

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

**SANDRINE MARIA DE ARRUDA LIMA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELA ACTINOBACTÉRIA  
ACTMS-9H ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Paullinia cupana* Kunth.**

**RECIFE**  
**2013**

**SANDRINE MARIA DE ARRUDA LIMA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELA ACTINOBACTÉRIA  
ACTMS-9H ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Paullinia cupana* Kunth.**

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

Orientador: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva  
Co-orientador: Profa. Dra. Janete Magali de Araújo

**RECIFE  
2013**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

L732a Lima, Sandrine Maria de Arruda

Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de *Paulinia cupana* Kunth / Sandrine Maria de Arruda Lima. – Recife: O Autor, 2013.

93 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientadora: Janete Magali de Araújo

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2013.**

Inclui bibliografia e apêndices

1. Bactérias 2. Actinomycetales 3. Medicamentos - Pesquisa 4. Câncer – Tratamento I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora) II. Araújo, Janete Magali de (coorientadora) III. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-177

**SANDRINE MARIA DE ARRUDA LIMA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELA ACTINOBACTÉRIA  
ACTMS-9H ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Paullinia cupana* Kunth.**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**TITULARES**

---

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima  
Universidade Federal de Pernambuco

**SUPLENTES**

---

Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Marcia Silva do Nascimento  
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 27 de fevereiro de 2013.

"Os primeiros passos de nossas vidas são  
amparados por nossos pais... e os passos  
seguintes por seus ensinamentos."

Walter Grando

Por isso, dedico minha dissertação com  
muito amor e carinho aos meus pais,  
Adjair Severino de Lima e Sônia Maria  
de Arruda Lima.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre presente na minha vida, por me amparar, me dar forças e coragem nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Teresinha Gonçalves da Silva**, com admiração, carinho e respeito, por todas as oportunidades oferecidas desde o período da minha graduação, pela confiança, paciência, incentivo e ensinamentos que contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. **Janete Magali de Araújo**, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, pela paciência e ensinamentos.

Aos meus pais, **Adjair Severino de Lima** e **Sônia Maria de Arruda Lima**, pelo amor, apoio, investimentos e por tudo que sempre fizeram por mim em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, **Wallace Catanho de Barros**, pelo amor, dedicação, compreensão e companheirismo.

A Profa. Dra. **Gláucia Manoella de Souza Lima**, pela amizade, conversas, incentivo e sugestões de melhoria no meu trabalho.

A Profa. Dra. **Gardênia Carmen Gadelha Militão**, pela competência e ajuda nos experimentos de citotoxicidade.

A Profa. Dra. **Maria do Carmo Alves de Lima**, pela alegria e ajuda na obtenção das partições e fracionamento do meu extrato.

Ao Prof. Dr. **Haroud Sátiro Xavier**, pela atenção dada e ajuda na prospecção química dos meus extratos.

A Doutoranda, **Janaína Gonçalves da Silva Melo**, pela longa jornada de trabalho conjunto durante as fermentações e atividade antimicrobiana, pela amizade, momentos de lazer e conselhos.

As Mestrandas, **Larissa Cardoso, Maria Rodrigues e Fernanda Mota** com quem eu sempre pude contar.

Aos amigos do **Laboratório de Bioensaios e Pesquisa de Fármacos (LBPF)** pela ajuda direta e indireta nos experimentos, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos amigos do Laboratório de Coleção Microbiana e Genética de Micro-organismos, em especial a **Diego Marques, Camila Valença, Rodrigo Bernardo e Milca Lins**, por me ajudarem a descontaminar e esterilizar material, fazer meio de cultura...

Aos amigos da Pós-graduação, **Glêzia Renata, Gustavo Pardal e Darne Almeida** pelas conversas e brincadeiras, por terem caminhado junto comigo na busca de mais um grande objetivo de nossas vidas.

As técnicas **Suzete e Fátima**, pelo apoio, carinho e conversas.

Ao **Laboratório de Microscopia e Microanálise do CETENE** pela realização da análise no microscópio eletrônico de varredura.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja com uma palavra de incentivo, um sorriso ou pelo simples fato de acreditarem que eu seria capaz.

Muito obrigada!

*Sandrine Maria de Arruda Lima*

## RESUMO

Os micro-organismos, em particular as actinobactérias, são conhecidos por produzir um vasto número de metabólitos secundários bioativos de interesse farmacêutico. O objetivo deste estudo foi investigar as atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTSM-9H isolada da rizosfera de *Paullinia cupana* Kunth de Maués - Amazonas. Para identificação taxonômica da linhagem foram utilizadas as técnicas de caracterização fenotípica e molecular. A produção dos metabólitos secundários foi avaliada através da fermentação em cultivo submerso utilizando farinha de soja como substrato e em meio sólido utilizando arroz. A atividade antimicrobiana foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, a citotoxicidade através do método do MTT e a atividade hemolítica realizada frente a membrana plasmática de eritrócitos murinos. A actinobactéria foi identificada como *Streptomyces hygroscopicus* S75-5. No estudo bioguiado para a avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica o extrato metanólico da biomassa proveniente da fermentação em cultivo submerso apresentou melhor atividade, sendo escolhido para ser particionado com *n*-hexano, acetato de etila e 2-butanol. A prospecção química indicou a presença de alcalóides, açúcares redutores e saponinas nos extratos metanólico e fase butanólica. A fase butanólica apresentou atividades antimicrobiana e citotóxica, sendo fracionada. Quatro frações obtidas da fase butanólica foram analisadas por bioautografia e apresentaram pelo menos um composto com atividade frente a *Staphylococcus aureus*. A fração EB1 apontou a presença de um alcalóide ( $R_f$  0,7) com atividade antimicrobiana na bioautografia. A atividade antimicrobiana da fração EB1 mostrou valores da CMI iguais ou abaixo de 3,9  $\mu\text{g/mL}$  frente aos micro-organismos testados. Na atividade citotóxica, a fração EB1 apresentou valores da  $IC_{50}$  frente às linhagens tumorais humanas HEp-2, HT-29, NCI-H292 e HL-60, sempre menores ou iguais a doxorrubicina, utilizada como padrão, sendo mais seletividade para HL-60 com  $IC_{50}$  de 0,009  $\mu\text{g/mL}$ . Em conclusão, os metabólitos produzidos por *Streptomyces hygroscopicus* S75-5 apresentaram potentes atividades antimicrobiana e antitumoral, evidenciando a importância de estudos futuros visando o isolamento dos compostos responsáveis por esta atividade.

**Palavras-chave:** *Streptomyces hygroscopicus* S75-5, Fermentação, Prospecção química, Alcalóides e Bioautografia.

## ABSTRACT

The micro-organisms, particularly actinomycetes, are known to produce a large number of bioactive secondary metabolites of pharmaceutical interest. The aim of this study was to investigate the antimicrobial and cytotoxic activities of secondary metabolites produced by actinobacteria ACTSM-9H isolated from the rhizosphere of *Paullinia cupana* Kunth Maués - Amazonas. For taxonomic identification of lineage were used techniques for phenotypic and molecular characterization. The production of secondary metabolites was evaluated by submerged culture fermentation using soy flour as substrate and on solid medium using rice. Antimicrobial activity was determined by microdilution broth, cytotoxicity by the MTT method and hemolytic activity carried out with the plasma membrane of murine erythrocytes. The actinobacteria was identified as *Streptomyces hygroscopicus* S75-5. In bioguided study to evaluate antimicrobial and cytotoxic activities of the methanol extract obtained from the fermentation of biomass in submerged cultivation showed better activity, being chosen to be partitioned with n-hexane, ethyl acetate and 2-butanol. The chemical prospecting indicated the presence of alkaloids, saponins and reducing sugars in methanol extracts and butanol phase. The butanol phase showed antimicrobial and cytotoxic activities, being fractionated. Four fractions obtained from the butanol phase were analyzed by bioautography and had at least one compound with activity against *Staphylococcus aureus*. The fraction EB1 showed the presence of an alkaloid (Rf 0.7) with antimicrobial activity in the bioautography. The antimicrobial activity of fraction EB1 showed CMI values equal to or below 3.9 µg/mL front to micro-organisms tested. In cytotoxic activity, the fraction EB1 showed IC<sub>50</sub> values front of human tumor cell lines HEp-2, HT-29, NCI-H292 and HL-60, always less than or equal to doxorubicin, used as standard, with more selectivity for HL-60 with IC<sub>50</sub> of 0.009 µg/mL. In conclusion, the metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* S75-5 showed potent antimicrobial and antitumor activities, highlighting the importance of future studies aimed at isolating the compounds responsible for this activity.

**Keywords:** *Streptomyces hygroscopicus* S75-5, Fermentation, Chemical prospecting, Alkaloids and Bioautography.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo de vida do <i>Streptomyces coelicolor</i> .                                                                                                                                                           | 23 |
| <b>Figura 2.</b> Princípio da reação em cadeia da polimerase, que após os ciclos de amplificação são criadas múltiplas cópias da sequência a ser analisada.                                                                  | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Distribuição dos micro-organismos produtores dos metabólitos secundários bioativos.                                                                                                                         | 28 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura da Chenomicina A.                                                                                                                                                                                 | 29 |
| <b>Figura 5.</b> Estrutura do Brasilinolídeo A.                                                                                                                                                                              | 30 |
| <b>Figura 6.</b> Estrutura da Retimicina, Galtamicina B e Saquaamicina Z.                                                                                                                                                    | 31 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura da Valinomicina, Estauroporina e Butenolídeo.                                                                                                                                                     | 33 |
| <b>Figura 8.</b> Estrutura da Quinimicina A.                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Figura 9.</b> Ciclo celular com os pontos de controle.                                                                                                                                                                    | 36 |
| <b>Figura 10.</b> Fluxograma para obtenção das partições líquido-líquido com <i>n</i> -hexano, acetato de etila e 2-butanol do Extrato Metanólico da Biomassa da Actinobactéria ACTMS-9H em fermentação em cultivo submerso. | 43 |
| <b>Figura 11.</b> Fluxograma para obtenção das frações do Extrato Butanólico.                                                                                                                                                | 46 |
| <b>Figura 12.</b> Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos, partições e frações pela técnica de microdiluição.                                                                                            | 49 |
| <b>Figura 13.</b> Determinação da concentração mínima bactericida e fungicida dos extratos, partições e frações pela subcultura dos poços da microdiluição.                                                                  | 50 |
| <b>Figura 14.</b> Micromorfologia de <i>Streptomyces</i> sp. ACTMS-9H.                                                                                                                                                       | 53 |
| <b>Figura 15.</b> Cromatografia em camada delgada da parede celular de <i>Streptomyces</i> sp. ACTMS-9H.                                                                                                                     | 53 |
| <b>Figura 16.</b> Gel de agarose 1,2% mostrando a amplificação do DNA de <i>Streptomyces</i> sp. ACTMS-9H.                                                                                                                   | 56 |
| <b>Figura 17.</b> Bioautografia realizada com quatro frações, obtidas pelo fracionamento em coluna <i>flash</i> .                                                                                                            | 59 |

## TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Condições cromatográficas da prospecção química dos metabólitos secundários produzidos pela Actinobactéria ACTMS-9H.                                                                                                           | 44 |
| <b>Tabela 2.</b> Micro-organismos testes utilizados na atividade antimicrobiana.                                                                                                                                                                | 47 |
| <b>Tabela 3.</b> Características culturais da Actinobactéria ACTMS-9H em diferentes meios.                                                                                                                                                      | 52 |
| <b>Tabela 4.</b> Características bioquímicas, fisiológicas e sensibilidade aos antibióticos de <i>Streptomyces</i> sp. ACTMS-9H.                                                                                                                | 54 |
| <b>Tabela 5.</b> Prospecção química por cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários produzidos por <i>Streptomyces hygroscopicus</i> ACTMS-9H.                                                                                  | 58 |
| <b>Tabela 6.</b> Atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos a partir da fermentação em cultivo submerso e em meio sólido de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> ACTMS-9H em µg/mL.                                                      | 61 |
| <b>Tabela 7.</b> Atividade antimicrobiana das partições da fase butanólica em µg/mL.                                                                                                                                                            | 63 |
| <b>Tabela 8.</b> Atividade antimicrobiana das frações da fase butanólica em µg/mL.                                                                                                                                                              | 64 |
| <b>Tabela 9.</b> Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos, partições e frações em três linhagens tumorais testados na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.                               | 66 |
| <b>Tabela 10.</b> Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC <sub>50</sub> ) e o intervalo de confiança (IC 95%) das partições e frações em quatro linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação. | 67 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                 |                                                                                                                                 |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IBGE                            | - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                                                                               |
| BHI                             | - Brain Heart Infusion                                                                                                          |
| CDC                             | - <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro para controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América) |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | - Diclorometano                                                                                                                 |
| CHCl <sub>3</sub>               | - Clorofórmio                                                                                                                   |
| CI <sub>50</sub>                | - Concentração que inibe 50% do crescimento celular                                                                             |
| DMSO                            | - Dimetilsulfóxido                                                                                                              |
| EAcOEt                          | - Extrato acetoetílico                                                                                                          |
| EAcOEt 9H-LM                    | - Extrato acetoetílico do líquido metabólico                                                                                    |
| EbuOH                           | - Extrato butanólica                                                                                                            |
| EH <sub>2</sub> O I             | - Extrato aquoso proveniente da partição com <i>n</i> -hexano                                                                   |
| EH <sub>2</sub> O II            | - Extrato aquoso proveniente da partição com acetato de etila                                                                   |
| EH <sub>2</sub> O III           | - Extrato aquoso proveniente da partição com 2-butanol                                                                          |
| EHex                            | - Extrato hexânico                                                                                                              |
| EMeOH 9H-B                      | - Extrato metanólico da biomassa                                                                                                |
| EMeOH 9H-FS                     | - Extrato metanólico da fermentação sólida                                                                                      |
| EtOH                            | - Etanol                                                                                                                        |
| FDA                             | - <i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)                                               |
| IC                              | - Intervalo de confiança                                                                                                        |
| MH                              | - Mueller Hinton                                                                                                                |
| MRSA                            | - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina                                                                          |
| MTT                             | - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo tetrazólio                                                                   |
| PBMC                            | - <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)                                        |
| PBS                             | - <i>Phosphate Buffer Solution</i> (Solução tampão fosfato)                                                                     |
| pH                              | - Potencial hidrogeniônico                                                                                                      |
| Reagente de NEU                 | - Difenilboriloxietilamina a 1% em etanol                                                                                       |
| SAB                             | - Sabouraud                                                                                                                     |
| TTC                             | - Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio                                                                                           |
| UV                              | - Ultravioleta                                                                                                                  |
| VRSA                            | - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina                                                                         |

