGA, 1960).

Possui importância econômica na região, pois a grande quantidade de óleo encontrada em sua semente (60%) vem sendo utilizada na produção de Biodiesel e tintas para automóveis, impressoras e madeiras (MELO et al, 2006; DUQUE, 2004).

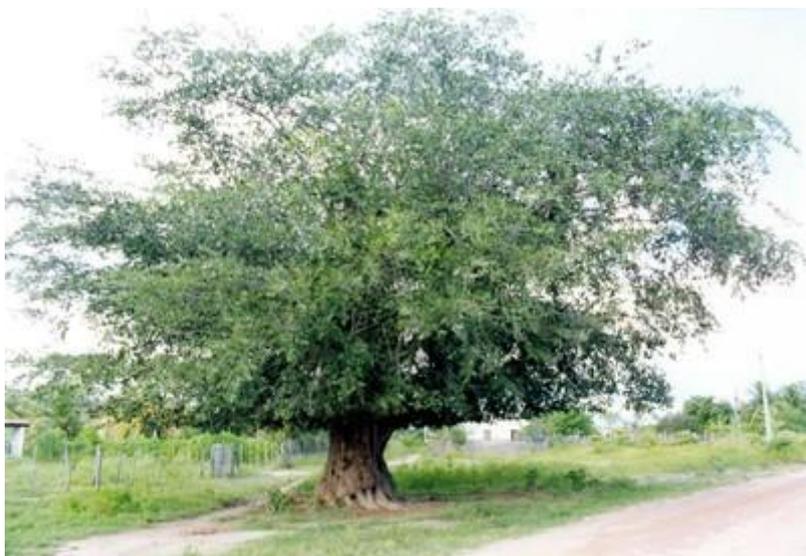


Figura 1. *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fonte: Paulo Ernani Ramalho Carvalho *In*: PEREIRA, 2011.

Silva Filho e colaboradores (2010) mostram a importância da Oiticica, dentre outras espécies vegetais, na produção de mel apícola, uma vez que esta árvore floresce no período de seca da região da Caatinga, onde a maioria das plantas perde suas folhas e não apresentam floração.

Estudo realizado por Santiago (2005) revelou que o extrato aquoso do fruto da oiticica apresentou atividade larvicida contra a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), responsável por grande perda do cultivo de milho, inibindo o alongamento da larva e redução do peso da pupa, além de diminuir sua ovoposição.

Na cultura popular, a Oiticica é utilizada como planta medicinal, onde suas folhas são usadas no tratamento de diabetes e inflamações. A análise de seus compostos mostrou a presença de taninos, flavonóides e ácidos graxos (LORENZI e MATOS, 2002; ALVES & NASCIMENTO, 2010).

Rizosfera

A rizosfera é definida como o volume de solo afetado pela presença de raízes em crescimento das plantas. Na verdade, a maioria do volume da camada superior da crosta terrestre, tem sido influenciada pela raiz das plantas, uma vez ou outra, e, portanto, por definição padrão, a maioria do solo seria ou teria sido em algum momento considerado solo rizosférico (HAWKES et al, 2007; UREN, 2007).

O efeito da raiz vegetal no solo e sobre os microrganismos é tanto maior quanto mais pobre for o solo. As interações entre as raízes e a microbiota se fazem sentir, na maioria das vezes, a várias

dezenas de microns, entretanto, em raros casos, pode -se estender a vários milímetros (solos arenosos) (DAJOZ, 2001; PRIMAVESI, 2002).

A raiz excreta compostos liberados na rizosfera de plantas, a maioria dos quais são compostos orgânicos e componentes normais das plantas, derivados da fotossíntese e processo da planta, dentre os quais temos açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos, esteróis, fatores de crescimento, enzimas, dentre outros. Entretanto, os exsudatos orgânicos não são os únicos responsáveis pela interferência na microbiota da rizosfera. O efeito da rizosfera é o conjunto de ações exercidas pelas raízes: acidificação por secreção de íons H⁺, armazenamento de água e substâncias nutritivas, excreção de produtos variados e de substâncias tóxicas prejudiciais a outras plantas. As substâncias excretadas pelas raízes favorecem a instalação de bactérias e fungos que, ao seu redor, atuam sobre os elementos nutritivos necessários para os vegetais (DAJOZ, 2001; HAWKES et al, 2007; UREN, 2007).

A microbiota do solo está representada pelas bactérias e fungos, sendo que a fração mineral representa 93% da massa total do solo e a matéria orgânica 7%. Esta matéria orgânica está composta em 85% de partes mortas, 10% por raízes e 5% por animais e microrganismos vivos (DAJOZ, 2001).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOHSEN, U. R.; PIMENTEL-ELARDO, S. M.; HANORA, A.; RADWAN, M.; ABOU-EL-ELA, S. H.; AHMED, S.; HENTSCHEL, U. Isolation, Phylogenetic Analysis and Anti-infective Activity Screening of Marine Sponge-Associated. **Actinomycetes Marine Drugs**. 8: 399-412. 2010.

AL-HUMIANY, A. U. A. A. Taifcidin 1 and Taifcidin 2, two anti-microbial agents isolated from the fermentation broth of *Streptomyces roseodistaticus* TA15 and *Streptomyces lavendofoliae* TA17. **Research Journal of Microbiology**. 6(4):328-342. 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. 114: 325–354. 2007.

ALVES, J. J. A.; NASCIMENTO, S. S. Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do cariri paraibano. **Revista Geográfica Acadêmica**. 4(2):73-85. 2010.

AMARAL, L. **A química** Edições Loyola, São Paulo, Brasil, 1995.

BARKE, J.; SEIPKE, R. F.; GRÜSCHOW, S.; HEAVENS, D.; DROU, N.; BIBB, M. J.; GOSS, R. J. M.; YU, D. W.; HUTCHINGS, M. I. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. **BMC Biology**. 8:109. 2010.

BING, F.H.; LIU, J.; LI, Z.; ZHANG, G.B.; LIAO, Y.F.; LI, J.; DONG, C.Y. Anti-influenza-virus activity of total alkaloids from *Commelina communis* L. **Archives of Virology**. 154:1837–1840. 2009.

BOUDJELLAA, H.; BOUTI, K.; ZITOUNI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. **Microbiological Research**. 61:288-298. 2006.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. 2ª ed. Impensa Oficial, 1960. 469p.

CAI, Y.; XUE, Q.; CHEN, Z.; ZHANG, R. Classification and Salt-tolerance of Actinomycetes in the Qinghai Lake Water and Lakeside Saline Soil. **Journal of Sustainable Development**. 1(2):107-110. 2009.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos **Ciência e Cultura**. 55(3). 2003.

CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; MORAES, R. O. **Aplicação da Engenharia a Processos Biotecnológicos: O Caso dos Biopesticidas**. Cobenge – XXIX Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia 2001. Disponível em <<http://www.pp.ufu.br/Cobenge2001/trabalhos/EMA014.pdf>> Acesso em 10/10/2008.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 131: 326–342. 2010.

CARVALHO, C. A.; LOURENÇO, M. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; FACHIN, A. L.; PEREIRA, A. M. S. Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(2B):592-598. 2009.

CONSELHO NACIONAL DA RESERVA DA BIOSFERA DA CAATINGA. **O bioma da caatinga**. 2010. Disponível em: <http://www.biosferadacaatinga.org.br/o_bioma_caatinga.php> Acesso em 27 de julho 2010.

CORRÊA, C. Desmatamento na Caatinga já destruiu metade da vegetação original. 2010. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=72&idConteudo=7422&idMenu=7508>> Acesso em 08 de junho 2010.

CUNHA, I. G. B. **Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos pelo endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA**. 2009. 47f. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife/PE.

DAJOZ, R. **Tratado de ecología**. 2ª edição. Grupo Mundi-Prensa. 2001.

DE, K.; PATEL, P.; JAISWAL, N. Antimicrobial potential of Actinomycetes isolated from the soil of Aroyadham, Jabalpur. **Indian Journal of Applied and Pure Biology**. 26(2):205-208. 2011.

DEMEREK, M. Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics . **Journal of Bacteriology**. 56(1): 63–74. 1948.

DUDHGAONKAR, S.; THYAGARAJAN, A.; SLIVA, D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum*. **International Immunopharmacology** 9:1272–1280. 2009.

DUQUE, J. G. **O nordeste e as lavouras xerófilas**. 4ª Edição. Banco do Nordeste do Brasil. Fortaleza, 2004.

DÜRR, C.; SCHNELL, H.J.; LUZHETSKYY, A.; MURILLO, R.; WEBER, M.; WELZEL, K.; VENTE, A.; BECHTHOLD, A. Biosynthesis of the Terpene Phenalinolactone in *Streptomyces* sp. Tü6071: Analysis of the Gene Cluster and Generation of Derivatives. **Chemistry & Biology**. 13:365–377. 2006.

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

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Antibiotics for Emerging Pathogens. **Science** 325 : 1089-1093. 2009.

FLÄRDH, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews**. 7: 36-49. 2009.

FREITAS, C. C. O Fenômeno da Tolerância Bacteriana aos Antibióticos. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. 1(3): 103-108. 1989.

FUERTES, M. A. G. **Biología**: Biogénesis y microorganismos. 2ed. Pearson Prentice Hall. 2004. 240p.
GALLAGHER, J. C.; MACDOUGALL, C. **Antibiotics Simplified**. Second Edition. 2011. Jones & Bartlett Publishers 258p.

GANDHIMATHI, R.; ARUNKUMAR, M.; SELVIN, J.; THANGAVELU, T.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; KIRAN, G.S.; SHANMUGHAPRIYA, S.; NATARAJASEENIVASAN K. Antimicrobial potential of sponge associated marine Actinomycetes **Journal de Mycologie Médicale** 18: 16 - 22. 2008.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. **Biotechnology** - a Sustainable Alternative for Chemical Industry. *Biotechnology Advances*, 23:471–499, 2005.

GELINSKI, J. M. L. N.; ROSA, J. C. D.; DUQUESNE, E. F. A. P.; BARATTO, C. M. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. **Evidência**, 7(2):131-144. 2007.

HAMAD, B. The antibiotics market. **Nature Reviews: Drug Discovery**. 9:675–676. 2010

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. 13(19/20):894-901. 2008

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. 2002. 96:67– 202.

HAWKES, C. V.; DeANGELIS, K. M.; FIRESTONE, M. K. **Root Interactions with soil microbial communities and process** In: CARDON, Z. G.; WHITBECK, J. L. **The Rhizosphere: an ecological perspective**. Elsevier/Academic Press. 2007. 232p.

HERRMANN, S. M. Aspectos Nutricionais dos Flavonóides. In: MARRONI, N. P. (Org.) **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Editora ULBRA. 2002.

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

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis **Ecosistemas brasileiros: Caatinga**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/caatinga.htm>> Acesso em: 05 de junho 2010.

IMS Health. 2011. Disponível em <http://www.imshealth.com/deployedfiles/ims/Global/Content/Corporate/Press%20Room/Top-line%20Market%20Data/2010%20Top-line%20Market%20Data/Total_Regional_Market_Size.pdf> acesso em 10 de fevereiro de 2012.

JEFFRIES, P. **Microbial Symbioses with plants** In: BULL, A. T. **Microbial diversity and bioprospecting** ASM Press. 2004. 496p.

JENSEN, PR; TJ MINCER; W. FENICAL. **The true potential of the marine microorganisms** . 2003. In: SOUZA, V.; ESCALANTE, A. E.; NOGUEZ, A. M.; ESPINOSA, L.; CERRITOS, R.; EGUIARTE, L. E. **La ecología microbiana: una nueva ciencia para un Nuevo siglo** . Instituto Nacional de Ecología. Disponível em <<http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap5.html#top>> Acesso em 20 de julho de 2010.

JIANG, Z.D.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Actinoflavoside, a novel flavonoid-like glycoside produced by marine bacterium of the genus *Streptomyces*. **Tetrahedron Letters**. 38(29):5065-5068. 1997.

KIM, W.G.; KIM, J.P.; KOSHINO, H.; SHIN-YA, K.; SETO, H.; YOO, I.D.; Benzastatins E, F, and G: New indoline alkaloids with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitrosporeus*. **Tetrahedron**. 53(12):4309-4316. 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**. Instituto Plantarum, 544 p. 2002.
MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. 27(1/2):33-39. 2008.

MARCANO, D. & HASEGAWA, M. **Fitoquímica Orgânica**. Colección Estudios. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Editorial Torino. Caracas. 2002.

MARSHALL, S. H.; ARENAS G. **Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology**. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(6). 2003.

MENDES, C. D. S.; ANTUNES, A. M. S.; PEREIRA JÚNIOR, N. **Mapeamento do mercado brasileiro de antibióticos**. In ANTUNES, A.; PEREIRA JÚNIOR, N.; EBOLE, M. F. **Gestão em biotecnologia**. E-papers. 2006. 324p.

MELO, J. C.; TEIXEIRA, J. C.; BRITO, J. Z.; PACHECO, J. G. A.; STRAGEVITCH, L. Produção de biodiesel de óleo de oiticica. In: Congresso Brasileiro de Tecnologia de Biodiesel, 2., 2007, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: MCT/ABIPTI, p. 165 -167. 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Monitoramento da Caatinga. Disponível em <http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/caatinga/caatinga_.htm> Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

MORAES, D. **Bioma Caatinga**. s.d. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=962&sid=2>> Acesso em: 05 de junho 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, 979 p.

NAIK, S.R.; HARINDRAN, J.; VARDE, A.B. Pimprinine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity. **Journal of Biotechnology**. 88(1):1-10. 2001.

OLIVEIRA, V. C.; TRINDADE, R. C.; CARVALHO FILHO, O. M.; COSTA, J. L. S. População Microbiana de Solos sob Diferentes Agroecossistemas e Vegetação Nativa no Semi -Árido. Resumos do II Congresso Brasileiro de Agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 2(1):898-901. 2007.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**, 7:1 -19, 2006.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais do popular ao científico**. EDUFAL 1ª edição. 2005. 90p.

PEREIRA, S. **Revelação da flora nacional**. 2011. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/resenhas/revelacao-da-flora-nacional>> Acesso em: 10 de fevereiro de 2012.

PRIMAVERESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. Nobel, 2002. 549p.

SANTIAGO, G. P. **Avaliação dos efeitos de extratos aquosos de plantas sobre a biologia da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) mantida em dieta artificial**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí. Teresina. 2005. 110fl.

SATO, S. Produção de antibióticos In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Edgard Blücher Ltda. v.3. 2002. 616p.

SILVA FILHO, J. P.; SILVA, R. A.; COSTA M. J. S. Potencial apícola para *Apis mellifera* L. em área de caatinga no período da floração da oiticica (*Licania rigida* Benth). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. 5(1):120-128. 2010.

SUNESSON, A.L.; NILSSON, C.A.; CARLSON, R.; BLOMQUIST, G.; ANDERSSON, B. Production of volatile metabolites from *Streptomyces albidoflavus* cultivated on gypsum board and tryptone glucose extract agar-influence of temperature, oxygen and carbon dioxide levels. **The Annals of Occupational Hygiene**. 41(4) 393-413. 1997.

TABEKMAN, R.; OVADIA, H.; RASOULY, D.; MATSUDA, Y.; LAZAROVICI, P. K252a, a *Streptomyces* toxin alkaloid, delays the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) symptoms in SJL/J mice. **Toxicon**. 33(3):289. 1995.

UREN, N. C. **Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-growth plants.** IN: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil -plant interface.** Second Edition CRC Press. 2007. 472p.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance.** ASM Press. 2003. Washington. EUA.

WISEMAN, H. Isoflavonoids and human Health. In: ANDERSEN, O. M. & MARKHAM, K. R. (Ed.) **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications.** Taylor & Francis Group. CRC Press. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Microbes and Antimicrobial Agents: antimicrobial discovery and development.** 2010. Disponível em:
<http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/en/index.html> Acesso em: 20 de julho 2010.

ZEIGER, E.; TIAZ, L. **Fisiología vegetal.** Universitat Jaume. 2007. 1338p.

ZHANG, J.W.; ZENG, R.Y. Purification and Characterization of a Cold -Adapted α -Amylase Produced by *Nocardiopsis* sp. 7326 Isolated from Prydz Bay, Antarctic. **Marine Biotechnology.** 1(7). 2007.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE
Licania rigida BENTH. (OITICICA) FRENTE A PATÓGENOS HUMANOS

Revista: Química Nova
A ser submetido.

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Licania rigida* Benth. (OITICICA) FRENTE A PATÓGENOS HUMANOS.

Elizianne Pereira Costa, Ana Lúcia Figueiredo Porto - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Erika Cristina de Lima Soares, Janete Magali de Araújo - Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Itamar Soares de Melo - Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, Brasil.

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Licania rigida* Benth. (OITICICA) FRENTE A PATÓGENOS HUMANOS

ABSTRACT

The need for new antibiotics to combat resistant micro-organisms that cause many diseases, stimulates the exploration of different environments for new strains producing bioactive metabolites. This work evaluated the antimicrobial activity through cultivation in solid and liquid media by actinobacteria isolated from the rhizosphere of *Licania rigida* Benth. (Oiticica) against Gram positive and Gram negative bacteria, and fungi. The results showed a predominance of antagonism of secondary metabolites produced by actinomycetes on solid media against Gram positive strains, however there was also inhibition of the fungus *Malassezia furfur* UFPEDA1320. Only UFPEDA396 *Klebsiella pneumoniae* were resistant. In liquid medium was revealed the rapid production of antimicrobial metabolites with maximum activity during the first 72h of cultivation, and the Meio para Produção de Eurimicina - MPE - more propitious to the production of metabolites with antimicrobial activity. It was observed that the production of metabolites occurred at pH 6.0 to 7.0. The extract acetotílico found to be more efficient in extracting the bioactive metabolite, and by thin layer chromatography, was identified the presence of flavonoids and terpenes produced by strains of *Streptomyces* sp. (L01, L26) and *Actinomadura* sp. (L21, L140 and L175). These results confirm the biological potential of bioprospecting in the Caatinga of metabolites with antimicrobial activity.

Keywords: Actinomycetes; Antimicrobial Activity; *Licania rigida* Benth.

INTRODUÇÃO

Actinobactérias são produtoras de diversos metabólitos de interesse biotecnológico, entretanto, destacam-se principalmente como fonte de substâncias antibióticas.¹ Estas bactérias são gram-positivas, filamentosas e colonizam diversos habitats, dentre eles o interior de plantas (com o endofíticos), água, ar e solo.²⁻⁴

Metabólitos secundários são o objeto de estudo da química de produtos naturais. A extraordinária variabilidade estrutural destes compostos tem atraído a curiosidade de químicos e a atividade biológica tem inspirado a indústria farmacêutica a procura de estruturas originais em culturas microbianas e extratos de plantas.⁵

Muitos antibióticos atualmente utilizados são derivados de produtos naturais, com modificações químicas para otimização das propriedades farmacológicas e diminuição da toxicidade.⁶ Contudo outros compostos químicos, como alcalóides, terpenos, cumarinas e flavonóides são usados na terapêutica.⁷⁻¹⁰

Estimativas sugerem que os 10 cm superficiais do solo possuem 10^{25} – 10^{26} actinobactérias, mas apenas 10^7 foram analisadas quanto a produção de compostos antimicrobianos.¹¹ Somente por processos de “*screening*” pode-se encontrar antibióticos com estruturas básicas inteiramente novas, especialmente pela utilização de novos procedimentos de teste e pela investigação em novos grupos de micro-organismos.¹²

Muitos trabalhos evidenciam a utilização de habitats diferentes e pouco explorados para a pesquisa de actinobactérias com potencial antimicrobiano, com ênfase em ambientes semi-áridos, oceanos, desertos e florestas tropicais.¹³⁻¹⁶ Atualmente foram propostas duas novas substâncias com atividade antimicrobiana provenientes de duas linhagens de actinobactérias isoladas de solo da Arábia Saudita,¹⁷ enquanto que outros estudos propõem novas espécies de actinobactérias isoladas de ambientes desérticos.^{18,10} Adicionalmente, pesquisas mostram que as condições de cultivo (pH, temperatura, agitação, dentre outros) e fontes de carbono e nitrogênio disponíveis afetam diretamente a produção do antimicrobiano pelo micro-organismo e evidenciam que mudanças na concentração de gases atmosféricos, temperatura e umidade podem modificar a comunidade microbiana do solo.^{19,20} No “*screening*”, o espectro de produtos é definido pela capacidade fisiológica dos micro-organismos, utilizando diversos meios e condições de fermentação.²¹

O presente trabalho investiga a atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de rizosfera de *Licania rigida* Benth. (Oiticica) proveniente da Caatinga nordestina, partindo do pressuposto que as

condições climáticas do ambiente selecionado e a interação com as raízes da planta oferecem um micro-habitat específico no qual os micro-organismos possam ter uma maior diversidade metabólica.

O presente trabalho consistiu em explorar o potencial antibiótico dos metabólitos das linhagens isoladas. Estas foram analisadas por meio de cultivo em meio sólido e em cultivo submerso para indicação do melhor meio de cultura na produção de metabólitos frente a micro-organismos patogênicos que afetam a saúde humana, além da identificação dos grupos químicos presentes nos extratos brutos obtidos do líquido metabólico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento dos Micro-organismos:

Para o isolamento das actinobactérias foi utilizada uma amostra de solo proveniente da rizosfera de Oiticica (*Licania rigida* Benth), cedida pela Embrapa pelo Prof. Itamar Melo. As actinobactérias foram isoladas a partir de 10g de solo usando o método de espalhamento na superfície de meio de cultura contido em placa de Petri, utilizando-se 100µL das suspensões seriadas em solução fisiológica esterilizada nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} g/mL. A amostra da rizosfera, antes de ser isolada, sofreu um pré-tratamento consistindo de diluição de 10g da amostra em 90mL de solução fisiológica esterilizada, seguido de agitação por 15-20 minutos. Após a agitação, a amostra foi aquecida em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Este pré-tratamento visou eliminar as colônias bacterianas que se espalham rapidamente e não foram o alvo do isolamento.

O isolamento foi realizado com três meios de cultura, visando a obtenção de maior diversidade de actinobactérias. Os meios utilizados foram: meio Czapeck modificado – MC – contendo (em g/L) glicose (3,0); NaNO₃ (0,5); K₂HPO₄ (0,3); MgSO₄.7H₂O (0,3); KCl (0,3); FeSO₄.7H₂O (0,01); MnSO₄.7H₂O (0,001); CuSO₄.5H₂O (0,001); ZnSO₄.7H₂O (0,001); Agar (20,0) em pH 7,4; o meio Hickey-Tresner Agar Modificado – HT – composto (em g/L) de dextrina (10,0); extrato de levedura (1,0); extrato de carne (1,0); casitone (2,0); CaCl₂.7H₂O (0,02); Agar (20) em pH 7,3; e o meio de cultura Arginina Vitamina Ágar Modificado – AY – contendo (em g/L) L-arginina (0,3); glicose (1,0); glicerol (1,0); K₂HPO₄ (0,3); MgSO₄.7H₂O (0,2); NaCl (0,3); extrato de levedura (1,0); FeSO₄.7H₂O (0,01); CuSO₄.5H₂O (0,001); MnSO₄.7H₂O (0,001); ZnSO₄.7H₂O (0,001); Agar (15,0) em pH 6,4. Todos os meios de cultura foram adicionados de Anfotericina B (100µg/mL) para inibição de crescimento fúngico.