## SUMÁRIO

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                           | <b>15</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                            | <b>17</b> |
| 2.1. Geral .....                                                     | 17        |
| 2.2. Específicos .....                                               | 17        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                | <b>18</b> |
| 3.1. Antibióticos .....                                              | 18        |
| 3.1.1. Resistência Microbiana .....                                  | 20        |
| 3.2. Características Gerais das Actinobactérias .....                | 21        |
| 3.2.1. Identificação das Actinobactérias .....                       | 25        |
| 3.3. Atividades Biológicas dos Metabólitos das Actinobactérias ..... | 27        |
| 3.3.1. Atividade Antibacteriana .....                                | 28        |
| 3.3.2. Atividade Antifúngica .....                                   | 29        |
| 3.3.3. Atividade Citotóxica .....                                    | 30        |
| 3.3.4. Atividade Antioxidante .....                                  | 31        |
| 3.3.5. Atividade Antiviral .....                                     | 32        |
| 3.3.6. Atividade Anti-inflamatória .....                             | 32        |
| 3.3.7. Atividade Antiparasitária .....                               | 33        |
| 3.3.8. Atividade Inseticida .....                                    | 34        |
| 3.4. Câncer .....                                                    | 35        |
| 3.4.1. Tratamento do Câncer .....                                    | 37        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                  | <b>38</b> |
| 4.1. Linhagem Utilizada .....                                        | 38        |
| 4.2. Identificação da Actinobactéria .....                           | 38        |
| 4.2.1. Caracterização Cultural e Micromorfológica .....              | 38        |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.1. Estudo da Parede Celular .....                                             | 39        |
| 4.2.1. Caracterização Bioquímica e Fisiológica .....                              | 40        |
| 4.2.1. Resistência a Antibióticos .....                                           | 41        |
| 4.2.1. Caracterização Molecular .....                                             | 41        |
| 4.3. Fermentação em Cultivo Submerso .....                                        | 42        |
| 4.3.1. Extração dos Metabólitos Secundários – Biomassa e Líquido Metabólico ..... | 42        |
| 4.4. Fermentação em Meio Sólido .....                                             | 42        |
| 4.4.1. Extração dos Metabólitos Secundários do Meio Sólido .....                  | 42        |
| 4.5. Partição Líquido-Líquido .....                                               | 43        |
| 4.5.1. Prospeção Química .....                                                    | 43        |
| 4.6. Fracionamento em Cromatografia em Coluna <i>Flash</i> .....                  | 45        |
| 4.6.1. Bioautografia .....                                                        | 46        |
| 4.7. Atividade Antimicrobiana .....                                               | 47        |
| 4.7.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória .....                       | 48        |
| 4.7.1.1. Leitura da Microplaca .....                                              | 49        |
| 4.6.2. Determinação da Concentração Mínima Bactericida e Fungicida .....          | 49        |
| 4.8. Atividade Citotóxica .....                                                   | 50        |
| 4.8.2. Linhagens Cancerígenas de Humano .....                                     | 50        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                            | <b>52</b> |
| 5.1. Identificação da Actinobactéria .....                                        | 52        |
| 5.1.1. Caracterização Molecular .....                                             | 55        |
| 5.2. Fermentação e Preparação dos Extratos Brutos .....                           | 56        |
| 5.3. Obtenção das Partições e Prospeção Química .....                             | 57        |
| 5.4. Fracionamento em Cromatografia em Coluna <i>Flash</i> e Bioautografia .....  | 58        |
| 5.5. Atividade Antimicrobiana .....                                               | 60        |
| 5.6. Atividade Citotóxica .....                                                   | 65        |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                                                         | <b>70</b> |

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                          | <b>71</b> |
| <b>APÊNDICE A - Meio de Cultura Utilizado para Identificação da Actinobactéria ACTMS-9H .....</b> | <b>87</b> |
| <b>APÊNDICE B - Soluções para o Estudo da Parede Celular .....</b>                                | <b>91</b> |
| <b>APÊNDICE C - Meios de Cultura Utilizados para Fermentação da Actinobactéria ACTMS-9H .....</b> | <b>92</b> |
| <b>APÊNDICE D - Meios de Cultura Utilizados para Atividade Microbiana .....</b>                   | <b>93</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem uma fonte fundamental da diversidade química e representam um componente integrante do compêndio farmacêutico (FENICAL; JENSEN, 2006). Mais de 100 novos produtos estão em desenvolvimento clínico, especialmente como agentes anti-infecciosos e anti-câncer (HAFIDH et al., 2009), visando combater os micro-organismos resistentes a drogas e a crescente ameaça de morte causada por câncer (PERVAIZ, 2002; TALBOT et al., 2006).

A produção de compostos bioativos, como antibióticos, antitumorais, anti-inflamatórios, antivirais, antiparasitários ou imunossupressores são produzidos na sua maioria por micro-organismos, com destaque para as actinobactérias, seguida dos fungos, cianobactérias e mixobactérias (OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2011).

As actinobactérias são um dos maiores e principais Filo do domínio Bactéria, em relação ao número e variedade de espécies identificadas (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997). Este clado distinto de bactérias Gram-positivas é capaz de crescer em ambientes extremos, hostis e poluídos (BALLAV; DASTAGER; KERKAR, 2012). Mais de 50% dos metabólitos microbianos bioativos descobertos até hoje produzidos pelas actinobactérias provém do gênero *Streptomyces*, micro-organismo que mais produz metabólito bioativo explorado pela indústria farmacêutica (BUTLER, 2008; OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2011).

Pesquisas recentes mostram que *Streptomyces ramulosus* AZ-SH-29 isolado do solo do Egito produz um composto denominado vernamicina A que apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro (ATTA; HAROUN; KHALIFA, 2011). Os metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces griseorubens* isolado de sedimento marinho Chinês apresentam atividade antitumoral contra adenocarcinoma cervical humano, epidermóide oral humano e hepatocarcinoma humano (YE et al., 2009) e *Streptomyces* sp. SUC1 isolado da raiz da planta *Ficus benjamina* produz o composto denominado lansai A-D que apresenta atividade antitumoral e antifúngica (TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2008).

Devido a sua capacidade marcante de produzir metabólitos secundários úteis na indústria farmacêutica, as actinobactérias têm atraído cada vez mais a atenção de taxonomistas, ecólogos, agrônomos, químicos e biólogos evolucionários (QUIN et al., 2011).

A Amazônia é reconhecida como um dos principais ambientes ricos em biodiversidade genética do planeta, mas esta riqueza é atribuída apenas à diversidade vegetal, algumas vezes a animal e quase nunca a de micro-organismos (ZILLI; VIEIRA; NECHET, 2007). Segundo Azevedo et al. (2000) quando ocorrem estudos sobre a diversidade de micro-organismos, esses são destinados a plantas medicinais e ao seu solo. Há poucos estudos sobre a ecologia microbiana de plantas com outro interesse e as atividades biológicas que seus metabólitos secundários podem apresentar.

A *Paullinia cupana* (Kunth) variedade *sorbilis* [(Mart.) Ducke] é uma planta nativa da região Amazônica e popularmente conhecida como guaraná (ÂNGELO et al., 2008). As sementes representam o interesse pelo guaranazeiro, utilizadas na indústria de bebidas carbonatadas e, indústrias de beneficiamento, extração e fabricação de xaropes para bebidas (KURI, 2008). O cultivo do guaraná é exclusivamente brasileiro, e os estados do Amazonas e Bahia possuem a maior área plantada do fruto nas suas respectivas regiões (IBGE, 2010).

Neste contexto, o interesse da pesquisa em investigar as atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTSM-9H isolada da rizosfera do Guaranazeiro de Maués - Amazonas é justificado por ela ter sido isolada de um nicho ecológico nunca estudado e pelo potencial que as actinobactérias apresentam em produzir metabólitos antimicrobianos e antitumorais úteis para aplicação na medicina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar as atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTSM-9H isolada da rizosfera de *Paullinia cupana* (Kunth) variedade sorbilis [(Mart.) Ducke] de Maués - Amazonas.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Identificar a actinobactéria em nível de gênero e espécie, através das técnicas clássica e molecular;
- Extrair os metabólitos secundários da fermentação submersa e sólida;
- Particionar o extrato bruto com melhor atividade, além de determinar as classes de compostos dos extratos e partições selecionadas;
- Fracionar a partição com melhor atividade por cromatografia em coluna *flash*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos, partições e frações, através da determinação da concentração mínima inibitória;
- Avaliar o potencial citotóxico dos extratos, partições e frações em células de linhagens cancerígenas humanas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Antibióticos

Atualmente os antibióticos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos. Quando causam a morte das bactérias são chamados bactericidas e, quando promovem a inibição do crescimento microbiano, bacteriostáticos (CHAMBERGS, 2003; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O termo antibiose foi proposto por Vuillemin em 1889 para definir o antagonismo entre seres vivos, processo natural de seleção onde um ser vivo destrói outro para assegurar a sua sobrevivência. Isso é conhecido desde o surgimento da era bacteriana, em que certos germes não cresciam na presença de outros, conforme assinalado por Pasteur e Joubert em 1877, nas suas experiências com o bacilo do antrax (RIBEIRO; PINTO; PEDROSA, 2009). O termo antibiótico foi proposto por Waksman em 1942 e utilizado para definir substâncias produzidas por seres vivos microscópicos, capazes de agir em pequenas concentrações sobre micro-organismos patogênicos (CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009; TAVARES, 2001).

A possibilidade de micro-organismos, como bactérias, serem causadores de processos infecciosos começou a ser levantada no século XIX e cientistas como Robert Koch identificaram micro-organismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifóide. Nessa época, as pesquisas eram conduzidas na busca de agentes químicos que apresentassem atividade antimicrobiana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Em 1910, o pesquisador Paul Ehrlich no seu laboratório juntamente com o químico Alfred Bertheim e bacteriologista Sahachiro Hata desenvolveram o primeiro antibiótico de origem sintética, o salvarsan, medicamento usado contra sífilis, doença sexualmente transmissível, endêmica e quase incurável na época, causada pela bactéria *Treponema pallidum* (AMINOV, 2010).

Gerhard Domagk em 1935 descobriu que o corante vermelho prontossil sintetizado por Josef Klarer e Mietzsch Fritz apresentava atividade antibacteriana *in vivo* contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus*. O prontossil é um pró-farmaco que originou uma nova classe de antibióticos sintéticos, as sulfas ou sulfonamidas, e constituiu a primeira classe de agentes efetivos contra infecções

sistêmicas. Atualmente, as sulfas - sulfadiazina, sulfatiazol, sulfaguanidina e sulfamerazina - são pouco usadas e apresentam espectro de ação limitado (AMINOV, 2010; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; TAVARES, 2001).

Mesmo com esses avanços, o marco da quimioterapia microbiana ocorreu em 1929 com a descoberta da penicilina pelo biólogo Alexander Fleming, observando em placa de cultura que o fungo *Penicillium notatum* produzia substância capaz de controlar a proliferação bacteriana de *Staphylococcus aureus*. Nessa época sua descoberta não foi valorizada, apenas em 1941 foi utilizada no tratamento de infecções quando Florey e Chain deram continuidade aos estudos. A atividade desse composto era superior à das sulfas, antimicrobiano utilizado nesta época. Fleming foi um dos primeiros que alertou sobre o potencial de resistência à penicilina se for consumida em quantidade muito pequena ou durante um período muito curto do tratamento. Com sua descoberta, motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos a partir de culturas de micro-organismos, especialmente fungos e actinobactérias (AMINOV, 2010; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; SAGA; YAMAGUCHI, 2009; SYKES, 2001; TAVARES, 2001).

O professor Selman Waksman, da Universidade Rutgers, inspirado em Fleming junto com outros cientistas conseguiram isolar muitos antibióticos novos a partir das actinobactérias. Em 1940, Waksman e Woodruff descobriram as actinomicinas, um membro deste grupo é a actinomicina D que foi usada para combater o tumor de Wilms em crianças (DEMAIN, 2006).

O primeiro antibiótico descoberto a partir de *Streptomyces* foi a estreptomicina em 1944, com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora da tuberculose e, desde esse tempo muito esforço tem sido feito na triagem de antibióticos a partir desse gênero (CHAMBERGS, 2003; CWALA; IGBINOSA; OKOH, 2011).

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

Praticamente todas as classes de antibióticos usadas terapeuticamente até hoje foram descobertas entre as décadas de 1940-1950, conhecida como a “Era de Ouro dos Antibióticos” e proveniente da triagem de produtos naturais microbianos (BÉRDY, 2005). A maioria deles, entre os anos 1940-1960, eram eficazes no tratamento de bactérias Gram-positivas:  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos

(estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina). Nesse período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetoprim e metronidazol (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A descoberta de novas estirpes de *Streptomyces* tem diminuído ao longo dos anos, e com isso a probabilidade da descoberta de um novo antibiótico também (CWALA; IGBINOSA; OKOH, 2011). O número de medicamentos novos colocados no mercado está diminuindo (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Desde 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, por exemplo, foi introduzido no mercado farmacêutico apenas a linezolida, um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

### 3.1.1. Resistência Microbiana

Frequentemente utilizados para melhorar uma infecção específica, os antibióticos usados em situações terapêuticas não indicadas causa um elevado aumento no aparecimento de bactérias resistentes provocando uma redução da eficácia dos mesmos, aumento da necessidade de consultas médicas, exames complementares de diagnóstico, prescrição de medicamentos adicionais e até internação hospitalar (RIBEIRO; PINTO; PEDROSA, 2009).