As placas de Petri foram incubadas por 30 dias, sendo o isolamento realizado a temperatura de 37°C e 45°C. As colônias com características visuais de actinobactérias foram transferidas para outras placas e após purificação, mantidas em tubos de ensaio com meio de cultura inclinado.

As actinobactérias isoladas encontram-se depositadas na Coleção de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPEDA.

Identificação das Actinobactérias:

As linhagens isoladas foram submetidas a identificação, a nível de gênero, através da visualização da cadeia de esporos segundo Shirling & Gotlieb.²²

Os meios de cultura utilizados para a caracterização morfológica foram: Yeast extract-malt extract Agar²³ – ISP2 – composto por (em g/L) extrato de levedura (4,0); extrato de malte (10,0); dextrose (4,0); Agar (20,0); o meio Inorganic salts-starch Agar⁹ – ISP4 – Contendo (em g/L) amido (10,0); K₂HPO₄ (1,0); MgSO₄.7H₂O (1,0); NaCl (1,0); (NH₄)₂SO₄ (2,0); CaCO₃ (2,0); FeSO₄.7H₂O (0,001); MnCl₂.4H₂O (0,001); ZnSO₄.7H₂O (0,001); Agar (20,0), e; os meios nos quais as actinobactérias foram isoladas.

As actinobactérias foram cultivadas em linha reta na superfície do meio de cultura contido em Placas de Petri e perpendicularmente às estrias foram inseridas lamínulas de vidro esterilizadas num ângulo de 45°C, totalizando duas lamínulas por estria.

As placas de Petri foram incubadas por 21 dias a 37°C e 45°C para crescimento micelial e a cada 7 dias foi retirada uma lamínula para visualização da micromorfologia, onde foram observadas a quantidade e disposição dos esporos.

Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Sólido:

A atividade antimicrobiana em meio sólido foi realizada através da técnica de bloco de gelose segundo Ichikwa et al.²⁴ para avaliar a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Bacillus subtilis* UFPEDA86, *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA71, *Micrococcus luteus* UFPEDA100, *Escherichia coli* UFPEDA224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396, *Candida krusei* UFPEDA1002, *Candida albicans* UFPEDA1007 e *Malassezia furfur* UFPEDA1320.

As actinobactérias foram cultivadas nos meios dos quais foram isoladas por 5 dias e depois foram retirados blocos de 10mm de diâmetro com um perfurador previamente esterilizado. Foi realizada uma suspensão de células na escala 0,5 MacFarland de cada micro-organismo teste em água

destilada estéril e 100 µL de cada suspensão foi semeada uniformemente na superfície do meio de cultura em placas de Petri contendo os meios Agar Nutriente (AN), Brain-Heart Infusion (BHI) e Sabouraud Agar (SAB) sobre os quais foram colocados os blocos.

As placas de Petri foram incubadas a 37°C/24h para as bactérias e a 30°C/48h para os fungos. Após este período foi observado a formação, ao redor do bloco de gelose, de halos de inibição os quais tiveram seus diâmetros medidos em milímetros utilizando um paquímetro. O teste foi realizado em triplicata e com os halos obtidos para cada linhagem foi realizada média aritmética.

Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Líquido:

Os micro-organismos com metabólitos de maior espectro de ação antimicrobiana em meio sólido foram selecionados para cultivo em meio líquido, utilizando os meios: Meio para Produção de Eurimicina²⁵ – MPE – composto em g/L de farinha de soja (20,0) glicose (20,0), NaCl (5,0) e CaCO₃ (2,0) em pH 6,7-7,0; o meio 1 – M1 – composto (em g/L) por farinha de soja (10,0) glicose (10,0), NaCl (5,0) e CaCO₃ (1,0) em pH 7,0; e os meios nos quais foram isoladas, sendo destes retirado o ágar.

Para composição do pré-inóculo, as actinobactérias foram cultivadas em 50mL dos respectivos meios de cultura sob agitação a 200rpm por 48h/30°C. Após este período, 5mL foram transferidos para os frascos de Erlenmeyer, perfazendo 10% do volume final do experimento.

As actinobactérias foram cultivadas em 50mL de meio líquido, em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250mL a 200rpm durante 120 horas. A cada 24h foi retirado 1mL o qual foi submetido a centrifugação a 8.161 g por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para aferição de pH e análise antimicrobiana pela técnica de difusão em disco de papel segundo as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).²⁶ Discos de papel com 6 mm de diâmetro foram embebidos em 50µL de líquido metabólico.

Para avaliar a influência da temperatura de cultivo sobre a produção de antibióticos uma linhagem de *Streptomyces* (L26) e uma de *Actinomadura* (L175) foram cultivadas a 30°C ± 2°C e 40°C ± 2°C para definição da temperatura de análise.

Extração do Metabólito Bioativo por Solventes Orgânicos :

Das linhagens analisadas quanto a produção de substâncias antimicrobianas em meio líquido cinco foram selecionadas para extração do metabólito com atividade antimicrobiana e cultivadas observando os melhores parâmetros de produção obtidos na análise do potencial antimicrobiano em meio líquido.

As actinobactérias foram cultivadas em frascos de Fernbach com 500mL de meio de cultura. O líquido metabólico foi separado da biomassa através de centrifugação (10.000 rpm por 3 minutos) e ambas as partes foram tratadas com diferentes solventes orgânicos em três pH's (2,0; 7,0 e 9,0) para extração da molécula antimicrobiana.

O líquido metabólico foi tratado, na proporção 2:1, com os solventes: Acetato de Etila, Hexano, Clorofórmio, Benzeno e Éter de Petróleo, sob agitação constante por 3 minutos para facilitar a extração da molécula bioativa.

A biomassa das Actinobactérias foram tratadas com os solventes Etanol, Metanol e Acetona para extração do metabólito antimicrobiano. Os solventes orgânicos foram adicionados na proporção 10:1 e mantidos em agitação constante por 30 minutos para interação com a molécula ativa.

Os extratos brutos obtidos foram posteriormente submetidos a análise antimicrobiana pela técnica de difusão em disco (ver item anterior), utilizando discos de papel de 10 milímetros de diâmetro, embebidos em 50µL dos extratos. As condições de incubação respeitaram as necessidades fisiológicas dos micro-organismos testes.

Identificação dos Grupos Químicos dos Extratos Brutos:

Os extratos brutos de Acetato de Etila (pH 7,0 e 9,0) foram selecionados para realização de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para análise dos grupos químicos presentes. Foram utilizados reveladores específicos para a identificação dos grupos: Flavonóides (reativo de Neu/UV365nm), Alcalóides (reagente de Dragendorff), Monoterpenos (Vanilina Sulfúrica), Sesquiterpenos (Vanilina Sulfúrica) e Triterpenos (Liebermann), segundo Wagner²⁷ e Harbone.²⁸

As fases móveis utilizadas para eluição dos compostos na cromatografia foram: Acetato de etila:Ácido fórmico:Ácido acético:Água (100:11:11:26) para Alcalóides e Flavonóides; Tolueno:Acetato de etila a 3% (97:10) para Mono- e Sesquiterpenos; e Tolueno:Acetato de etila a 10% (90:10) para Triterpenos.

RESULTADOS

Isolamento e Identificação dos Micro-organismos:

Foram observadas 212 colônias nas placas de isolamento nos três meios de cultura. Observou-se maior quantidade de colônias advindas do meio MC totalizando 115 linhagens (54,2%) das actinobactérias encontradas. O meio de cultura com a segunda maior quantidade de colônias foi o meio AY com 60 actinobactérias (28,3%), seguido do meio HT com 37 colônias (17,5%).

O cultivo em diferentes temperaturas influenciou o aparecimento de linhagens de actinobactérias, sendo a temperatura de 37°C responsável por 131 dos micro-organismos observados (61,8%) (Figura 2). Nesta mesma temperatura foi observada prevalência de crescimento no meio de cultura AY e MC, enquanto que o meio de cultura HT apresentou a maioria das colônias na temperatura de 45°C (Figura 2).

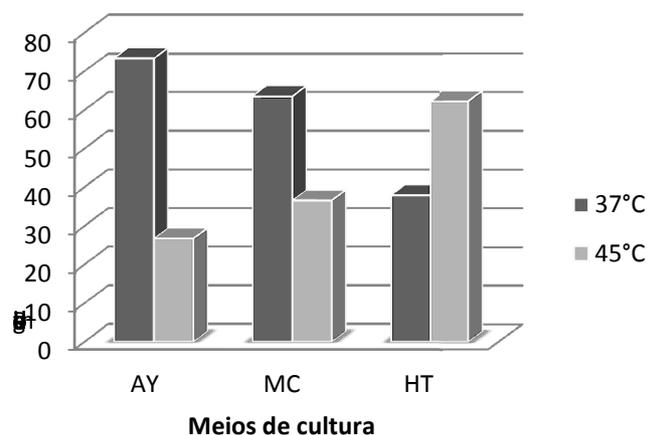


Figura 2. Porcentagem de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Licania rigida* Benth (Oiticica) nos meios Arginina Vitamina modificado (AY), meio Czapeck modificado (MC) e meio Hickey -Tresner modificado (HT), nas temperaturas de cultivo de 37°C e 45°C.

A análise morfológica da cadeia de esporos das 40 actinobactérias utilizadas no ensaio antimicrobiano, revelou que 14 linhagens (31,1%) pertencem ao gênero *Streptomyces*, 5 isolados (11,1%) pertencem ao *Nocardiopsis* e 17 (37,7%) ao *Actinomadura*. Apenas quatro linhagens (L12, L55, L197 e L209) não puderam ser identificadas por análise microscópica das cadeias de esporos (Figura 3).

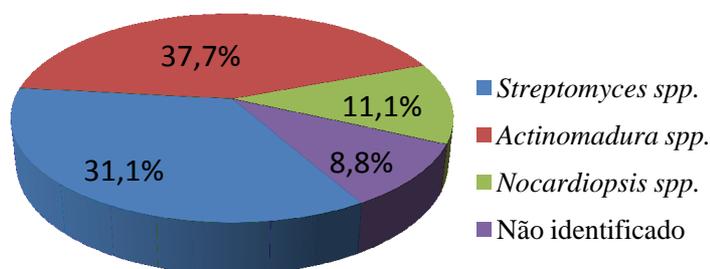


Figura 3. Porcentagem dos gêneros identificados segundo análise da cadeia de esporos das actinobactérias isoladas da rizosfera de *Licania rigida* Benth (Oiticica).

Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Sólido:

Foi avaliado o potencial antimicrobiano de 40 isolados que apresentaram melhor crescimento em meio de cultura frente a nove micro-organismos patogênicos humanos, sendo encontrados halos de inibição entre 11 e 33mm de diâmetro (Tabela 1).

Dentre os micro-organismos teste, apenas *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396 foi resistente aos metabólitos produzidos por todos os isolados. Os demais micro-organismos testes apresentaram, no mínimo, sensibilidade a sete actinobactérias isoladas.

Os maiores halos de inibição foram encontrados frente a *Micrococcus luteus* UFPEDA100, com halos de inibição entre 13 e 33mm de diâmetro, apresentando 82,6% (21) dos halos igual ou acima a 20mm de diâmetro.