O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um problema importante no tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos (VIMAL; RAJAN; KANNABIRAN, 2009). Atualmente, as doenças infecciosas são uma das principais causas de morte no mundo, representando 25% de todas as mortes (13,3 milhões). Segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, cerca de 2 milhões de infecções resistentes à drogas são relatadas a cada ano, ocasionando aumento de custos para o sistema de saúde (34 bilhões de dólares por ano) (MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012).

O estudo da resistência bacteriana geralmente é baseado em micro-organismos de importância epidemiológica, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos infecciosos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos (ANTUNES et al., 2006). Por exemplo, *S. aureus* resistente à

metecilina (também conhecido como MRSA - Methicillin-resistant *S. aureus*) é uma bactéria muito propagada em ambientes hospitalares que se tornou resistente a vários antibióticos e devido a sua resistência crescente é chamada de super-bactéria (CCD, 2011). Infecções causadas por MRSA estão associados com uma taxa de mortalidade de 15-60% (HEMACHANDRAN, 2011). De acordo com o centro para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC), infecções causadas por *Staphylococcus* ocasiona mais óbito nos EUA do que a AIDS (MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012).

A evolução da resistência aos antibióticos por importantes patógenos humanos tornou os antibióticos originais (penicilina, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina) e a maioria dos seus sucessores ineficazes (CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009).

### 3.2. Características Gerais das Actinobactérias

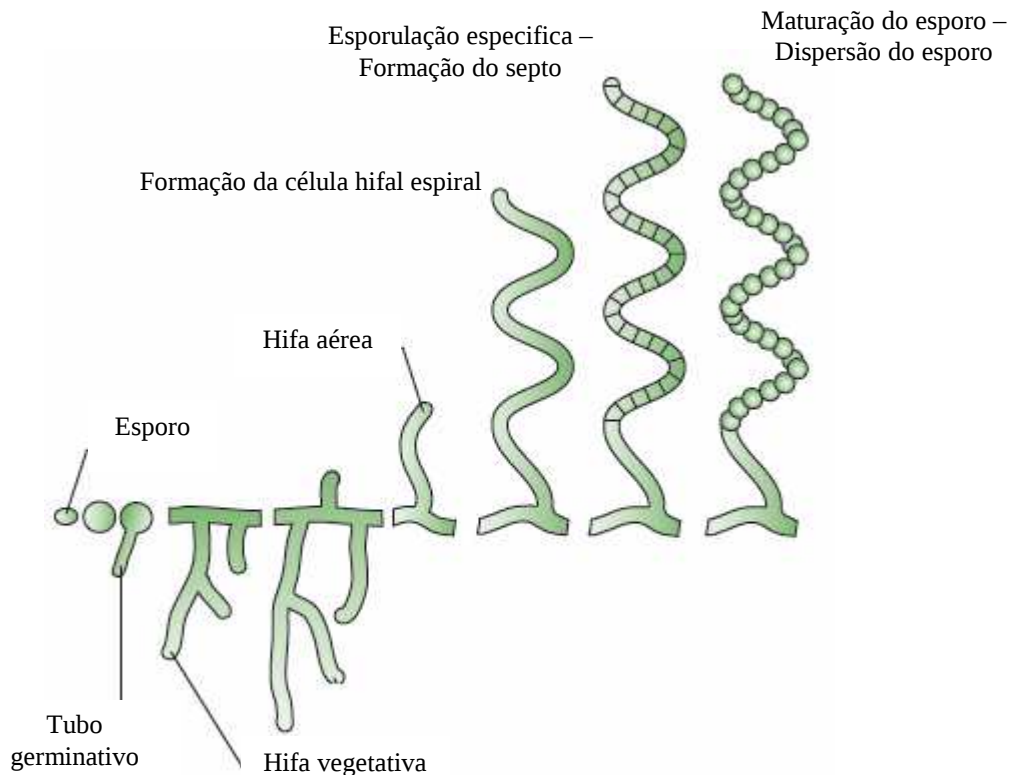
As actinobactérias, também denominadas actinomicetos, foram originalmente consideradas um grupo intermediário entre bactérias e fungos, mas agora são reconhecidas como organismos procarióticos (OGUNMWONYI, 2008). São bactérias Gram-positivas apresentando parede celular formada pelos isômeros do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP), ácido diamino lisina, ácido diamino ornitina ou ácido diaminobutírico (ANDERSON; WELLINGTON, 2001; LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967). Diferem das outras bactérias por crescerem lentamente (ARAÚJO, 1998) e por seus diversos gêneros produzirem um grande número de metabólitos com interesse científico desde décadas passadas (BALLAV; DASTAGER; KERKAR, 2012).

Taxonomicamente, as actinobactérias são classificadas dentro da classe Actinobacteria, representada por 6 ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies, onde os gêneros mais conhecidos são: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004; LACAZ et al., 2002). Segundo Ventura et al. (2007), as actinobactérias são caracterizadas por apresentarem um alto conteúdo de G+C (guanina + citosina) no seu DNA, onde *Corynebacterium* apresenta 51% desse par de bases nitrogenadas no seu genoma, enquanto *Frankia* e *Streptomyces* mais de 70%. O genoma do patogênico *Tropheryma whipplei* é uma exceção, com menos de 50%.

O crescimento das actinobactérias é caracterizado pela formação de hifas ramificadas que dão origem a um micélio típico, que é unicelular durante a fase inicial de crescimento. O micélio vegetativo se desenvolve no interior do substrato, sendo responsável pela sustentação e adsorção de nutrientes, que ocorre através da liberação de enzimas extracelulares que degradam compostos utilizados na sua alimentação. Enquanto, o micélio aéreo se projeta na superfície do substrato, com aparência aveludada constituindo o micélio reprodutivo que se diferencia para formar os corpos de frutificação ou propágulos (CHATER, 2006; MAHAJAN; BALACHANDRAN 2012; PEREIRA, 2010).

Em *Streptomyces*, o crescimento se inicia com a germinação do esporo, quando este encontra condições favoráveis de temperatura e nutrientes, formando o tubo germinativo que cresce por extensão da ponta dando origem a hifa vegetativa, esta se ramifica formando o micélio vegetativo. Em resposta a diminuição de nutrientes e outros sinais ocorrem o crescimento da hifa aérea que quebra a tensão superficial, escapando do ambiente aquoso onde se encontra o micélio vegetativo. Essa hifa do micélio aéreo se diferencia originando a cadeia de esporos que é desencadeada com a formação simultânea de septos na hifa aérea. A liberação de esporos fecha um ciclo de crescimento, chamado polarizado devido ao fato das duas hifas (vegetativa e aérea) emergirem de um esporo (Figura 1) (FLARDH; BUTTNER, 2009; LANCINI; LORENZETTI, 1993; SHINICH et al., 1997).

A formação de esporos em alguns gêneros das actinobactérias podem variar de zoósporos móveis a propágulos especializados (GAO; GUPTA, 2005). São produzidos em grande número onde cada um tem potencial germinativo, crescendo um novo organismo (PELCZAR et al., 1997). Em *Streptomyces* é característico artrósporos; *Thermoactinomyces*, endósporos; *Micromonospora*, aleuriósporos; *Actinoplanaceae*, *Geodermatophilus*, *Kitasatoa* e *Oerskovia*, zoósporos móveis (ENSING, 1978). A maioria dos gêneros se reproduz pela formação de esporos, esporangiósporos ou conidiósporos. *Nocardia*, por exemplo, se reproduz por fragmentação das hifas (FLARD; BUTTNER, 2009). Os esporos contribuem para a preservação da espécie, mesmos não resistindo ao calor, resistem às dessecações, ajudando as espécies a sobreviverem no período da estiagem (VENTURA et al., 2007).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *Streptomyces coelicolor* (adaptado de FLARDH; BUTTNER, 2009; CHATER; MERRICK, 1979).

A produção dos metabólitos secundários pelas actinobactérias no meio sólido ocorre durante o crescimento do micélio aéreo, onde as colônias presentes nesse micélio são capazes de produzir pigmentos que podem ser excretados no meio (CHATER; HORINOUCI, 2003; BIBB, 2005). Geralmente em condições laboratoriais, dependendo do meio de cultura utilizado, *Streptomyces* apresenta um bom desenvolvimento do micélio aéreo, enquanto *Nocardia* o micélio aéreo pode ser completamente ausente ou constituído por poucos e curtos filamentos (MAHAJAN; BALACHANDRAN 2012). Os metabólitos secundários são substâncias essenciais para crescimento, desenvolvimento e reprodução dos micro-organismos, produzidos no final da fase exponencial do ciclo de crescimento e provenientes dos metabólitos primários envolvidos na produção de biomassa e geração de energia (DEMAIN, 1992).

A maioria das espécies das actinobactérias é aeróbia, podendo ser facultativa, microaerófila ou anaeróbia obrigatória (KENNEDY et al, 1999; LACAZ et al, 2002). Na maioria das vezes são mesófilas (22 °C a 37 °C) e crescem em pH neutro (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983), porém existem actinobactérias termofílicas, halófilas e acidófilas (ALBRECHT; KAMPFER, 2000; RAMÍREZ; SERRANO;

SANDORVAL, 2006; ZAKALYUKINA; ZENOVA; ZVYAGINTSEV, 2002). Apresentam um metabolismo variável, podem ser autotrófica, heterotrófica ou quimiotrófica, o que possibilita a utilização de muitas fontes de energia (KENNEDY, 1999). A morfologia das actinobactérias varia conforme o gênero, por exemplo, em *Arthrobacter* e *Rhodococcus* forma de cocobacilo; *Micrococcus*, cocóide; *Nocardia*, fragmentação de hifas e *Streptomyces*, altamente diferenciadas em micélio ramificado (LETEK et al., 2012).

Dentro do grupo das actinobactérias ocorrem gêneros com diferentes habitats, habitantes do solo (*Streptomyces* spp.); comensais da planta (*Leifsonia* spp.); fixadores de nitrogênio simbioses (*Frankia* spp.); presentes no trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.); e alguns patógenos de animais, plantas e humanos, com destaque as espécies de interesse médico como: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Nocardia asteroides*, *Tropheryma whipplei*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Propionibacterium acnes*, os agentes causadores da tuberculose, hanseníase, nocardiose (infecção pulmonar grave em pacientes imunodeficientes), doença de Whipplei, difteria e acne, respectivamente (LETEK et al., 2012; VENTURA et al., 2007).

As actinobactérias apresentam várias propriedades fisiológicas, como a produção de numerosas enzimas extracelulares de interesse industrial, por exemplo, amilases, lignases, lipases, pectinases, quitinases e xilanases; além de milhares de produtos metabólicos, muitos desses antibióticos, como cloranfenicol, estreptomicina, eritromicina, neomicina, nistatina e tetraciclinas; agentes antitumorais; aminoácidos e vitaminas (PETROVA; VLAHOV, 2006; SEMEDO et al., 2004; SIVARAMKRISHNA; MAHAJAN, 2009; VENTURA et al., 2007). Outras atividades benéficas das actinobactérias estão relacionadas com a agricultura e silvicultura devido sua atividade como agentes no controle biológico regulando doenças fúngicas (ATLAS, 2004).

Encontramos as actinobactérias em uma diversidade de habitats, que incluem plantas, isolada principalmente de folhas e raízes (ZHAO et al., 2011), solo (MEHRAVAR, SARDARIL, OWLIA, 2010), rizosfera (VASCONCELLOS et al., 2010), areia de praia (SUZUKI; NAGALI; SUZUKI, 1994), deserto (NOROVSUREN et al., 2007), mangue (YU et al., 2010), pasto (LEE e HWANG, 2002), insetos (KALTENPOTH et al., 2005), sistemas marinhos (REYMA; VIJAYAKUMAR, 2008), organismos marinhos (ZHENG et al., 2000) e geleira (REDDY et al., 2009).

O solo é o habitat mais comum dessas bactérias filamentosas, sendo abundante na rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes da planta onde ocorre uma grande diversidade de micro-organismos, especialmente o gênero *Streptomyces* (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001) que estimula a produção de fitohormônio, participa dos ciclos biogeoquímicos e contribui para fertilidade do solo através da remoção de toxinas (CARDOSO; FREITAS, 1992). Acredita-se que ocorram  $10^6$  -  $10^9$  esporos de actinobactéria por grama de solo (GONZÁLEZ et al., 2005).

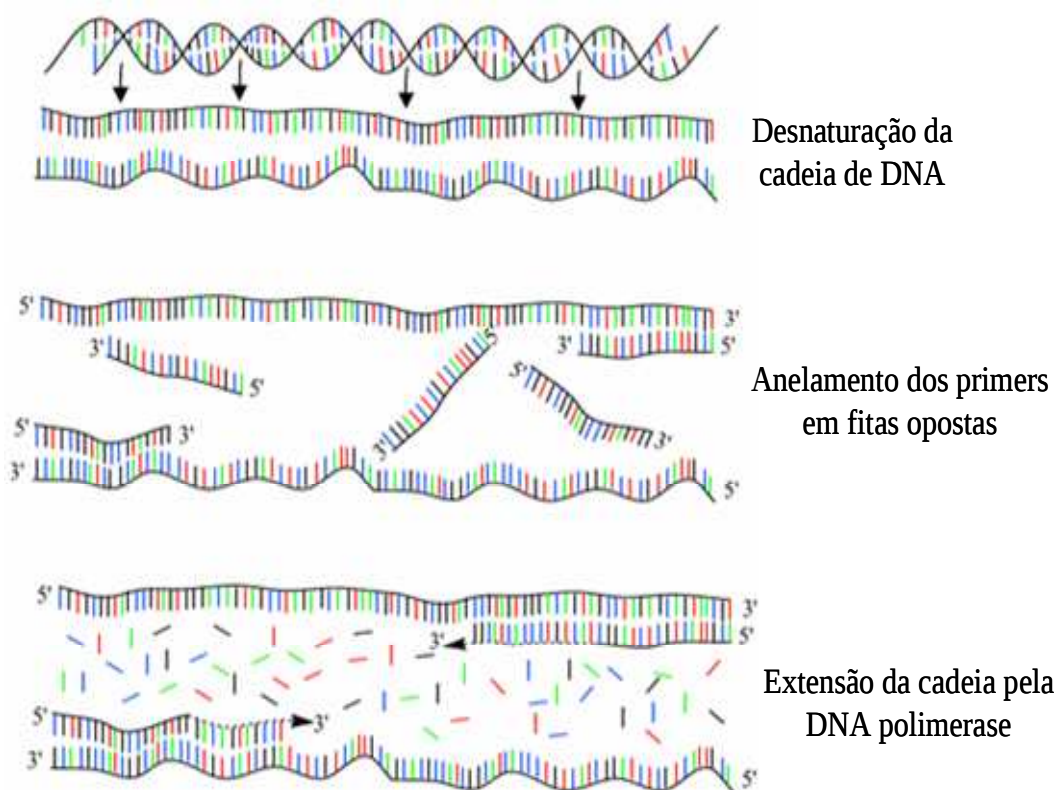
### 3.2.1. Identificação das Actinobactérias

Na identificação das actinobactérias são observadas características morfológicas, como a cor do micélio e a produção de esporos (LECHEVALIER, 1989). Quando as actinobactérias formam esporos observa-se tipo, número e arranjo da cadeia desses esporos, em *Micromonospora* e *Thermomonospora*, os esporos são reunidos; em *Microbispora*, em pares longitudinais; *Streptomyces*, esporos em cadeia espiral, retas ou verticiladas; em *Actinoplanes* e *Streptosporangio*, esporos dentro de um esporângio. O uso do microscópio eletrônico traz algumas informações adicionais sobre a superfície dos esporos, se é lisa, enrugada, espinhosa ou felpuda (BULL, 2004; OLIVEIRA, 2003).

A composição da parede celular pode ser utilizada para diferenciar alguns gêneros de actinobactérias (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997), assim como os resultados de provas bioquímicas e fisiológicas onde é avaliada a utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, resistência a antibióticos, produção de enzimas extracelulares e testes de crescimento em diferentes concentrações de sais, temperatura e pH (WILLIAMS et al., 1983). Essas análises geralmente levam a caracterização das actinobactérias até o nível de gênero, em alguns casos pode ocorrer a identificação da espécie (LECHEVALIER, 1989).

Técnicas baseadas em biologia molecular representam uma forma mais rápida e precisa no processo de identificação das actinobactérias (COOK; MEYERS, 2003). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica com muitas aplicações em Ciências Biológicas, definida como um método *in vitro* que amplifica o material genético, a partir de uma pequena quantidade de ácido nucléico obtendo-se, dentro de poucas horas, uma grande quantidade de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definida (MULLIS; FALOONA, 1987; MULLIS, 1990). Para isso

acontecer, primers (oligonucleotídeos iniciadores) se hibridizam com fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado e ciclos repetitivos de desnaturação do DNA, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e extensão pela DNA polimerase acontecem (Figura 2) (RODRIGUES, 2006).



**Figura 2.** Princípio da reação em cadeia da polimerase, que após os ciclos de amplificação são criadas múltiplas cópias da sequência a ser analisada (adaptado de VIERSTRAETE, 1999).

A combinação da técnica de PCR com o sequenciamento de ácidos nucleicos vem promovendo a identificação de muitas espécies de micro-organismos e suas relações filogenéticas (DEVEREUX; HINES; STAHL, 1996). Atualmente, a análise da sequência do gene 16S do DNAr vem sendo utilizada com sucesso na identificação de *Streptomyces*. Yan et al. (2011) identificaram actinobactérias dominantes na rizosfera de cultivo contínuo com amendoim - como *Streptomyces violaceoruber*, *S. flaveus*, *S. panaciterrae*, *S. achromogenes*, *S. pseudogriseolus*, *S. cellulosa* e *S. aureus* - utilizando as sequências do gene 16S do DNAr. Uma actinobactéria isolada do sedimento marinho chinês foi identificada como *Streptomyces griseorubens* utilizando a técnica de PCR para amplificar a região 16S do DNAr com os oligonucleotídeos 5-27f e 1542-1522r (YE et al., 2009).

### 3.3. Atividades Biológicas de Metabólitos das Actinobactérias

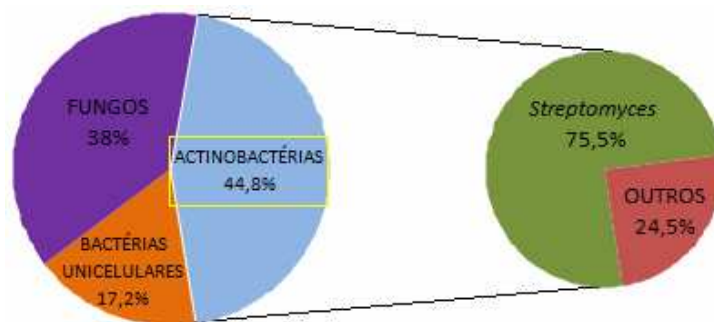
Desde tempos imemoriais, os produtos naturais são utilizados no tratamento e prevenção de doenças humanas (BAKER et al., 2007) e são provenientes de várias fontes, como exemplo, plantas, micro-organismos, organismos marinhos, animais vertebrados e invertebrados (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000, 2003). Baseado em observações empíricas e folclóricas, os extratos de produtos naturais foram os primeiros, e por um longo período de tempo, os únicos medicamentos disponíveis para a humanidade (GANESAN, 2008). A natureza age como um reservatório de novas e potenciais moléculas bioativas para serem descobertas e utilizadas na terapêutica (KAVITHA et al., 2010).

Uma revisão de Newman e Cragg (2007) apresentou uma lista de todos os fármacos desenvolvidos e aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) entre os anos de 1981 a 2006 e concluiu que um significativo número desses fármacos são produtos naturais produzidos por micro-organismos ou pela interação dele com o local em que foi isolado. Os extratos microbianos representam uma fonte valiosa de diversas moléculas, onde muitos esforços na descoberta dessas moléculas têm levado ao isolamento de várias drogas importantes (CLARDY, 2007).

Segundo Selvameenal; Radhakrishnan; Balagurunatha (2009) dos 22.500 metabólitos secundários bioativos extraídos a partir de micro-organismos cerca de 16.500 compostos mostram atividades antibióticas. Deste total de metabólitos bioativos, 10.100 (44,8%) são produzidos por actinobactérias dos quais 7.630 são provenientes de *Streptomyces* e 2.470 provenientes de outros grupos de actinobactérias, enquanto 8550 (38%) são compostos bioativos produzidos por fungos e 3850 (17,2%) por bactérias unicelulares (DEMAIN; SANCHEZ, 2009) (Figura 3). Esses metabólitos têm um grande efeito sobre a nutrição, saúde e economia da nossa sociedade. Muitas vezes apresentam estruturas pouco comuns e sua formação é regulada por nutrientes, taxa de crescimento, controle de feedback, enzimas de inativação e indução (BIBB, 2005; DEMAIN, 1998).

Os compostos bioativos podem ser trazidos para o uso de três diferentes formas: a molécula bioativa é produzida diretamente por fermentação; o produto de fermentação é usado como material de partida para a modificação química subsequente (derivatização); ou ainda, a molécula é utilizada como composto “lead” para a síntese química. A composição química dos compostos bioativos de origem microbiana é

muitas vezes complexa, incluindo diversidades estereoquímicas que em muitos casos, torna difícil a síntese química (THOMAS et al., 2011).



**Figura 3.** Distribuição dos micro-organismos produtores dos metabólitos secundários bioativos (adaptado de DEMAINE e SANCHEZ, 2009, SELVAMEENAL; RADHAKRISHNAN; BALAGURUNATHA, 2009).

A extração a partir de fontes naturais apresenta algumas desvantagens, como a variação sazonal e possíveis problemas ecológicos envolvidos com a extração, pondo em risco a obtenção de tais compostos (BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009). O uso de técnicas biotecnológicas, como a manipulação de genes dos micro-organismos, surgem como alternativas promissoras na resolução deste problema (BORGES et al., 2009).

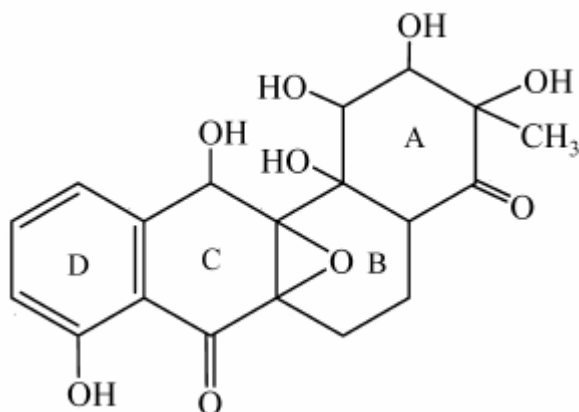
Alguns exemplos de produtos naturais obtidos a partir de actinobactérias e seu potencial nas arenas farmacêuticas e agroquímicas são:

### 3.3.1. Atividade Antibacteriana

Um antibiótico glicopeptídeo, isolado a partir da fermentação de *Actinomadura* A40926, além de inibir bactérias Gram-positivas foi muito ativo contra isolados clínicos de *Neisseria gonorrhoeae*. Sua atividade foi semelhante a outros glicopeptídeos, como a vancomicina e teicoplanina (GOLDSTEIN et al., 1987).

Outra substância com atividade antibacteriana, parcialmente purificada P3-1, foi obtida a partir de *Streptomyces* sp. N°87. Essa substância mostrou atividade contra diversas espécies de agentes patogênicos, incluindo bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e Gram-negativas, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* e *Xanthomonas* sp (CHAROENSOPHARA et al., 2008).

Chenomicina A, um novo antibiótico anguciclinone, com atividade contra *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium* foi extraído a partir do caldo da cultura de *Nocardia mediterranei* subsp. *kanglensis* 1747-64. A estrutura química (Figura 4) foi determinada depois de uma análise espectroscópica detalhada (SUN et al., 2007).



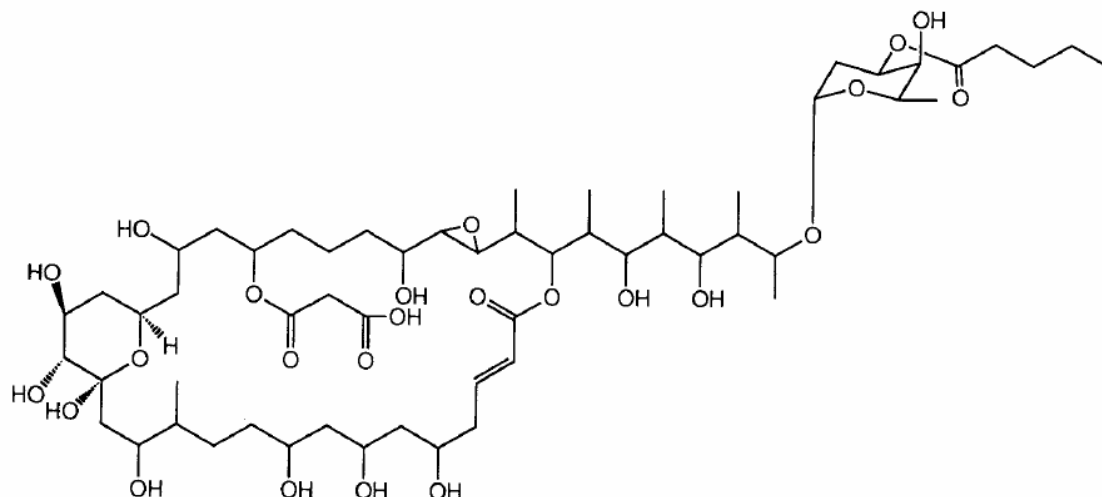
**Figura 4.** Estrutura da Chenomicina A (SUN et al., 2007).

### 3.3.2. Atividade Antifúngica

Metabólitos extraídos com éter de petróleo da cepa *Nocardiopsis* sp. VITSVK5 (FJ973467) apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. fumigatus* e *A. flavus*. Os metabólitos extraídos com clorofórmio foram mais ativos para *Candida krusei*, *C. tropicalis* e *C. albicans* (VIMAL; RAJAN; KANNABIRAN, 2009).

Recentemente, metabólitos provenientes de *Streptomyces* spp. (Sp-1 e Sp-2) isolados de solos paraibanos também apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e *T. inkin* (OLIVEIRA et al., 2010).

Um macrolídeo de 32 membros, chamado brasilinolídeo A (Figura 5) foi isolado a partir do caldo de fermentação de *Nocardia brasiliensis* IFM0406 e apresentou atividade contra *Aspergillus niger* (TANAKA et al., 1997). Outro antibiótico macrolídeo, oligomicina A, isolado a partir de *Streptomyces libani* apresentou atividade contra fungos patogênicos de plantas, como *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum* e *C. lagenarium*. Sua eficácia foi semelhante ao metalaxil clorotalonil e tricloclazol (KIM; MOON; HWANG, 1999).