Observou-se uma predominância de atividade antimicrobiana para os patógenos Gram positivos, entretanto, foi evidenciada uma alta taxa de atividade contra o fungo leveduriforme *Malassezia furfur* UFPEDA1320, com atividade por 23 isolados (51,1%) (Tabela 1).

Os halos de inibição para os demais micro-organismos teste foram entre 11mm e 26mm de diâmetro para *Staphylococcus aureus* UFPEDA02; 12,3 e 31,3mm de diâmetro para *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA71; 11mm e 26mm de diâmetro para *Bacillus subtilis* UFPEDA86; 14mm e 17,3mm de diâmetro para *Escherichia coli* UFPEDA224; 11,3mm e 17mm de diâmetro para *Candida krusei* UFPEDA1002; 11,5mm e 15,5mm de diâmetro para *Candida albicans* UFPEDA1007, e; 14mm e 22,3mm de diâmetro para *M. furfur* UFPEDA1320.

Tabela 1. Diâmetros dos halos de inibição obtidos na análise antimicrobiana em meio sólido pela técnica de bloco de gelose.

Número da linhagem	Gênero	Halos de inibição (em milímetros)								
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Malassezia furfur</i>
		UFPEDA	UFPEDA	UFPEDA	UFPEDA	UFPEDA	UFPEDA	UFPEDA	UFPEDA	UFPEDA
		02	71	86	100	224	396	1007	1002	1320
L01	<i>Streptomyces</i> sp.	-	15,6	-	26,6	14	-	12,6	-	14,3
L05	<i>Actinomadura</i> sp.	-	-	16	-	-	-	-	12,6	-
L06	<i>Streptomyces</i> sp.	13,6	-	14,3	-	-	-	-	-	-
L08	<i>Streptomyces</i> sp.	17,3	16,3	-	-	-	-	-	-	15,3
L09	<i>Actinomadura</i> sp.	13	14,3	-	-	16,3	-	-	-	16,6
L10	<i>Actinomadura</i> sp.	13	16	-	21	16,3	-	-	11,6	13,3
L11	<i>Actinomadura</i> sp.	12	15,6	-	21	16	-	-	-	15,3
L12	Não Identificado	-	13,3	23	-	-	-	17	15	
L15	<i>Actinomadura</i> sp.	17	20,3	-	21,3	-	-	-	-	14
L17	<i>Streptomyces</i> sp.	17	19,3	-	-	-	-	-	-	18
L21	<i>Actinomadura</i> sp.	19,6	28	13,3	28,6	-	-	-	-	16,6
L25	<i>Actinomadura</i> sp.	-	20,3	-	22	-	-	-	-	16,3
L26	<i>Streptomyces</i> sp.	24	31,3	15,6	26,3	-	-	-	-	20
L44	<i>Actinomadura</i> sp.	-	16,3	-	20	-	-	-	-	14,6
L47	<i>Actinomadura</i> sp.	12,3	-	16,3	-	-	-	-	-	-
L48	<i>Streptomyces</i> sp.	-	20,3	-	-	-	-	-	-	17
L55	Não Identificado	-	-	-	-	-	-	-	-	16,6
L60	<i>Actinomadura</i> sp.	-	27	-	-	-	-	-	-	-
L62	<i>Streptomyces</i> sp.	-	20,6	11	13,6	-	-	-	-	-
L63	<i>Nocardiosis</i> sp.	-	20	-	-	-	-	-	-	-
L68	<i>Actinomadura</i> sp.	18,6	15	18,3	27,5	14	-	-	11,6	17,6
L69	<i>Actinomadura</i> sp.	14	16,3	-	23	17,3	-	13	13	17

Tabela 1 (continuação). Diâmetros dos halos de inibição obtidos na análise antimicrobiana em meio sólido pela técnica de bloco de gelose.

L70	<i>Actinomadura</i> sp.	12,3	-	15,6	-	-	-	-	-	-
L96	<i>Nocardiosis</i> sp.	-	15	-	29	-	-	-	-	-
L130	<i>Streptomyces</i> sp.	11	-	14	13	-	-	-	-	-
L138	<i>Streptomyces</i> sp.	13,6	-	-	22	-	-	-	-	-
L139	<i>Actinomadura</i> sp.	13,3	-	-	24	-	-	11,6	-	-
L140	<i>Actinomadura</i> sp.	16	22,3	13,6	23	-	-	-	-	22,3
L167	<i>Streptomyces</i> sp.	-	16,6	-	26,6	-	-	13,6	-	22,3
L173	<i>Streptomyces</i> sp.	13,6	16,3	-	23	15,3	-	13	12,5	15,6
L174	<i>Streptomyces</i> sp.	-	12,3	-	27	-	-	12,3	-	18
L175	<i>Actinomadura</i> sp.	26	18,3	13,6	28,3	-	-	-	15,5	18
L180	<i>Streptomyces</i> sp.	-	14,6	-	-	-	-	11,3	14,3	-
L194	<i>Nocardiosis</i> sp.	-	15	-	-	-	-	-	-	-
L196	<i>Nocardiosis</i> sp.	-	13	-	-	-	-	-	-	-
L197	Não Identificado	-	16,3	-	21	-	-	-	-	-
L204	<i>Actinomadura</i> sp.	11	17	-	19,3	-	-	-	-	14
L207	<i>Streptomyces</i> sp.	15	15	17,6	33	-	-	-	11,5	17,3
L208	<i>Nocardiosis</i> sp.	13,3	15,6	16	13,3	-	-	-	-	-
L209	Não Identificado	-	14,3	-	29,6	-	-	13,3	-	18,3

Em negrito estão os maiores halos de inibição (mm) para cada micro-organismo teste.

Avaliação do Potencial Antimicrobiano em Meio Líquido:

Onze linhagens de actinobactérias foram selecionadas para cultivo em meio líquido por apresentarem atividade frente a 5-7 micro-organismos testes analisados em meio sólido. Estas linhagens foram previamente identificadas como *Streptomyces* spp. (linhagens L01, L26, L207) e *Actinomadura* spp. (linhagens L10, L21, L11, L68, L69, L140, L173, L175).

A análise da influência da temperatura mostrou que a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ proporcionou melhor condição de produção nas linhagens analisadas, com halos de 27,5mm e 19mm por *Streptomyces* sp (L26) e *Actinomadura* sp. (L175), respectivamente, na inibição de *M. smegmatis* UFPEDA71. Em contrapartida o cultivo a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ apresentou halos de inibição de 13,1mm por *Streptomyces* sp. (L26) e 11,5mm *Actinomadura* sp. (L175) para o mesmo micro-organismo teste.

Observou-se que das onze linhagens, oito apresentaram melhor produção de metabólitos antimicrobianos no meio de cultura MPE, o qual apresenta alta concentração de nitrogênio disponível na forma de farinha de soja. Estas linhagens mostraram que a produção dos metabólitos bioativos ocorreu, principalmente nas primeiras 72h de cultivo (Tabela 2).

Nas demais linhagens mostraram-se a maior produção de antimicrobianos nos meios AY (linhagem L207), MC (linhagem L11) e meio HT (linhagem L01), todas com produção máxima nas primeiras 48h de cultivo. O meio de cultura M1 não se destacou como melhor produtor de metabólitos antimicrobianos por nenhuma das actinobactérias analisadas.

Durante o cultivo das actinobactérias pôde-se observar que o pH do meio de cultura onde houve o maior halo de inibição pelos metabólitos antimicrobianos oscilou entre 5,0 e 7,0 durante o cultivo (Tabela 2), estando assim levemente ácido, e apresentaram tendência a aumento do valor no decorrer do cultivo.

Os meios de cultura utilizados para a seleção em meio sólido não apresentaram o mesmo potencial de produção em cultivo submerso, sendo os meios de cultura contendo farinha de soja como fonte de nitrogênio os melhores produtores.

Foi observada também a baixa produção de inibidores de bactérias Gram negativas.

Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição obtidos do líquido metabólico provenientes do cultivo submerso de onze linhagens de actinobactérias da rizosfera de *Licania rigida* Benth. (Oiticica), frente a patógenos humanos.

Linhagens de actinobactérias	Micro-organismo teste	Maior halo (mm)	Tempo de cultivo	Meio de cultura	pH
L01 <i>Streptomyces</i> sp.	<i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	22,1	48h	HT	7,0
L10 <i>Actinomadura</i> sp.	<i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	17,3	72h	MPE	5,0
L11 <i>Actinomadura</i> sp.	<i>M. luteus</i> UFPEDA100	15,3	48h	MC	6,0
L21 <i>Actinomadura</i> sp.	<i>S. aureus</i> UFPEDA02	27,5	96h	MPE	6,0
L26 <i>Streptomyces</i> sp.	<i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	27,5	48h	MPE	6,0
L68 <i>Actinomadura</i> sp.	<i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	11,5	72h	MPE	6,0
L69 <i>Actinomadura</i> sp.	<i>S. aureus</i> UFPEDA 02; <i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	13	72h	MPE	6,0
L140 <i>Actinomadura</i> sp.	<i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	25	24h	MPE	5,0
L173 <i>Streptomyces</i> sp.	<i>E. coli</i> UFPEDA224	12,6	48h	MPE	6,0
L175 <i>Actinomadura</i> sp.	<i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	21,3	48h	MPE	6,0
L207 <i>Streptomyces</i> sp.	<i>M. smegmatis</i> UFPEDA71	14,1	48h	AY	6,0

Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Orgânicos:

Duas linhagens de *Streptomyces* sp. (L01, L26) e três *Actinomadura* sp. (L21, L140 e L175) foram selecionadas para extração do composto antimicrobiano a partir dos resultados obtidos no cultivo submerso.

Dos 75 extratos brutos obtidos do líquido metabólico apenas seis foram eficientes para a separação do metabólito antimicrobiano, com destaque para os solventes Acetato de Etila e Benzeno, responsáveis pela extração da substância bioativa.

Os halos de inibição produzidos pelos extratos brutos foram de 13mm e 12,5mm para os extratos acetoetílico e benzênico, respectivamente, no líquido metabólico tratado em pH 7,0 da linhagem de *Streptomyces* sp. (L26). A linhagem de *Actinomadura* sp. (L175) apresentou atividade para os extratos acetoetílico e benzênico com halos de inibição de 14 mm e 15mm em pH 7,0, respectivamente, e halos de 14,5mm e 18mm em pH9,0 para os referidos extratos.

Dos 45 extratos brutos provenientes do tratamento da biomassa, nenhum apresentou atividade antimicrobiana, evidenciando que o metabólito bioativo não é intracelular.

Análise dos Grupos Químicos dos Extratos Brutos:

Os extratos Acetoetílicos em pH 7,0 e 9,0 foram selecionados para realização da Cromatografia em Camada Delgada mesmo sem inibição de crescimento do micro-organismo teste, por sua menor toxicidade do solvente orgânico.

A análise cromatográfica mostrou a presença de flavonóides em todos os extratos obtidos em pH 7,0, entretanto os extratos brutos em pH 9,0 das linhagens de *Actinomadura* sp. (L21 e L140) e de *Streptomyces* sp. (L26) não apresentaram este grupo na cromatografia. Adicionalmente, observa-se maior quantidade de flavonóides no extrato em pH 7,0 da linhagem L175, devido a maior intensidade da cor laranja, característica deste grupo químico (Figura 3).