**Figura 5.** Estrutura do Brasilinolídeo A (TANAKA et al., 1997).

### 3.3.3. Atividade Citotóxica

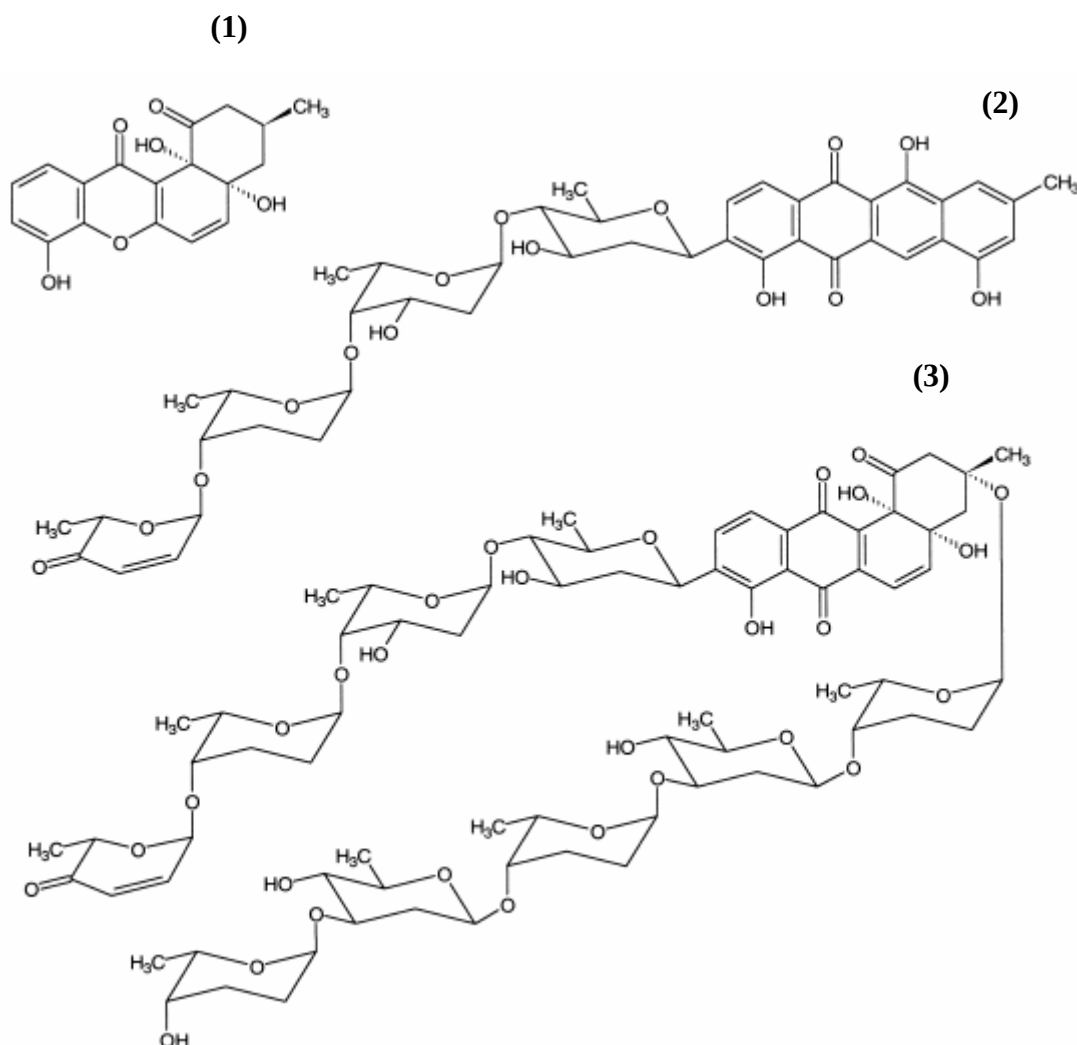
O antibiótico anguciclinone, chemomicina A, extraído do caldo da cultura de *Nocardia mediterranei* subsp. *kanglensis* 1747-64, além da atividade bacteriana apresenta citotoxicidade contra linhagens de células de tumores humano como HCT-116 (câncer colorretal) e YES-2 (carcinoma de esôfago) (SUN et al., 2007).

Victomicina (XK 49-1-B-2) é um antibiótico isolado a partir de *Streptosporangium violáceo* subsp. *chromogenes* que pertencente ao grupo de antibióticos fleomicina-bleomicina com atividade antibacteriana e antitumoral (KAWAMOTO et al., 1975).

Sete novos macrolídeos, designados pladienolídeos, foram extraídos a partir da fermentação de *Streptomyces plutensis* MER-11107. Seis destes novos macrolídeos apresentaram atividade inibidora contra a linhagem humana U251 (glioblastoma multiforme - tumor maligno mais comum do Sistema Nervoso Central) (SAKAI et al., 2004). Igualmente, Shaaban et al. (2011) isolaram oito novos compostos denominados landomicina P-W, juntamente com outros 10 anguciclinone conhecidos, a partir da fermentação de *Streptomyces cyanogenus* S-136. Todos os compostos apresentaram atividade em linhagens de câncer mama (MCF7 e MDA MB-231)

Compostos denominados retimicina, galtamicina B e saquaamicina Z (Figura 6) foram isolados a partir da estirpe *Micromonospora* TU6368 e mostraram efeitos citostáticos para várias linhagens de células tumorais humanas, como HMO2 (adenocarcinoma gástrico), MCF-7 (carcinoma da mama) e HepG2 (carcinoma

hepatocelular). O composto saquaamicina Z também se mostrou ativo contra bactérias Gram-positivas (ANTAL et al., 2005).



**Figura 6.** Estrutura da Retimicina (1), Galtamicina B (2) e Saquaamicina Z (3) (ANTAL et al., 2005).

### 3.3.4. Atividade Antioxidante

Pesquisas realizadas por WU et al. (2009) com 150 actinobactérias endofíticas isoladas de três plantas medicinais, *Annona squamosa*, *Camptotheca acuminado* e *Taxus chinensis*, mostraram que 10,7% dessas actinobactérias apresentaram além da atividade citotóxica, atividade antioxidante.

Os metabólitos de duas espécies de *Streptomyces* isolados do solo de colinas da costa oeste da Índia foram extraídos com butanol e avaliados utilizando os ensaios de

radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e  $\text{Fe}^{+3}$  reduzido. Os extratos mostraram atividade antioxidante dose-dependente (KEKUDA; SHOBHA; ONKARAPPA, 2010).

O extrato acetoetílico também de *Streptomyces* sp. isolado da rizosfera da planta medicinal chinesa, *Rhizoma curcumae* Longae, apresentou atividade antioxidante contra os radicais livres DPPH e ABTS [ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] (ZHONG et al., 2011).

### 3.3.5. Atividade Antiviral

Um antibiótico poliéter denominado SF2487 foi isolado de *Actinomadura* sp. SF2487 apresentando fraca atividade contra bactérias Gram-positivas e exibindo atividade antiviral *in vitro* contra o vírus influenza (HATSU et al., 1990).

O sobrenadante da cultura, extratos e frações da estirpe 606 isolada de um solo tropical Brasileiro e classificada como *Streptomyces* sp. apresentaram atividade antimicrobiana, onde a fração metanólica apresentou elevada atividade antiviral contra o vírus herpes simplex 1 (HSV-1) em células HEp-2 em concentração não citotóxica (SACRAMENTO et al., 2004).

Um estudo determinou a eficácia de 20 isolados de actinobactérias marinhas contra o vírus que causa a doença da mancha branca em camarões peneídeos. Essas actinobactérias foram disponibilizadas como aditivos alimentares para as pós-larvas do camarão-tigre-preto (*Penaeus monodon*) onde seis isolados mostraram-se candidatos potenciais para estudo posterior (KUMAR; PHILIP; ACHUTHAKUTTY, 2006).

### 3.3.6. Atividade Anti-inflamatória

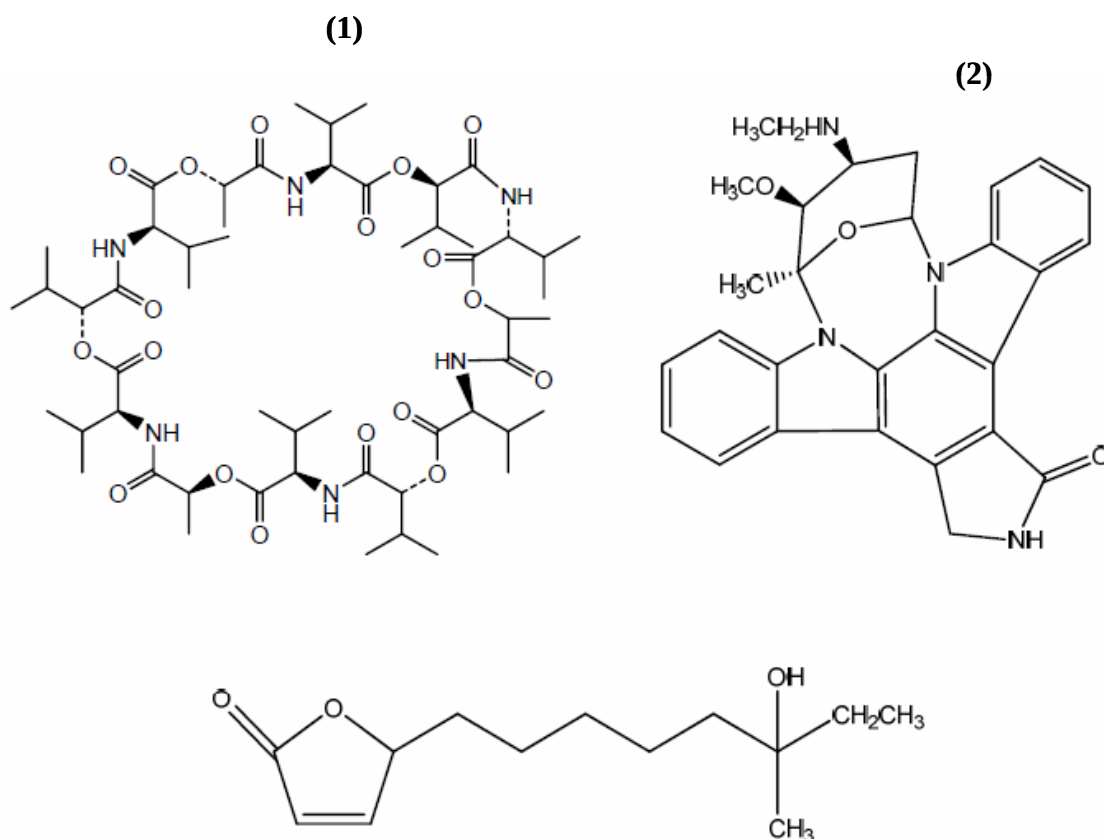
Os sobrenadantes de várias culturas das actinobactérias isoladas do solo foram extraídas com acetato de etila e esses extratos testados *in vivo* utilizando o ensaio edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e ácido araquidônico em ratos. O extrato com melhor atividade antiedematogênica foi proveniente de *Streptomyces* sp. MT 2705-4, quando fracionado esse extrato resultou no isolamento da dianemicina, um composto poliéter com potente atividade anti-inflamatória (LEE et al., 1997).

A ação anti-inflamatória *in vitro* dos compostos 5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina e 5,7-dimetoxi-4-p-metóxi-fenilcumarina produzidos por *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 foi investigada sobre a formação de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2

(PGE2), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-6 e IL-1 $\beta$ ), e também em óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em macrófagos murino (células RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). Os dados obtidos mostraram o efeito inibitório dose-dependente (TAECHOWISAN et al., 2007).

### 3.3.7. Atividade Antiparasitária

*Streptomyces* sp. isolado de esponjas do Mediterrâneo produziu metabólitos secundários com atividade antiprotzoária. O estudo biomonitorado levou ao isolamento e purificação de três compostos conhecidos (Figura 7), a valinomicina, a estaurosporina e o butenolídeo, que apresentaram novas atividades contra *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei brucei*. Este foi o primeiro relato do isolamento da valinomicina a partir de uma fonte marinha (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010).



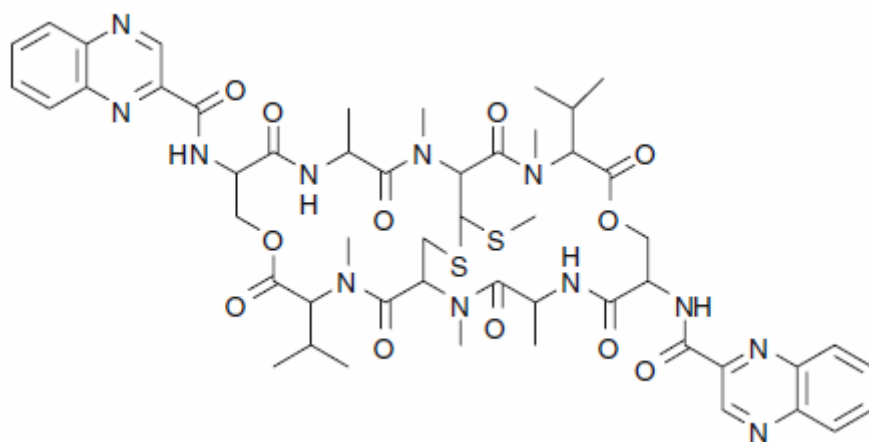
**Figura 7.** Estrutura da Valinomicina (1), Estaurosporina (2) e Butenolídeo (3) (PIMENTEL-ELARDO et al, 2010).

A ivermectina produzida pelo *Streptomyces avermectinius* descoberto no Japão no início dos anos 1970 apresentou posteriormente novas atividades, como anti-

helmíntica e antiprotozoária frente a agentes causadores da malária (KITA; SHIOMI; OMURA, 2007) e o *Streptoverticillium albireticuli* isolado do solo de um campo na Austrália apresentou forte atividade nematicida contra *Caenorhabditis elegans* (PARK et al., 2002).

### 3.3.8. Atividade Inseticida

O extrato acetatoetílico obtido a partir da cultura de *Streptomyces* sp. KN-0647 apresentou inibição do crescimento de insetos patogênicos, como *Spodoptera exigua*, *Dendrolimus punctatus*, *Plutella xylostella*, *Aphis glycines* e *Culex pipiens*. O composto ativo foi isolado e identificado como quinomicina A (Figura 8). Este foi o primeiro relato sobre a atividade inseticida do antibiótico quinomicina A (LIU et al., 2008).



**Figura 8.** Estrutura da Quinomicina A (LIU et al, 2008).

*Actinoplanes philippinensis*, *A. missouriensis* e *Streptomyces clavuligerus* foram isolados do solo dos Emirados Árabes Unidos e selecionados por produzirem grande quantidade da enzima quitinases. A atividade quitinolítica dos três isolados foi testada contra o inseto *Drosophila melanogaster*, conhecido como moscas-das-frutas. O gênero *Actinoplanes* mostrou a mais baixa percentagem de formação das pupas (GADELHAK; EL-TARABILY; AL-KAABI, 2005).

Foram isoladas 27 actinobactérias do solo do deserto de diferentes regiões do Egito e testadas para produção de agentes inseticidas contra as larvas no terceiro estágio do mosquito *Culex pipiens*. Metabólitos de sete isolados causaram 100% de mortalidade e foram identificados como *Streptomyces fungicidicus*, *S. griseus*, *S. albus*, *S. rochei*, *S.*

*violaceus*, *S. alboflavus* e *S. griseofuscus* (EL-KHAWAGH; HAMADAH; EL-SHEIKH, 2011).

### 3.4. Câncer

O termo câncer é usado para designar um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos normais. Por se multiplicarem rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, formando tumores malignos que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, através do sangue e sistema linfático formando metástases (INCA, 2012; ROBBINS; COTRAN, 2005).

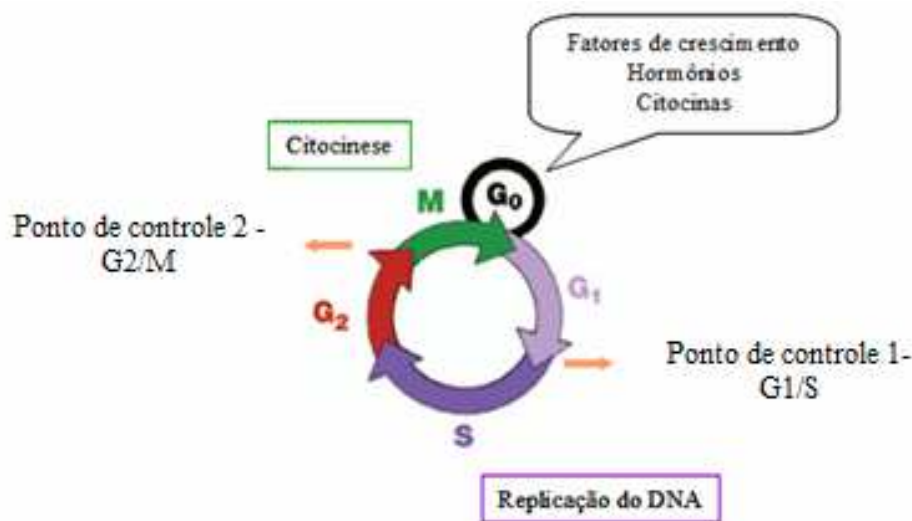
As células cancerosas diferem das células normais pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo. Suas principais características são a auto-suficiência em sinais de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão da morte celular programada (apoptose); potencial de replicação ilimitado; capacidade para desenvolver novos vasos sanguíneos (angiogênese); invasão tecidual; capacidade de migração (metástase) e inflamação (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; MANTOVANI, 2009).

Durante o ciclo celular a progressão da célula de uma fase para outra é estritamente regulada. Defeitos nos pontos de checagem durante a transcrição das fases G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M (Figura 9) podem levar a um acúmulo de anormalidades do DNA e subseqüentes perturbações patológicas. A ativação do ponto de checagem permite o reparo da lesão detectada. Se o reparo não for possível, o ciclo celular é interrompido induzindo a morte celular. Mutações nesses pontos são evidenciadas em muitos tipos de câncer (BELIZÁRIO, 2002; FISCHER; GLOVER; LANE, 2004; FOSTER, 2008).

O crescimento descontrolado do câncer é devido a ativação de proto-oncogenes em oncogenes e inativação dos genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes responsáveis pelo controle positivo da divisão e diferenciação celular, como *c-Myc*, *c-Fos* e *c-Ras*; enquanto, os genes supressores de tumor são genes envolvidos no controle negativo do ciclo e na regulação da apoptose, como p53, Rb, p19, p21, p27, Bcl-2 e Bax (BELIZÁRIO 2002; WANG; SUN, 2010).

O p53, nomeado guardião do genoma, exerce um papel essencial na regulação do ciclo celular, controlando o estado do DNA antes que a célula entre na fase S. Uma das funções mais importantes desse gene é a sua capacidade para induzir a morte celular

por apoptose. A interrupção desta rota promove a progressão do tumor e resistência à quimioterapia (ALENZI; LOTFY; WYSE, 2010; WEINBERG, 2008).



**Figura 9.** Ciclo celular com os pontos de controle (adaptado ALMEIDA et al., 2005).

O câncer atualmente constitui um problema de saúde pública dada sua crescente importância como causa de morbidade e mortalidade. Estima-se que, para o ano de 2020, o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões em todo o mundo, e cerca de 60% desses ocorrerão nos países emergentes (SEIXAS; KESSLER; FRISON, 2010). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino e, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (INCA, 2012).

As causas do câncer podem ser encontradas no meio ambiente, que se refere aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade, ou podem ser hereditárias. A predisposição genética na maioria dos cânceres está associada com os carcinógenos ambientais que incluem os agentes químicos (produtos naturais ou produtos químicos sintéticos), físicos (radiação) e biológicos (vírus). Muitos cânceres são causados por uma dieta incorreta, consumo de álcool e uso de cigarros (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2012; REDDY et al., 2003).

### 3.4.1. Tratamento do Câncer

Os principais métodos terapêuticos para o tratamento das neoplasias malignas são cirurgia, radioterapia e quimioterapia, recentemente outras modalidades terapêuticas tem se tornado usual, como a hormonioterapia. O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, porém, na maioria dos casos, é necessária a associação de mais de um tipo de tratamento (ANIBOU et al., 2008; KATZUNG, 2003; SEIXAS; KESSLER; FRISON, 2010).

A remoção cirúrgica completa do tumor não é tipicamente conseguida devido à natureza infiltrante desses tumores, enquanto a radiação mata a maioria das células tumorais, porém a recorrência rápida destes tumores sugere a presença no interior do tumor primário de uma subpopulação de células intrinsecamente resistentes à terapia, capaz de sobreviver e crescer (SCHECK et al., 2006). A cirurgia e a radioterapia costumam ser efetivas no tratamento de tumores sólidos, mas no tratamento de tumores disseminados atuam como paliativo (BAXEVANIS; PEREZ; PAPAMICHAIL, 2009).

A quimioterapia é um procedimento que visa, através da administração de drogas, impedir a multiplicação das células tumorais, levando-as à morte. O problema é a alta toxicidade apresentada pelos agentes quimioterápicos (BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004, INCA, 2012; SOUZA et al., 2007). Os agentes citotóxicos, por exemplo, são considerados antiproliferativos porque afetam apenas uma das características das células cancerosas, o processo de divisão celular. Não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou o poder metastático. Como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, esses agentes afetam todos os tecidos normais que se dividem rapidamente, produzindo os conhecidos efeitos colaterais de uma quimioterapia (neurotoxicidade, nefrotoxicidade, neuropatia periférica e citopenia) (BRUCE, 1993; BERNARDI; JACQUES-SILVA; LENZ, 2003). Além da toxicidade, a resistência das células aos fármacos também constitui um problema na quimioterapia (KATZUNG, 2003; KUMAR et al., 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Linhagem Utilizada

A actinobactéria ACTSM-9H foi isolada da rizosfera do guaranazeiro [*Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] do município de Maués - Amazona (latitude 03°23'01" sul e longitude 57°43'07" oeste, com altitude de 25 metros acima do nível do mar) em uma diluição do solo de  $10^4$  no meio Arginina - Levedura - Ágar (ALA) a 30 °C por Silva (2010).

### 4.2. Identificação da Actinobactéria

Para identificação taxonômica da actinobactéria foi utilizada a caracterização molecular através do sequenciamento do gene 16S do DNAr e algumas características como cultural, micromorfológica, bioquímica, fisiológica, estudo da parede celular e resistência aos antibióticos.

#### 4.2.1. Caracterização Cultural e Micromorfológica

A caracterização cultural da linhagem como crescimento, cor do micélio aéreo, cor do micélio no substrato e difusão de pigmento no meio foram estudadas no meio ALA, Triptona - Extrato de Levedura - Ágar (ISP-1), Extrato de Malte - Extrato de Levedura - Ágar (ISP-2), Farinha de aveia - Ágar (ISP-3), Sais inorgânicos - Amido - Ágar (ISP-4), Glicerol - Asparagina - Ágar (ISP-5), Peptona - Extrato de ferro - Ágar (ISP-6) e Tirosina - Ágar (ISP-7) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966), sendo os meios ISP-6 e ISP-7 utilizados para avaliar a produção de pigmentos melanóides. O experimento foi realizado em triplicata.

Para a caracterização micromorfológica, a cepa foi cultivada em placa de Petri com meio ISP-2 onde foram inseridas lamínulas, em posição inclinada, para o crescimento do micélio aéreo sobre sua superfície e incubado por 21 dias a 30 °C (KERN; BLEWINS, 1999; WILLIAMS et al., 1989). As lamínulas foram retiradas e fixadas em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 12 h a 4 °C, depois lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 10 min e pós-fixadas, por 1 h, em uma solução contendo tetróxido de ósmio e

cacodilato de sódio 0,1 M na proporção 1:1 (v/v). Após o período de pós-fixação, as lamínulas foram lavadas três vezes com água miliq por 10 min e desidratada em série crescente de acetona (30% - 5 min; 50% - 5 min; 70% 15 min; 100% - 1 h). Para finalizar o processamento a amostra foi para o ponto crítico e depois metalizada com ouro. No microscópio eletrônico de varredura foi visualizado o tipo da cadeia de esporo e a característica de sua superfície.

#### 4.2.2. Estudo da Parede Celular

A cepa foi cultivada em meio ISP-2 líquido sob agitação por 72 h (200 rpm 30 °C). A massa celular obtida foi separada do líquido metabólico por centrifugação a 3.000 rpm durante 3 min e seca em estufa por 2 h a 50 °C. Em seguida, foram transferidos 30 mg da massa seca para frasco de penicilina, no qual foi adicionado 1 mL de solução HCl 6 N e levado para estufa por 16 h a 100 °C para a hidrólise da parede celular. O material insolúvel foi removido utilizando um eppendorf furado contendo lâ de vidro e lavado com 1 mL de água destilada. O filtrado foi transferido para balão de fundo redondo e concentrado em rotaevaporador para a retirada de todo o ácido remanescente. O material livre do ácido foi retomado em 100 µL de água destilada, transferido para eppendorf e armazenado em freezer até a realização da corrida em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (STANECK; ROBERTS, 1974).

A CCD do hidrolisado da parede celular foi realizada para a identificação dos isômeros do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP) presente na parede celular das actinobactérias. A fase móvel foi composta por metanol-água-ácido clorídrico 6 N-piridina (80:26:4:10, v/v) e a fase fixa por placas de celulose (Merck n° 5716 20x20). Na fase fixa foram aplicadas 2 µL do padrão do ácido diaminopimélico (DAP) a 0,19% p/v, 2 µL da amostra e 2 µL dos padrões *Streptomyces regensis* (UFPEDA 3053) e *Nocardia asteroides* (UFPEDA 3503), representando os isômeros LL-DAP e Meso-DAP, respectivamente. A cuba foi previamente saturada por 2 h e a corrida ocorreu por aproximadamente 5 h. Quando o “front” do solvente atingiu o topo da placa, a mesma foi retirada e deixada secar na capela de exaustão. A placa seca foi revelada borrifando uma solução de ninhidrina a 0,2% p/v em butanol saturado com água e em seguida aquecida por 5 min a 100 °C para a visualização dos isômeros de DAP (LL-DAP e Meso-DAP).

#### 4.2.3. Caracterização Bioquímica e Fisiológica

A caracterização bioquímica foi realizada através dos ensaios de utilização de fontes de carbono e nitrogênio, enquanto a caracterização fisiológica através da capacidade da cepa de crescer em diferentes concentrações de NaCl, temperaturas e pH (NONOMURA, 1974; SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

As fontes de carbono testadas foram: D-frutose, D-galactose, D-manose, D-melezitose, D-xilose, lactose, L-arabinose, L-ramnose, maltose, manitol, raffinose, sacarose e trealose. O meio de cultura para utilização da fonte de carbono consistia de Ágar Basal de Sais Minerais e foi autoclavado durante 10 min a 105 °C. A semeadura da cepa foi realizada na forma de estria e as placas incubadas por 15 dias a 30 °C. Após esse período foi analisada a utilização ou não da fonte de carbono, comparando o crescimento da bactéria na placa que continha a fonte de carbono a ser testada, com a que continha Glicose como fonte de carbono (controle positivo) e outra sem nenhuma fonte de carbono (controle negativo).

Com relação a capacidade da bactéria em utilizar várias fontes de nitrogênio, as fontes testadas foram: arginina, cisteína, fenilalanina, histidina, L-metionina, serina, treonina e valina e o meio para utilização dessas fontes foi autoclavado durante 15 min a 121 °C. Da mesma forma que para as fontes de carbono, três sistemas foram preparados, meio basal com a fonte de nitrogênio a ser testada, meio basal suplementado com 0,1% de L-asparagina ou prolina (controle positivo) e somente o meio basal (controle negativo). Nos sistemas utilizou-se como indicador de pH o azul de bromotimol a 0,3%, que possibilita uma melhor análise, observando não haver alteração da cor do meio quando a cepa utiliza a fonte de nitrogênio testada comparado com o controle positivo, diferente do controle negativo no qual ocorria alteração da cor do meio.