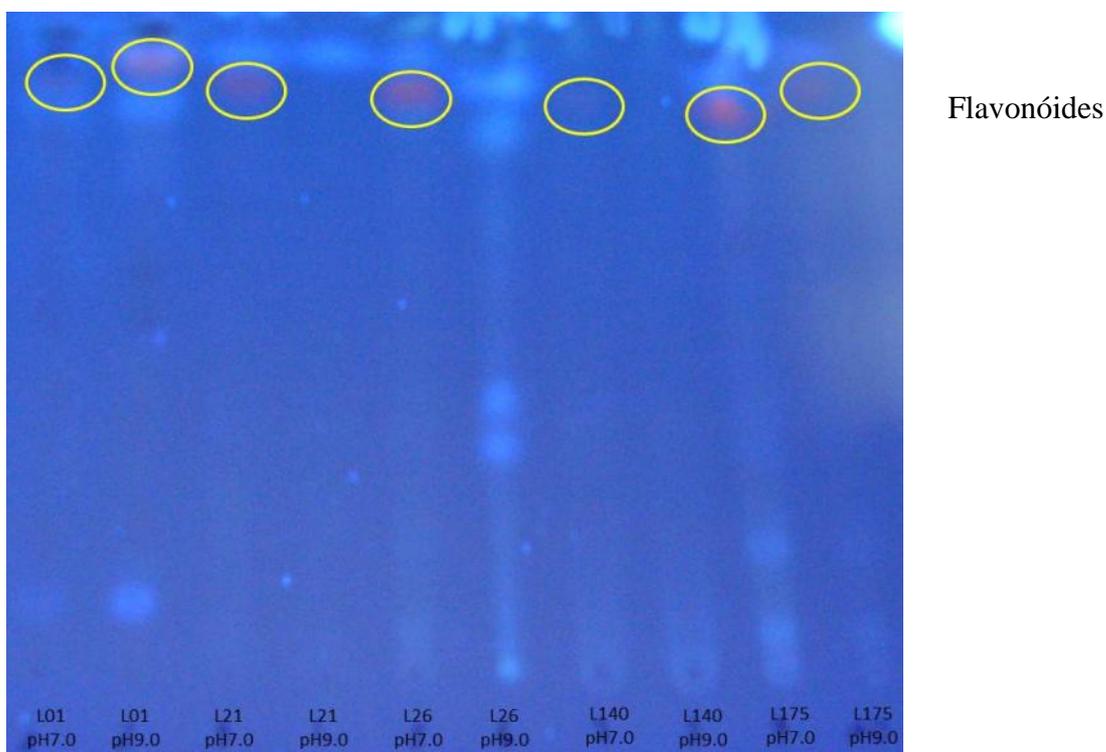


Figura 4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de flavonóides presentes nos extratos acetatoélicos de cinco linhagens de actinobactérias de *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fase móvel: Acetato de etila: Ácido fórmico:Ácido acético:Água (100:11:11:26). Revelador: reativo de Neu/UV365nm.

Na investigação de mono e sesquiterpenos, observa-se o mesmo padrão de bandas encontrados nas linhagens de *Streptomyces* sp. (L26) e de *Actinomadura* sp. (L140 e L175), com leve alteração na linhagem de *Streptomyces* sp. por apresentar uma fração com menor afinidade pela fase estacionária (Figura 4). As demais linhagens não revelaram a presença destes grupos químicos.

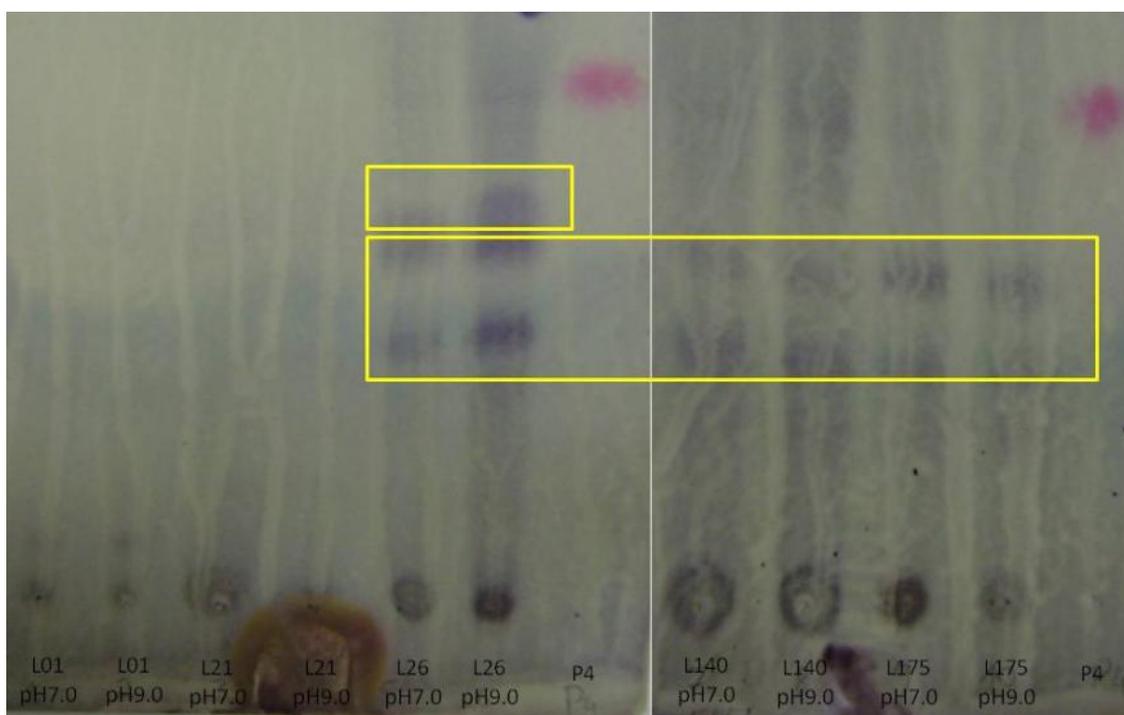


Figura 5. Frações de mono e sesquiterpenos presentes na Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de extratos acetatoéflicos de cinco linhagens isoladas de *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fase móvel: Tolueno:Acetato de etila a 3% (97:10). Revelador: Vanilina Sulfúrica.

A análise de triterpenos evidenciou a presença dos grupos β -amirina e β -sitosterol, com o mesmo padrão de frações encontrados nas linhagens de *Streptomyces* sp. (L26) e de *Actinomadura* sp. (L140 e L175) (Figura 5), como visto anteriormente na análise de mono e sesquiterpenos. As linhagens L01 e L21 não apresentaram frações correspondentes aos terpenos analisados.

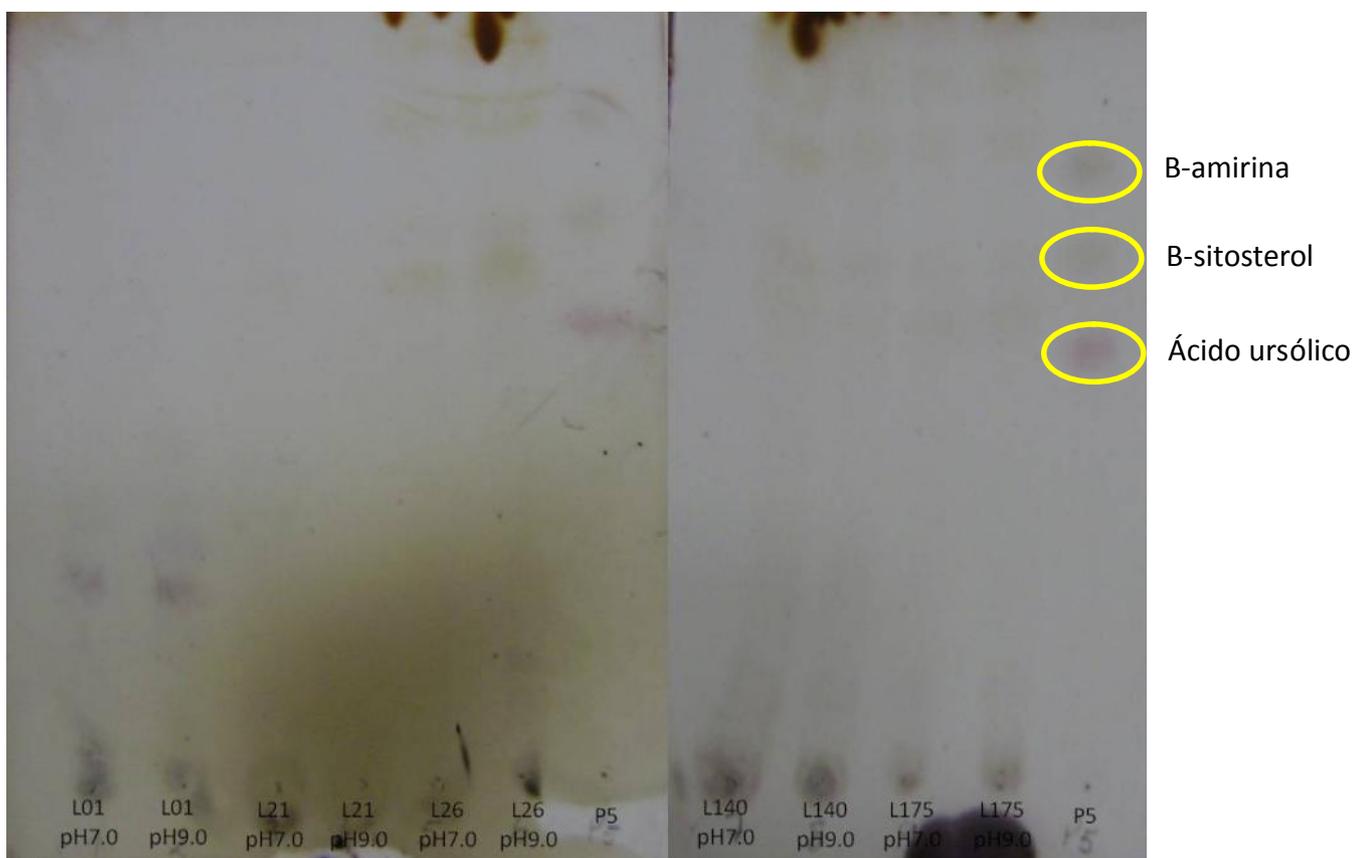


Figura 6. Triterpenos observados na Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos acetoetíflicos de cinco linhagens de actinobactérias de *Licania rigida* Benth (Oiticica). Fase móvel: Tolueno:Acetato de etila a 10% (90:10). Revelador: Lierbermann.

A investigação de alcalóides mostrou que este grupo químico não esteve presente nos extratos acetoetíflicos.

DISCUSSÃO

A Caatinga, como bioma unicamente encontrado no Brasil e área pouco explorada, torna-se alvo de investigações para elucidação de seu potencial biológico. Neste contexto as actinobactérias isoladas mostraram-se fonte de substâncias bioativas.

Trabalhos evidenciam o isolamento de actinobactérias de solos semi-áridos e desérticos como fonte de novas espécies e de novas drogas.^{13,10} Entretanto, actinobactérias dos gêneros *Amycolatopsis*, *Lechevalieria* e *Streptomyces* foram isoladas através de meios de cultura específicos.¹⁰

Tem-se destacado a importância da utilização de meios de cultura específicos para actinobactérias, combinados a técnicas de pré-tratamento das amostras para obtenção de gêneros de difícil isolamento e com alto potencial biotecnológico.²⁹

Estudos mostram que as actinobactérias são as maiores produtoras de antibióticos, onde das 10.000 espécies estimadas de actinobactérias, 2.250 produzem Streptotricina, 125 produzem Estreptomicina e 40 produzem Tetraciclina. Estima-se também que a Vancomicina seja produzida por um em cem mil actinobactérias, a Eritromicina por um em um milhão, e um novo composto, Daptomicina, seja produzido por um em dez milhões de actinobactérias.³⁰

Os resultados descritos no presente trabalho evidenciam alto potencial para inibição de bactérias Gram positivas e do fungo *Malassezia furfur* UFPEDA1320, o que contradiz estudos realizados no Himalaia, que evidenciam baixa quantidade de isolados de solo com atividade frente a bactérias Gram positivas e negativas, porém grande antagonismo a fungos filamentosos.³¹ Adicionalmente, actinobactérias isoladas do deserto egípcio e de esponjas do mar apresentam atividade frente a bactérias Gram positivas.^{15,32} Desta forma destaca-se a importância do local de coleta para o isolamento de linhagens com importância biotecnológica.