O crescimento da cepa em diferentes concentrações de NaCl foi testada semeando-a em 7 mL de meio *Brain Heart Infusion* líquido (BHI) contendo NaCl nas concentrações 2, 5, 7, 9, 12%. Após 14 dias de incubação a 30 °C foram considerados positivos os tubos que apresentaram crescimento. Foi avaliado o crescimento da bactéria no meio ISP-2 sólido incubada por 14 dias em diferentes temperaturas (30, 37 e 45 °C) e em diferentes pH (5, 6, 7, 8, e 9) para determinar a temperatura e pH ótimo. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.2.4. Resistência aos Antibióticos

Uma suspensão da linhagem foi inoculada em placa de Petri contendo meio ISP-2. Sobre o meio inoculado foram colocados os discos de antibióticos: amicacina 30 mcg, ampicilina 10 mcg, amoxicilina 10 mcg, cefotaxina 30 mcg, ciprofloxacina 5 mcg, cloranfenicol 30 mcg, eritromicina 15 mcg, estreptomicina 10 mcg, imipenem 10 mcg, norfloxacinina 10 mcg, oxacilina 1 mcg, penicilina G 10 U, rifampicina 5 mcg, tetraciclina 30 mcg e vancomicina 30 mcg. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C. O experimento foi realizado em triplicata e o diâmetro dos halos expressos pela média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.2.5. Caracterização Molecular

A cepa foi cultivada em meio ISP-2 líquido sob agitação por 16 h (200 rpm 30 °C) e depois 1 mL dessa cultura centrifugada por 5 min a 12.000 rpm. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. A eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x corado com Sybr Safe foi adotado para avaliar a integridade do DNA. O gel foi visualizado através do transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

O gene 16S do DNAr foi amplificado a partir do DNA genômico por PCR, utilizando os oligonucleotídeos universais para Eubacteria 27f (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') e 1492r (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3') (WEISBURG et al., 1991) em volume final de 25  $\mu$ L contendo 50 ng de DNA, 0,2  $\mu$ M de cada dNTP, 3  $\mu$ M de  $MgCl_2$ , 5 pmols de cada oligonucleotídeo, 1,5 U/ $\mu$ L de Taq-polimerase, tampão da enzima 1x e 11,75  $\mu$ L de água mili-q estéril. A reação em cadeia de polimerase foi conduzida em termociclador programado para realizar desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94 °C / 1 min, 52 °C / 30 seg e 72 °C / 2 min, respectivamente) e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 min. Após a amplificação, 5  $\mu$ L da reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1x corado com Sybr Safe a 3 volts/cm<sup>-1</sup> para visualizar um fragmento de aproximadamente 1350 pares de base. O produto da amplificação foi purificado e seqüenciado pela empresa Macrogen (Suel, Córrea do Sul). A seqüência de genes foi comparada com todas as seqüências depositadas no banco de dados do

*Genebank*, utilizando o software *Blast* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **4.3. Fermentação em Cultivo Submerso**

O pré-inóculo ocorreu em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio ISP-2 líquido com inoculação de seis blocos de gelose de 10 mm de diâmetro retirados do crescimento em forma de tapete da linhagem em ISP-2, cultivada por 14 dias a 30 °C, e submetido a agitação por 48 h (200 rpm 30 °C). Para fermentação, 50 mL do pré-inóculo foi adicionado em Fernbach de 2800 mL com 500 mL do meio líquido MPE submetido à agitação por 96 h (200 rpm 30 °C).

##### **4.3.1. Extração dos Metabólitos Secundários - Biomassa e Líquido Metabólico**

Após a fermentação, a biomassa foi separada do líquido metabólico por centrifugação a 3.000 rpm durante 3 min e subsequentemente o líquido metabólico filtrado. A biomassa foi extraída três vezes com metanol na proporção 1:2 (p/v), enquanto o líquido metabólico extraído duas vezes com acetato de etila na proporção 1:3 (v/v). As extrações ocorreram à temperatura ambiente sob agitação de 200 rpm. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C.

#### **4.4. Fermentação em Meio Sólido**

O pré-inóculo ocorreu em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio ISP-2 líquido com inoculação de 20 blocos de gelose de 10 mm de diâmetro retirados do crescimento em forma de tapete da linhagem em ISP-2, cultivada por 14 dias a 30 °C, e submetidos à agitação por 48 h (200 rpm 30 °C). Para fermentação, 10 mL do pré-inóculo foi adicionado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 g de arroz cozido incubado por 21 dias a 30 °C.

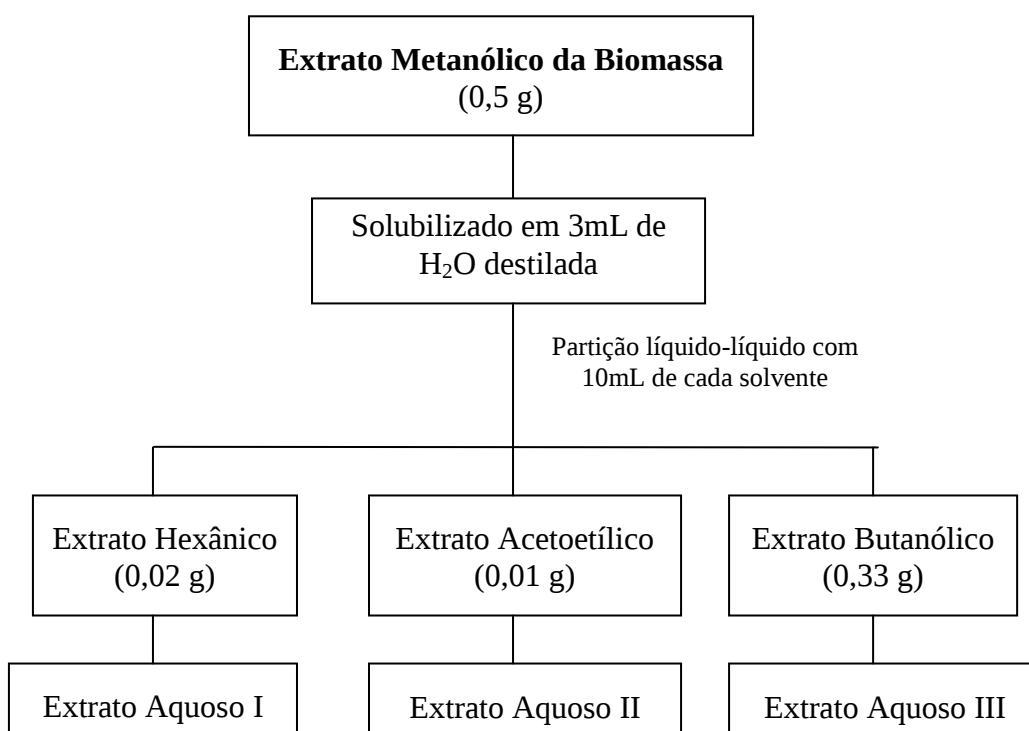
##### **4.4.1. Extração dos Metabólitos Secundários do Meio Sólido**

Ao cultivo sólido foram adicionados 150 mL de metanol e deixados por 48 h a 30 °C. Em seguida, o extrato foi filtrado e adicionado mais 100 mL de metanol por 24 h

a 30 °C. O extrato foi novamente filtrado e concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C.

#### 4.5. Partição Líquido-Líquido

Cerca de 0,5 g do extrato metanólico da biomassa foi diluído em água destilada e particionado com *n*-hexano, acetato de etila e 2-butanol nas proporções de 1:3. Os extratos particionados foram concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C e os extratos aquosos provenientes de cada partição a 100 °C (Figura 10).



**Figura 10.** Fluxograma para obtenção das partições líquido-líquido com *n*-hexano, acetato de etila e 2-butanol do extrato metanólico da biomassa da Actinobactéria ACTMS-9H em fermentação em cultivo submerso.

##### 4.5.1. Prospeção Química

Os extratos metanólico da biomassa, butanólico, aquoso III e acetoetílico do líquido metabólico foram dissolvidos em metanol P.A. e alíquotas de 10 µL de cada extrato foram analisados por CCD em cromatofolhas de alumínio TLC contendo Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Para a identificação das classes de metabólitos secundários, empregaram-se diversas fases móveis e reveladores específicos (HARBORNE, 1998;

METZ, 1961; ROBERTSON; CARTWRIGHT; OLDSCHOOL, 1956; SHARMA; DAWRA, 1991; WAGNER; BLADT, 1996). Os cromatogramas migraram em cubas previamente saturadas. A Tabela 1 apresenta as condições experimentais da prospecção química dos extratos.

**Tabela 1.** Condições cromatográficas da prospecção química dos metabólitos secundários produzidos pela Actinobactéria ACTMS-9H.

| Metabólitos              | Sistema de |                     | Referência                                |
|--------------------------|------------|---------------------|-------------------------------------------|
|                          | Migração   | Revelador           |                                           |
| Alcalóides               | A          | Dragendorff         | Wagner e Bladt, 1996                      |
| Açúcares redutores       | D          | TTC                 | Metz, 1961                                |
| Compostos fenólicos      | C          | NEU                 | Wagner e Bladt, 1996                      |
| Flavanóides              | C          | NEU                 | Wagner e Bladt, 1996                      |
| Taninos                  | A          | Vanilina clorídrica | Robertson; Cartwright;<br>Oldschool, 1956 |
| Triterpenos e Esteróides | B          | Lieberman-Burchard  | Sharma e Dawra, 1991                      |
| Saponinas                | -          | Afrogenicidade      | Wagner e Bladt, 1996                      |

A. acetato de etila - ácido acético - ácido fórmico - água (100:11:11:26, v/v); B. tolueno - acetato de etila (90:10, v/v); C. tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (6:4:1, v/v), D. acetona - n-butanol - tampão fosfato pH 5,0 (5:4:1, v/v).

#### A detecção dos metabólitos secundários:

- o Alcalóides são evidenciados por bandas laranja após revelação com Dragendorff e o padrão utilizado foi pilocarpina.
- o Açúcares redutores são evidenciados após revelação com solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e aquecimento. Os padrões utilizados foram soluções de frutose, glicose e sacarose.
- o Para compostos fenólicos há presença de bandas com fluorescência levemente azulada e flavanóides, bandas laranja a vermelho quando revelados com o reagente de NEU (Difenilboriloxietilamina 1% em EtOH) e analisada em UV. Os padrões utilizados foram luteolina e quercetina.
- o Taninos hidrolisáveis são evidenciados por manchas de coloração rósea após revelação com solução de vanilina clorídrica, comparando-se com os padrões de

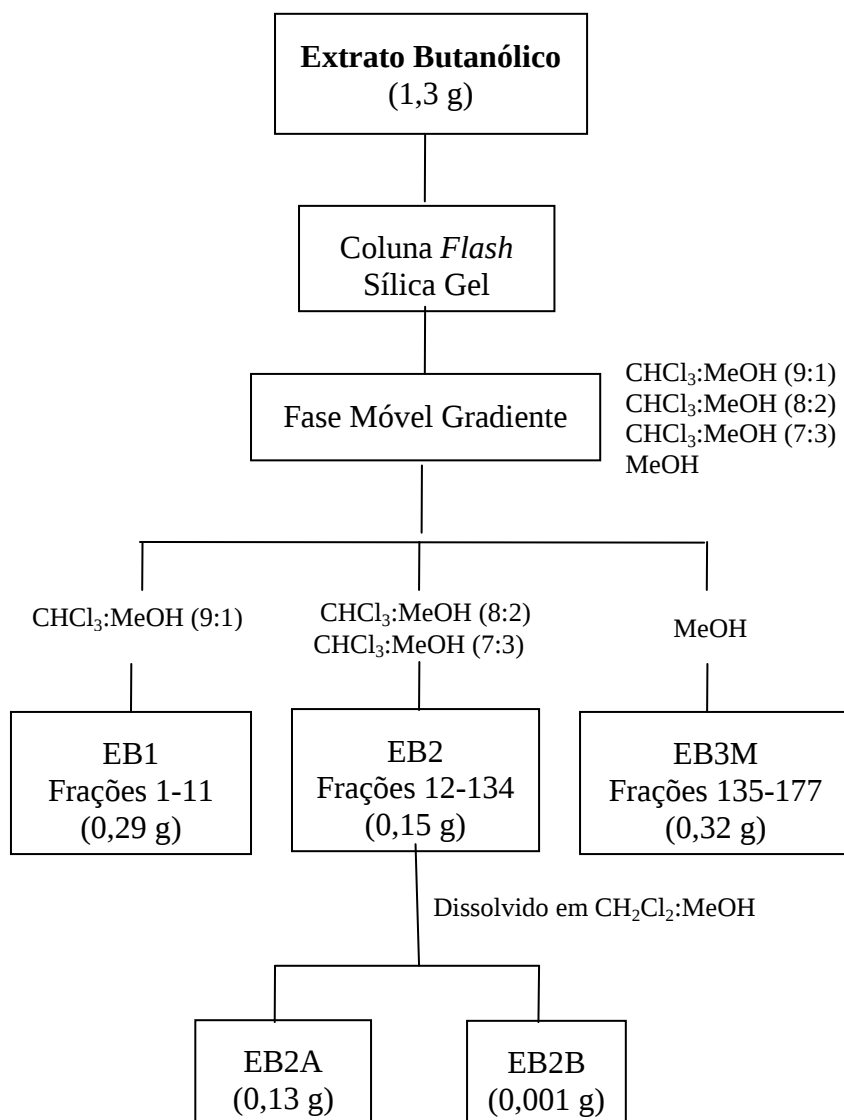
ácido elágico e ácido gálico, enquanto taninos condensados (proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas) apresentam manchas de coloração vermelha. O padrão utilizado foi epicatequina.

- o Em triterpenos e esteróides há presença de bandas marrons a azuladas após revelação com o reagente de Lieberman-Burchard e aquecimento. Os padrões utilizados foram ácido ursólico,  $\beta$ -amirina e  $\beta$ -sitosterol.
- o Na detecção de saponinas, os extratos foram dissolvidos em tubos de ensaio com água, agitados vigorosamente por 2 min e deixados em repouso por 2 h. Se a espuma formada persistir após esse período, o resultado é positivo para presença de saponinas. Também foi realizado o teste do escoamento capilar, onde foi feita a comparação do escoamento dos extratos em um tubo capilar com o escoamento da água destilada em outro capilar, o resultado é considerado positivo se o escoamento do extrato for maior do que o da água.

Após a prospecção química foram realizadas CCDs visando selecionar as condições cromatográficas ideais para purificação de alcalóides, usando como fase móvel diferentes proporções de clorofórmio:metanol ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH).