Observa-se a alta incidência do gênero *Streptomyces* com atuação antagonica contra fungo e bactéria fitopatogênicos, evidenciando o potencial industrial de seus metabólitos.³³

A composição do meio de cultura, apesar de permitir o crescimento celular, pode afetar de modo não favorável a produção de antibióticos.¹⁹ Estudos tem objetivado a otimização das condições de cultivo e composição do meio de cultura para aumento da produção de substâncias antimicrobianas.^{34,19,35}

Outro fator que influencia na produção de metabólitos antimicrobianos é o pH do meio de cultura. Thakur et al³⁶ observaram que uma linhagem de *Streptomyces* sp. teve máxima produção de antibióticos no pH 7,5. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, onde temos a produção de metabólitos bioativos em pH 5,0-7,0, decrescendo a produção com o aumento do pH.

Adicionalmente, relata-se que meios de cultura líquidos com maior quantidade de glicose em sua composição torna-se mais favorável a produção de compostos antimicrobianos.² Entretanto, observa-se, também, que a produção de antibióticos por uma linhagem de actinobactéria marinha não sofreu interferência da fonte de carbono, mas da fonte de nitrogênio.³⁷

Os grupos químicos encontrados no presente trabalho também apresentam aplicabilidade farmacêutica descritas na literatura com atividade antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante,

antiviral, larvicida, anti-inflamatório, analgésico, antiespasmódico, bem como sua aplicação na indústria alimentícia, como preservante e aromatizante e aplicabilidade na promoção de crescimento vegetal.³⁸⁻⁴⁰ Apesar de flavonóides e terpenos serem classes de compostos predominantemente de origem vegetal, trabalhos apresentam actinobactérias como fonte destes grupos.^{19,41}

Sunesson et al¹⁹ evidenciam uma alta variedade de terpenóides produzidos por uma linhagem de *Streptomyces albidoflavus* e que esses compostos tem sua produção influenciada pelas condições de cultivo.

Uma vez que a *Licania rigida* Benth tem produção comprovada de flavonóides,⁴² estudos mais aprofundados são necessários para identificar se as substâncias produzidas pelas actinobactérias são as mesmas produzidas pela planta.

O presente trabalho mostra que a microbiota do solo da Caatinga apresenta -se como fonte de moléculas bioativas. Uma vez que as actinobactérias são importantes produtoras de substâncias de importância biotecnológica, principalmente de compostos a serem usados na indústria farmacêutica evidencia-se necessidade de exploração de ambientes poucos estudados no combate de infecções bacterianas.

Adicionalmente, observou-se que o meio de cultura MPE, cuja composição apresent a grande quantidade de farinha de soja como fonte de nitrogênio e alta concentração de carbono (2%) em relação aos demais meios de cultura analisados mostrou os melhores resultados na produção de antimicrobianos.

A linhagem de *Streptomyces* sp. (L26) apresentou-se como melhor produtor de metabólitos com atividade antimicrobiana pois possui rápida produção (nas primeiras 48h de cultivo) aliada a um grande diâmetro do halo de inibição. Adicionalmente esta linhagem também apresenta -se como produtora de alcalóides e terpenos, substâncias de grande importância farmacológica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por: Capes; Renorbio; CNPq; Facepe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bérdy, J. *J. Antibiot.* **2005**, 58(1):1-26.
2. Cunha, I. G. B.; Peixoto Sobrinho, T. J. S.; Silva, R. E. A.; Amorim, E. L. C.; Araújo, J. M. *Rev. Bras. Farm.* **2009**, 90(2):120-123.
3. Cai, Y.; Xue, Q.; Chen, Z.; Zhang, R. *Journal of Sustainable Development.* **2009**, 1(2):107-110.

4. Qin, S.; Li, J.; Chen, H.H.; Zhao, G.Z.; Zhu, W.Y.; Jiang, C.L.; Xu, L.H.; Li, W.J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75(19):6176–6186.
5. Karlovsky, P. *Secondary Metabolites in Soil Ecology*; Karlovsky, P., eds, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemanha, 2008, cap.1.
6. Baltz, R. H. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, 8:557–563.
7. Li, C.; Bai, J.; Cai, Z.; Ouyang, F. *J. Biotechnol.* **2002**, 93:27–34.
8. Oldham, R. K. *Therapeutic approaches to cancer-associated immune suppression.*; Oldham, R. K.; Dillman, R. O., orgs, 5th ed. Springer.744p. 2009. cap. 6.
9. Küster, E. *Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes*, 1959. In: Shirling, E. B.; Gottlieb, D. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **1966**, 16:313-340.
10. Okoro, C. K.; Browwn, R.; Jones, A. L.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A.; Goodfellow, M.; Bull, A. T. *Antonie van Leeuwenhoek.* **2009**, 95:121–133.
11. Baltz, R. H. *Microbe.* **2007**, 2(3):125-131.
12. Roussel, S.; Sudre, B.; Reboux, G.; Waser, M.; Buchele, G.; Vacheyrou, M.; Dalphin, J. C.; Millon, L.; Braun-Fahrlander, C.; Piarroux, R. *Environmental Research*, **2011**, in press. DOI10.1016.
13. Lacy, A.; O’Kenned, R. *Current Pharmaceutical Design.* **2004**, 10:3797-3811.
14. Abdelmohsen, U. R.; Pimentel-Elardo, S. M.; Hanora, A.; Radwan, M.; Abou -El-Ela, S. H.; Ahmed, S.; Hentschel, U. *Mar. Drugs.* **2010**, 8:399-412.
15. Hozzein, W. N.; Rabie, W.; Ali, M. I. A. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, 12(10):2295-2301.
16. Paduch, R.; Kandefer-Szersze, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* **2007**, 55(5):315-327.
17. Al-Humiany, A. U. A. A. *Res J Microbiol.* **2011**, 6(4):328-342.
18. Boudjellaa, H.; Bouti, K.; Zitouni, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Sabaou, N. *Microbiological Research.* **2006**,61:288-298
19. Sunesson, A.L.; Nilsson, C.A.; Carlson, R.; Blomquist, G.; Andersson, B. *Annals of Occupational Hygiene.* **1997**,41(4):393-413
20. Castro, H. F.; Classen, A. T.; Austin, E. E.; Norby, R. J.; Schadt, C. W. *Applied and Environmental Microbiology.* **2010**, 76(4)999-1007.

21. Davies, J. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2011**,15:5-10.
22. Shirling, E. B.; Gottlieb, D. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **1966**, 16:313-340.
23. Pridham, T. G.; Anderson, P.; Foley, C.; Lindenfelser, L. A.; Hesseltine, C. W.; Benedict, R. G. 1956-57. *A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces*. In: Shirling, E. B.; Gottlieb, D. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16:313-340.
24. Ichikawa, T.; Ishikura, T.; Ozaki, A. *Folia Microbiológica*. **1971**, 16:218-224.
25. Kawamura, T.; Tago, K.; Bepeu, T.; Arima, K. *The journal of Antibiotics*. **1976**, 29(3):242-247.
26. NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*. 8th ed. NCCLS document M2-A8. Wayne, PA, 2003.
27. Wagner, H. M.; Blatt, S.; Zgainski, E. M. *Plant drug analysis*. Berlin: Springer. p 303. 1986.
28. Harbone, J. B. *Phytochemical methods*. 3th ed. London: Chapman & Hall, p.288. 1998.
29. Hayakawa, M. *Actinomycetologica*. **2008**, 22:12-19.
30. Clardy, J.; Fischbach, M.; Currie C. *Current Biology*. **2009**, 19(11):437-441.
31. Duraipandiyar, V.; Sasi, A. H.; Islam, V. I. H.; Valanarasu, M.; Ignacimuthu, S. *Journal de Mycologie Médicale*. **2010**, 20:15-20
32. Gandhimathi, R.; Arunkumar, M.; Selvin, J.; Thangavelu, T.; Sivaramakrishnan, S.; Kiran, G. S.; Shanmughapriya, S.; Natarajaseenivasan, K. *Journal de Mycologie Médicale*, **2008**, 18:16-22.
33. Cuesta, G.; García-de-la-Fuente, R.; Abad, M.; Fornes F. *Journal of Environmental Management*. **2010**, 1-5
34. Kim, M. H.; Kong, Y.J.; Baek, H.; Hyun, H. H. *J Biotechnol*. **2006**, 121:54-61.
35. le Roes, M.; Meyers, P. R. *Systematic and Applied Microbiology*. **2005**, 28:488-493.
36. Thakur, D.; Bora, T. C.; Bordoloi, G. N.; Mazumdar S. *Journal de Mycologie Médicale*, **2009**, 19:161-167.
37. Schewe, H. Pescheck, M.; Sell, D.; Schrader, J. *Developments in Food Science*. **2006**, 43:45-48.
38. Sato, S. *Produção de antibióticos*.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schidell, W. eds. Editora Edgard Blücher Ltda. vol.3. 2001.

39. Hernández-Vázquez, L.; Mangasa, S.; Palazón, J.; Navarro-Ocaña, A. *Industrial Crops and Products*. **2010**, 31:476-480.
40. Havsteen, B. H. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 96:67-202.
41. Jiang, Z.D.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(29):5065-5068
42. Araújo, L. L. S.; Silva, R. A.; Arnaud, A. F.; Santos Júnior, R. J.; Oliveira Junior, D. A. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. **2008**, 3(4)63-72

CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos confirmam que a rizosfera de *Licania rigida* Benth possui um alto potencial como fonte de actinobactérias com capacidade de produção de substâncias bioativas de interesse biotecnológico.
- O meio de cultura MC é indicado para o isolamento de actinobactérias, pois apresentou a maior quantidade de isolados. Este meio possui glicose como fonte de carbono e grande variedade de sais em sua composição.
- Dentre as linhagens isoladas, o gênero *Streptomyces* é o melhor produtor de antibióticos, seguido do gênero *Actinomadura*.
- Na seleção antimicrobiana em meio sólido, as actinobactérias possuem grande atividade antagônica frente a bactérias Gram-positivas, leveduras e fungo leveduriforme.
- *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA396 é resistente aos metabólitos produzidos por actinobactérias isoladas da rizosfera de *Licania rigida* Benth.
- No cultivo submerso, o meio de cultura MPE, que possui elevada porcentagem de carbono, é o meio com melhor produção de metabólitos antimicrobianos.
- No cultivo em meio líquido a temperatura de $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ é mais favorável a produção de metabólitos.
- O extrato acetoetílico é mais favorável a extração do metabólito antimicrobiano.
- A linhagem de *Streptomyces* sp. (L26) e as linhagens de *Actinomadura* spp. (L140 e L175) são produtores de flavonóides e terpenos nos extratos acetoetílicos em pH7,0 e pH9,0.

ANEXO I (NORMAS DA REVISTA)

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato . pdf, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3*,**1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B.; Brito, S. L.; *Resumos da 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar -se em nossa home page (<http://quimicanova.s bq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas

na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MANUSCRITOS REVISADOS – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato . pdf não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores . As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão tif/jpg, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: cdr, eps, cdx ou opj. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando,

naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editori a.

Copyright ©2010 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.



Actinobactérias de Solo da Caatinga: Isolamento e Screening Antimicrobiano

Elizianne Pereira Costa¹, Janete Magali de Araújo¹ e Ana Lúcia Figueiredo Porto²

¹Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal Recife– PE

RESUMO

A grande quantidade de infecção proporcionadas por micro-organismos resistentes, impulsiona a busca por novos antibióticos e novas fontes destas drogas. O presente trabalho objetivou isolar actinobactérias do solo da Caatinga e avaliar sua atividade antimicrobiana. Dos três meios utilizados no isolamento observou-se maior incidência no meio MC, rico em sais. Adicionalmente a temperatura de 37°C foi mais favorável ao isolamento destas bactérias em oposição a temperatura de 45°C. As actinobactérias isoladas foram analisadas quanto ao antagonismo a Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Mycobacterium smegmatis, Micrococcus luteus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Candida krusei, Candida albicans e Malassezia furfur. Dos micro-organismos testes utilizados, todos apresentaram sensibilidade a, no mínimo, um isolado, com exceção apenas para K. pneumoniae.

Palavras-chave: Actinobactérias; Isolamento; Solo da Caatinga; Atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

A rizosfera é definida como o volume de solo afetado pela presença de raízes em crescimento das plantas. (Uren, 2007). Hawkes et al (2007) em sua revisão mostram que espécies de plantas podem ser importantes em determinar a estrutura da comunidade bacteriana e fúngica da rizosfera, sendo essa microbiota influenciada pelo genótipo da planta, seu estado nutricional, presença de infecção e micorrizas.

A rizosfera é caracterizada por grandes flutuações ambientais que podem promover a elevada diversidade na comunidade microbiana da rizosfera, onde muitas dessas associações serão espécies específicas, e, portanto, cada espécie de planta vai mostrar alguma novidade em termos de diversidade microbiana (Hawkes et al, 2007, Jeffries, 2004).

O bioma Caatinga localiza-se na região do semi-árido, ocupa uma área aproximada de 826.411 km², abrangendo os 09 estados nordestinos, além da região norte do estado de Minas Gerais. Essa região abrange 60% da área do Nordeste e 13% do Brasil (Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Caatinga; Corrêa, 2010).

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos micro-organismos tornou-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vem



crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (Oliveira et al, 2006).

Nas pesquisas de novos antibióticos, tornou-se evidente que, embora micróbios sejam os principais produtores destes compostos, estes podem ser produzidos por outros organismos como: algas, líquens, plantas verdes e mesmo células animais. O setor de medicamentos anti-infecciosos apresenta três classes distintas: antibióticos, antivirais e antifúngicos, sendo que o maior em vendas é antibióticos, com um mercado de US\$25 bilhões em 2002 (Mendes et al, 2006).

Após a resistência a antibióticos, a prioridade para as próximas décadas deve ser enfatizada no desenvolvimento de novas drogas e/ou a recuperação de moléculas naturais, que permitiria o controle de doenças causadas por patógenos. Preferivelmente, estas moléculas naturais apresentam um vasto leque de ações para vários agentes patogênicos, além de ser de fácil produção, e não induzir resistência microbiana. (Marshall & Arenas, 2003).

Somente por processos de “screening” pode-se esperar antibióticos com estruturas básicas inteiramente novas, especialmente pela utilização de novos procedimentos de teste e pela investigação em novos grupos de micro-organismos. Atualmente a única alternativa para superar o problema de resistência é a descoberta de novos antibióticos (Sato, 2002).

Entre as bactérias, existem muitos grupos taxonômicos que produzem antibióticos com maior destaque para uma variedade de antibióticos produzidos por actinobactérias, especialmente o gênero *Streptomyces* (Sato, 2002). Actinobactérias são bactérias gram-positivas com alguns aspectos semelhantes aos de fungos filamentosos e ocorrem em maior frequência no solo e poeira. (Cunha, 2009; Flärdh & Buttner, 2009; Fuertes, 2004). Sato (2002) mostra que as actinobactérias são os maiores produtores de antibióticos, com 4.600 compostos produzidos, sendo o gênero *Streptomyces* o principal responsável pela produção dos antibióticos (de uso humano e veterinário) e antitumorais.

Estima-se que os 10cm superficiais de solo contêm 10^{25} - 10^{26} actinobactérias, mas cerca de 10^7 foram analisadas para produção de antibióticos nos últimos 50 anos (Baltz, 2007). Parte da dificuldade em estudar os micro-organismos provenientes do solo está em que dificilmente uma única técnica de isolamento revelará a população microbiana total de uma amostra, onde as condições de cultivo (aeração, presença/ausência de luz, temperatura, dentre outros) e os nutrientes disponíveis não atenderão a demanda fisiológica de todos os micro-organismos (Pelczar Jr. et al, 1997).

Desta forma o presente trabalho objetiva o isolamento de linhagens de actinobactérias aeróbias que cresçam em associação com a rizosfera da Oitica (*Licania rigida* Benth.) e propõe-se a analisá-las para a produção de substâncias antagonicas a patógenos humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para isolamento das actinobactérias, foi utilizada uma amostra de solo da caatinga, retirada da rizosfera de Oitica (*Licania rigida* Benth.). Os micro-organismos foram isolados a partir de 10g de solo usando o método de espalhamento em placa utilizando-se 100 μ L das diluições seriadas em solução fisiológica estéril nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . As amostras, antes de serem isoladas, sofreram um pré-tratamento consistindo de diluição de 10g da amostra em 90mL de tampão fosfato, seguido de agitação por 15-20 minutos. Após a agitação, a amostra foi aquecida em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Este pré-tratamento visou eliminar as colônias bacterianas que se espalham rapidamente e não são o alvo do isolamento.

Foram utilizados três meios de culturas com composição distintas para o isolamento



das actinobactérias. Estes meios de cultura foram: meio – MC – contendo glicose (3.0g); NaNO₃ (0.5g); K₂HPO₄ (0.3g); MgSO₄.7H₂O (0,3g); KCl (0,3g); FeSO₄.7H₂O (10mg); MnSO₄.7H₂O (1,0mg); CuSO₄.5H₂O (1,0mg); ZnSO₄.7H₂O (1,0mg); Agar (20g); água (1000ml) e pH 7,4; o meio Hickey-Tresner Agar Modificado – HT – composto de dextrina (10g); extrato de levedura (1,0g); extrato de carne (1,0g); casitone (2,0g); CaCl₂.7H₂O (0,02g); Agar (20g); água (1000mL) e pH 7,3; e o meio de cultura arginina Vitamina Ágar Modificado – AY – contendo L-arginina (0,3g); glicose (1,0g); glicerol (1,0g); K₂HPO₄ (0,3g); MgSO₄.7H₂O (0,2g); NaCl (0,3g); extrato de levedura (1,0g); FeSO₄.7H₂O (10mg); CuSO₄.5H₂O (1,0mg); MnSO₄.7H₂O (1,0mg); ZnSO₄.7H₂O (1,0mg); Agar (15g); água (1000ml) e pH 6,4. Todos os meios de cultura foram adicionados de Anfotericina B (100µg/ml) para inibição de crescimento fúngico.

O isolamento foi realizado em triplicata para cada diluição nos diferentes meios. Também foi utilizada duas temperaturas para incubação das placas, sendo estas 37°C e 45°C, para abranger um maior espectro de micro-organismos. As linhagens isoladas foram retiradas entre o terceiro e trigésimo dia de isolamento, ao fim do qual o isolamento foi interrompido.

Foi realizada a atividade antimicrobiana em meio sólido através da técnica de bloco de gelose (Ichikawa et al,1971) para avaliar a produção de metabólitos com atividade antagonica contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Malassezia furfur*. Os blocos foram feitos com um perfurador de 10mm de diâmetro e o diâmetro dos halos de inibição medidos com um paquímetro. Foi realizada uma suspensão de células de cada micro-organismo teste na escala 0,5 MacFarland e 100µl da mesma foi semeada em placas de Petri contendo os meios Agar Nutriente (AN), Brain-Heart Infusion (BHI) e Sabouraud Agar (SAB). O teste foi realizado em triplicata e com os halos obtidos para cada linhagem foi realizada média aritmética.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidas 212 linhagens provenientes do isolamento nos três meios de cultura e das duas temperaturas de incubação. Destas linhagens, 61,8% (131) foram obtidas do cultivo a 37°, enquanto os 38,2% (81) restantes foram obtidas por crescimento a 45°C (figura1A).

Ao analisar a variável meio de cultura, observou-se maior quantidade de isolados advindos do meio MC totalizando 54,2% (115) das actinobactérias encontradas. O meio de cultura com a segunda maior quantidade de isolados foi o meio AY com 28,3% (60) dos isolados, seguido do meio HT com 17,5% (37) isolados (figura1B).

Ao compararmos as variáveis meio de cultura e temperatura, observou-se que a temperatura de 37°C foi adequada para o crescimento nos meios MC e AY, entretanto, o meio HT mostrou-se adequado para o isolamento das actinobactérias a 45°C, com 62,2% (23) de seus isolados crescidos a esta temperatura (figura1C).

Com a maioria dos isolados provenientes dos meios MC, observa-se que a demanda nutricional das actinobactérias requer maior quantidade de sais, em oposição ao meio HT, rico em vitaminas e nitrogênio orgânico, onde foi apresentado o menor número de isolados.

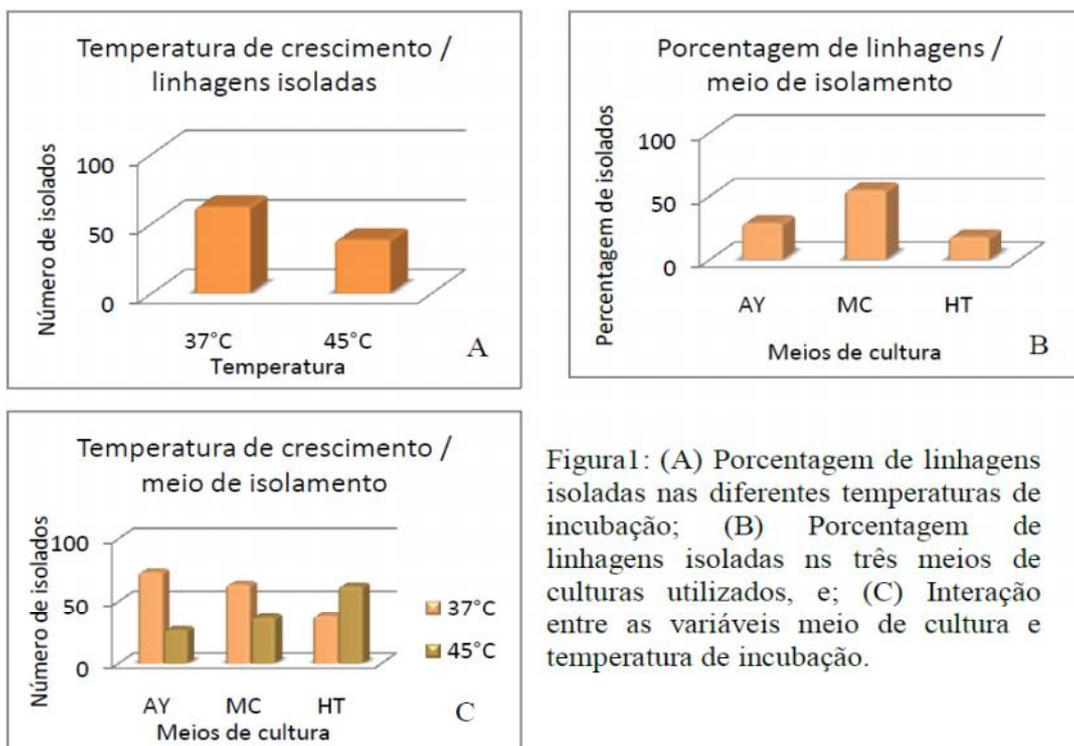


Figura 1: (A) Porcentagem de linhagens isoladas nas diferentes temperaturas de incubação; (B) Porcentagem de linhagens isoladas nos três meios de culturas utilizados, e; (C) Interação entre as variáveis meio de cultura e temperatura de incubação.

Foi avaliado o potencial antimicrobiano de 45 isolados frente a nove micro-organismos patogênicos humanos, sendo encontrados halos de inibição entre 11 e 33mm de diâmetro.

Dentre os micro-organismos teste, somente a *K. pneumoniae* apresentou-se resistente aos metabólitos produzidos pelos isolados. Os demais micro-organismos teste apresentaram, no mínimo, sensibilidade a sete isolados com atividade antimicrobiana.

Os maiores halos de inibição foram encontrados frente a *M. luteus*, com halos de inibição entre 13 e 33mm de diâmetro, apresentando 82,6% (19) dos halos igual ou acima a 20mm de diâmetro.

Observou-se uma predominância de atividade para os patógenos Gram positivos, entretanto, foi evidenciado uma alta taxa de atividade contra o fungo *M. furfur*, com atividade para 51,1% (23) dos isolados.

Os halos de inibição para os demais micro-organismos teste foram entre: 11mm e 26mm de diâmetro para o *S. aureus*; 12,3 e 31,3mm para o *M. smegmatis*; 11mm e 17,6mm de diâmetro para o *B. subtilis*; 14mm e 17,3mm para a *E. coli*; 11,3mm e 13,6mm de diâmetro para a *C. krusei*; 11,5mm e 14,3mm para a *C. albicans*, e; 14mm e 20mm de diâmetro para a *M. furfur*.

Okoro et al (2009) apresentam em seu estudo do solo do Deserto do Atacama o isolamento de linhagens do gênero *Streptomyces*, cuja análise molecular indicam ser de novas espécies. Sendo este gênero o maior produtor de antibióticos dentro das actinobactérias, há a possibilidade de haver novos produtores de antibióticos, enfatizando a necessidade de



pesquisa de diferentes habitats para descobrimento de novos micro-organismos. Adicionalmente, Boudjella et al (2006) propõem uma nova linhagem do gênero *Streptovercillium*, o qual apresenta atividade frente a bactérias Gram positivas, mas pouca atividade contra bactérias Gram negativas, corroborando os dados encontrados no presente trabalho, entretanto não houve atividade contra o fungo *C. albicans*.

Garbeva et al (2008) mostram que diferentes espécies de plantas podem influenciar a microflora da rizosfera, beneficiando o isolamento de micro-organismos com maior atividade antimicrobiana, inclusive com inibição de fitopatógenos. No mesmo estudo, evidencia-se a maior quantidade de micro-organismos em solos cultivados que em solos sem plantio. No entanto, Narendra et al (2010) mostra em seu estudo que solos com menor atividade antropogênica (terrenos baldios) apresentaram maior quantidade total de isolados de actinobactérias em comparação com solos de jardins. Esses isolados de terrenos baldios também foram responsáveis pela maioria das atividades antimicrobianas realizadas contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *Pseudomonas putida*, evidenciando que a ação humana pode afetar diretamente a microflora do solo.

Estudos realizados por Ujikawa (2003) mostram que actinobactérias apresentam uma grande variedade de antibióticos poliênicos com ação antifúngica produzidos por actinobactérias do solo com, inclusive, produção de mais de um antibiótico por linhagem isolada, referenciando o grande potencial desses organismos na indústria farmacêutica.

CONCLUSÕES

Os meios de cultura utilizados para o isolamento das actinobactérias mostraram-se eficientes, principalmente os meios com maior quantidade de sais em sua composição. Adicionalmente, observou-se que a temperatura de 37°C foi mais benéfica para o isolamento que a temperatura de 45°C.

O *screening* antimicrobiano realizado mostra potencial para produção de antibióticos contra os micro-organismos testados, exceto para a inibição de *E. coli* e *K. pneumoniae*, as quais foram as bactérias Gram negativos analisadas, os quais não tiveram resultados consideráveis.

Observa-se um grande potencial para produção de anti-fúngico contra a *M. furfur*; agente etiológico da pitiríase versicolor, mais conhecida como pano-branco, com 51,1% das linhagens analisadas com atividade antagônica contra este patógeno.

Estudos posteriores são necessários para identificação das actinobactérias isoladas, identificando se o bioma da Caatinga pode ser fonte de novas espécies microbianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baltz, R. H. (2007) Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. *Microbe* v. 2, n. 3, p. 125-131.
- Boudjella, H.; Bouti, K.; Zitouni, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Sabaou, N. (2006) Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research* n.161 p.288-298.
- Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Caatinga. *O bioma da caatinga*. Disponível em: <http://www.biosferadacaatinga.org.br/o_bioma_caatinga.php> Acesso em 27 de julho 2010.
- Corrêa, C. (2010) *Desmatamento na Caatinga já destruiu metade da vegetação original*. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=72&idConteudo=7422&idMenu=7508>> Acesso em 08 de junho 2010.



- Cunha, I. G. B. (2009) Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos pelo endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.
- Flärdh, K. e Buttner, M. J. (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews*, v.7, p. 36-50.
- Fuertes, M. A. G. (2004) *Biología: Biogénesis y microorganismos*. Pearson Prentice Hall.
- Garbeva, P.; van Elsas, J. D.; van Veen, J. A. (2008) Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil*, n. 302, p. 19-32.
- Hawkes, C. V.; DeAngelis, K. M.; Firestone, M. K. Root (2007) Interactions with soil microbial communities and process In: Cardon, Z. G.; Whitbeck, J. L. *The Rhizosphere: an ecological perspective*. Elsevier/Academic Press.
- Ichikawa, T; Ishikura, T; Ozaki, A. (1971) A improvement of kasugamycin – Producing Strain by the Agar Piece Method and Prototroph Method. *Folia Microbiológica*, n.16 p.218-224.
- Jeffries, P. (2004) Microbial Symbioses with plants In: Bull, A. T. *Microbial diversity and bioprospecting* ASM Press.
- Marshall, S. H. e Arenas G. (2003) Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.6, n. 3, p. 233-243.
- Mendes, C. D. S.; Antunes, A. M. S.; Pereira Júnior, N. (2006) Mapeamento do mercado brasileiro de antibióticos. In Antunes, A.; Pereira Júnior, N.; Ebole, M. F. *Gestão em biotecnologia*. E-papers.
- Narendra, K.; Ravi, K. S.; Mishra, S.K.; Singh, A.K.; Pachouri, U.C. (2010) Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*, v.2, n. 2, p. 12-16
- Okoro, C. K.; Brown R.; Jones, A. L.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A.; Goodfellow, M.; Bull, A. T. (2009) Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 95, p. 121-133.
- Oliveira, V. M.; Sette, L. D.; Fantinatti-Garboggini, F. (2006) Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. *MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais*, n. 7 p.1-19
- Pelczar Jr, M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. (1997) *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. v.2, Pearson Education do Brasil, Brasil.
- Sato, S. (2002) Produção de antibióticos In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schidell, W. *Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*. v.3. Editora Edgard Blücher Ltda.
- Ujikawa, K. (2003). Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39, n. 2, p. 149-158.
- Uren, N. C. (2007) Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-growth plants. In: Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-plant interface*. CRC Press.

ANEXO III: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR ACTINOBACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE *Licania rigida* Benth.

Costa, E.P. ¹, Soares, E.C.L. ², Lucio, D.F. ³, Godoy, M.F. ³, Melo, I.S. ⁴, Araújo, J.M. ¹, Porto, A.L.F. ⁵

¹ UFPE - Universidade Federal de Pernambuco-Dpt^o. de antibióticos (Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.), ² UFPE - Universidade Federal de Pernambuco-Dpt^o. de Farmácia (Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.), ³ UPE - Universidade de Pernambuco-CCB (Av. Agamenon Magalhães, s/n - Santo Amaro - Recife/PE CEP: 50.100-010), ⁴ EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Rua Antônio Falcão, 402 - Boa Viagem, Recife-PE, CEP 51020-240), ⁵ UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco-DMFA (Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brasil.)

O aumento da resistência microbiana evidencia a necessidade de descoberta de novos antimicrobianos com maior potencial de ação. As condições de cultivo afetam diretamente a produção do antimicrobiano. Desta forma, o objetivo desse estudo foi testar in vitro pelo método de difusão em disco de papel a susceptibilidade de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Mycobacterium smegmatis* e ao fungo *Malassezia furfur* aos extratos fermentados de *Streptomyces* sp. e *Actinomadura* sp em diferentes composições de meios de cultura e temperatura em cultivo submerso. Os meios de cultura utilizados foram MPE (farinha de soja 20g; Glicose 20g; CaCO₃ 2g; NaCl 5g; H₂O 1000ml), M1 (farinha de soja 10g; Glicose 10g; CaCO₃ 1g; NaCl 5g; H₂O 1000ml) e MC (Glicose 3g; NaNO₃ 0,5g; K₂HPO₄ 0,3g; MgSO₄.7H₂O 0,3g; KCl 0,3g; FeSO₄.7H₂O 10mg; MnSO₄.7H₂O 1mg; CuSO₄.5H₂O 1mg; ZnSO₄.7H₂O 1mg; H₂O 1000ml) para *Streptomyces* sp., e MPE, M1 e AY (L-arginina 0,3g; Glicose 1g; Glicerol 1g; K₂HPO₄ 0,3g; MgSO₄.7H₂O 0,2g; NaCl 0,3g; Extrato de levedura 1g; FeSO₄.7H₂O 10mg; MnSO₄.7H₂O 1mg; CuSO₄.5H₂O 1mg; ZnSO₄.7H₂O 1mg; H₂O 1000ml) para *Actinomadura* sp. As linhagens foram cultivadas em mesa agitadora a 150rpm por 96 h, a temperatura de 30°C ± 2°C e 40°C ± 2°C. Os halos de inibição foram observados a cada 24 h. Verificou-se que os extratos fermentativos de *Streptomyces* sp. nos meios de cultura M1 e MPE e nas diferentes temperaturas apresentaram atividades antimicrobiana em todas as bactérias testadas, obtendo maiores halos de inibição após 48 h em *M. smegmatis* (27,5 mm) quando cultivadas no meio MPE, a 30 °C e em *M. luteus* (26,3 mm) quando cultivadas em meio M1, a 40 °C. Para os extratos de *Actinomadura* sp., o maior halo de inibição foram obtidos frente a *M. luteus* quando cultivados no meio M1, após 72h, a 40 °C (28,5 mm). Não foram observados atividade antifúngica nos cultivos à 30°C. Os meios de cultivo que contém pouca quantidade de carbono e nitrogênio orgânico (AY e MC) tiveram pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana, evidenciando que a importância da

composição dos meios de cultura. Desta forma, evidencia-se que o fator mais importante neste experimento foi a composição dos meios de cultura utilizados e, no caso da produção de antifúngico, a temperatura limitou a produção de antibióticos pelas actinobactérias.

Palavras-chaves: Actinobactérias, Atividade antimicrobiana, Rizosfera, *Licania rigida* Benth, Caatinga nordestina