#### 4.6. Fracionamento em Cromatografia em Coluna *Flash*

O extrato butanólico (1,3 g) foi fracionado utilizando cromatografia em coluna *flash* (26,5 x 2,6 cm) sobre gel de sílica (230 – 400 Mesh), na fase estacionária e, uma fase móvel gradiente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, 8:2, 7:3 e MeOH), sendo coletadas 177 frações de 17 mL. As frações foram analisadas por CCD ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1) e Dragendorff) e reunidas quando apresentavam um perfil semelhante. A fração EB1 - 1 a 11 (0,29 g) foi eluída com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1), a fração EB2 - 12 a 134 (0,15 g) com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (8:2 e 7:3) e a fração EB3M - 134 a 177 (0,31 g) com MeOH. Essas frações foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C e reavaliadas. Observou-se que a fração EB2 quando dissolvida formou um precipitado branco, denominado EB2B que foi separado do dissolvido, denominado EB2A (Figura 11). Esses extratos foram novamente concentrados.



**Figura 11.** Fluxograma para obtenção das frações do extrato butanólico.

#### 4.6.1. Bioautografia

Todas as frações obtidas na cromatografia em coluna *flash* foram analisadas por bioautografia, técnica usada para identificar as bandas da CCD que possui atividade antibacteriana ou antifúngica (CHOMA; GRZELAK, 2011).

Cerca de 5 µL das frações solubilizadas em metanol P.A. foram aplicadas em placa de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), eluída no sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1) e observada sob luz UV. Uma suspensão de *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 foi preparada com densidade 0,5 na escala de MacFarland e diluída em meio Mueller Hinton Ágar (MH) semi-sólido. A placa cromatográfica eluída foi colocada em uma placa de Petri e o meio de cultura inoculado vertido sobre esta, incubada a 37 °C durante

24 h. Após este período, essa cromatoplaça foi revelada com uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 20 mg/mL e reincubada a 37 °C por 2-4 horas. A revelação com esse sal faz com que células viáveis o reduzam e os halos de inibição de crescimento marcados por coloração amarelada são facilmente identificados em um fundo vermelho.

Outra placa eluída no mesmo sistema foi revelada com Dragendorff. A comparação entre as placas foi realizada, a fim de se determinar a presença de alcalóide com atividade antibacteriana.

#### 4.7. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada aplicando-se o teste de susceptibilidade para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB) ou Fungicida (CMF).

Os extratos, partições e frações testados foram analiticamente pesados (0,002 g) e solubilizados em 100 µL de DMSO e 900 µL de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI), MH ou Sabouraud (SAB), obtendo-se uma solução estoque de concentração 2000 µg/mL.

Os micro-organismos utilizados foram provenientes da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 2) e foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em água destilada estéril, correspondente a uma concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL para bactérias e  $10^7$  UFC/mL para leveduras e fungos filamentosos.

**Tabela 2.** Micro-organismos testes utilizados na atividade antimicrobiana.

| <b>Bactérias Gram-positivas</b>               | <b>Bactérias Gram-negativas</b>          |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02        | <i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 663*      | <i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA 396  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ORSA UFPEDA 700* | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 416 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 705*      |                                          |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ORSA UFPEDA 709* |                                          |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ORSA UFPEDA 718* |                                          |

*Bacillus subtilis* UFPEDA 86

*Micrococcus luteus* UFPEDA 100

*Enterococcus faecalis* UFPEDA 138

---

**Bactéria Álcool-Ácido Resistente**

*Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71

---

**Leveduras**

*Candida albicans* UFPEDA 1007

*Candida krusei* UFPEDA 1002

*Malassezia furfur* UFPEDA 1320

**Fungos Filamentosos**

*Aspergillus niger* UFPEDA 2003

*Colletotrichum* sp. UFPEDA 2561

*Colletotrichum* sp. UFPEDA 2562

---

\* Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (ponta de cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (ferida operatória), *S. aureus* UFPEDA 709 (exsudato purulento), *S. aureus* UFPEDA 718 (secreção traqueal)

#### 4.7.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória

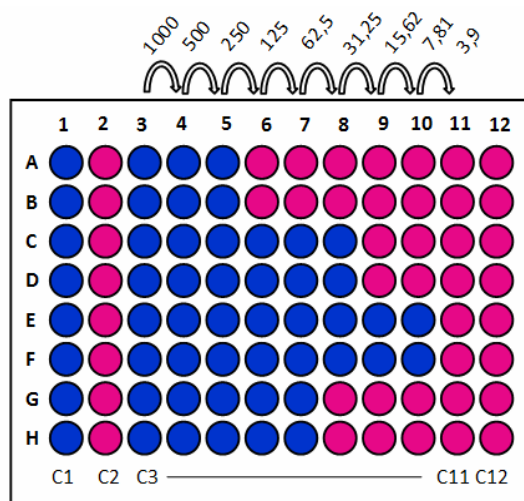
A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição, em multiplacas com 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Foram distribuídos 100 µL de meio de cultura líquido (BHI, para *E. faecalis* e *M. smegmatis*; MH, demais bactérias; e SAB, leveduras e fungos filamentosos) nos poços das placas, exceto os poços da coluna 2 que receberam 50 µL do meio de cultura e 50 µL do veículo de diluição da amostra (controle do agente de solubilização) (Figura 12). Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada amostra nos poços da coluna 3 e realizado o processo de microdiluição seriada, da linha A coluna 3 para coluna 4 e assim sucessivamente até a coluna 11 obtendo-se concentrações decrescentes que variaram de 3,9 a 1000 µg/mL, quando preciso esses produtos foram diluídos ainda mais. Após a diluição das amostras, foi adicionado aos poços 10 µL dos inóculos microbianos padronizados, exceto nos poços da coluna 1 (controle de esterilidade do meio). A coluna 12 (controle positivo do inóculo) só recebeu 100 µL de meio de cultura e 10 µL do inóculo. As microplacas foram cultivadas a 37 °C por 18-24 horas para bactérias e 30 °C por 48-72 horas para leveduras e fungos filamentosos.

Para comparar a atividade antibacteriana utilizou-se como padrão a oxacilina para *S. aureus*, vancomicina para *B. subtilis* e *M. luteus*, teicoplanina para *E. faecalis*, ciprofloxacino para *E. coli* e *P. aeruginosa*, polimixina B para *K. pneumoniae* e

rifampicina para *M. smegmatis*. Na atividade antifúngica o padrão utilizado foi o fuconazol.

#### 4.7.1.1. Leitura da Microplaca

Após o período de cultivo, as microplacas foram reveladas com 15 µL de resazurina a 0,01% e incubadas por 1-3 horas para que ocorresse a mudança de coloração nos poços. A resazurina é um corante azul indicador de óxido-redução, onde a manutenção da cor azul nos poços é interpretada como inibição de crescimento, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, ocorrência de crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração da droga que inibiu o crescimento do micro-organismo. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.



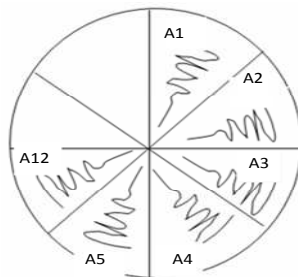
C1 (controle de esterilidade do meio): 100 µL de meio de cultura; C2 (controle do agente de solubilização): 50 µL de meio de cultura + 50 µL do veículo de diluição da droga + 10 µL do inóculo; C3-C11 (microdiluição): 100 µL de meio de cultura + 100 µL da amostra retirada do poço anterior, descartando 100 µL do último poço + 10 µL do inóculo; C12 (controle do inóculo): 100 µL de meio de cultura + 10 µL do inóculo.

**Figura 12.** Determinação da concentração mínima inibitória dos extratos, partições e frações pela técnica de microdiluição.

#### 4.7.2. Determinação da Concentração Mínima Bactericida e Fungicida

A CMB e CMF são definidas como a menor concentração da droga que mata 99,9% do micro-organismo utilizado no teste dentro de um período de tempo definido (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Foram determinadas pela subcultura dos poços azuis do teste

de determinação da CMI em placa de Petri contendo o meio sólido BHI, MH ou SAB, incubada a 37 °C por 18-24 horas para bactérias e, a 30 °C por 48-72 horas para leveduras e fungos filamentos (Figura 13). Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.



Repique dos poços da A1-A5 e A12 da linha A.

**Figura 13.** Determinação da concentração mínima bactericida e fungicida dos extratos, partições e frações pela subcultura dos poços da microdiluição.

#### 4.8. Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi obtida através do método do MTT que consiste em uma dosagem colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo tetrazólio (MTT) de cor amarela a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita devido à ação da enzima succinil-desidrogenase presente somente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

##### 4.8.1. Linhagens Cancerígenas de Humano

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram: HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe), HT-29 (câncer de cólon), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) obtidas da seção de culturas celulares do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE.

As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e L-glutamina, cultivadas em placas de cultura com 96 poços nas seguintes concentrações:  $2 \times 10^5$  células/poço (Hep-2, HT-29 e NCI-H292) e  $0,3 \times 10^6$  células/poço (HL-60), incubadas a 37 °C, em

atmosfera úmida (5% de CO<sub>2</sub>) durante 24 h (BUTLER; DAWSON, 1992). Em seguida, os extratos, partições e frações dissolvidos em DMSO na concentração estoque de 10 mg/mL foram adicionadas aos poços em concentração única (50 µg/mL), as partições e frações consideradas ativas em concentrações seriadas (0,00019 - 50 µg/mL) e a doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL) utilizada como controle positivo. Após 72 horas de reincubação das placas foi adicionado em cada poço 25 µL do MTT (5 mg/mL). Após 3 h de incubação, o meio de cultura com MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm.

Para triagem inicial dos extratos, partições e frações, o percentual de inibição do crescimento celular (IC%) foi determinado considerando a média do controle negativo como 100% de proliferação. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com moderada atividade (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com alta atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%) (FOUCHE et al., 2008).

As partições e frações que causaram uma inibição maior que 75% foram submetidas ao ensaio de determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle negativo (CI<sub>50</sub>). A porcentagem de inibição x log da concentração foi registrada e suas CI<sub>50</sub> e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) calculados a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism* 5.0. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação da Actinobactéria

A actinobactéria ACTMS-9H apresentou excelente crescimento no meio suplementado com extrato de malte e levedura (ISP-2), farinha de aveia (ISP-3), sais inorgânicos e amido (ISP-4) com formação de micélio aéreo abundante. Bom crescimento foi observado no meio arginina e extrato levedura (ALA), triptona e extrato de levedura (ISP-1). Não houve produção de pigmentos melanóides nos meios peptona e extrato de ferro (ISP-6), Tirosina (ISP-7) (Tabela 3).

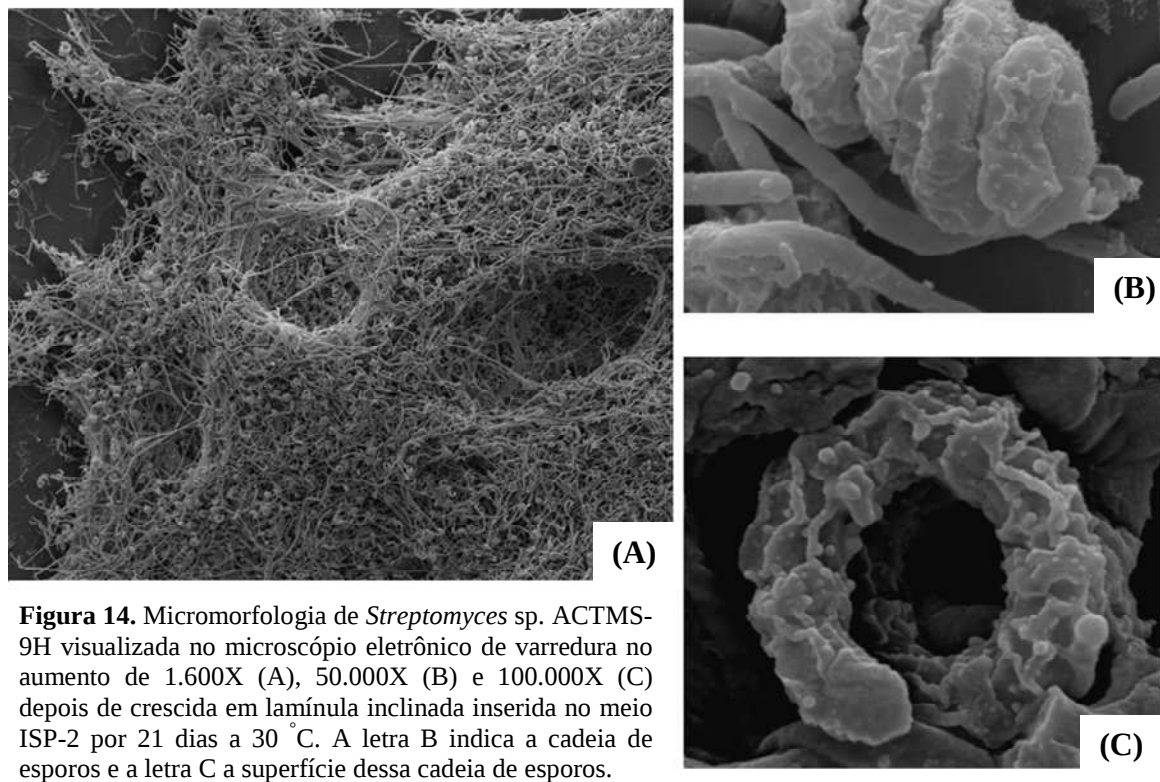
**Tabela 3.** Características culturais da Actinobactéria ACTMS-9H em diferentes meios.

| Actinobactéria ACTMS-9H |             |                      |                             |                             |
|-------------------------|-------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Meios                   | Crescimento | Cor do micélio aéreo | Cor do micélio no substrato | Difusão de pigmento no meio |
| ALA                     | +++         | Cinza claro          | Marrom                      | -                           |
| ISP-1                   | +++         | Branco opaco         | Marrom escuro               | Marrom escuro               |
| ISP-2                   | ++++        | Cinza claro          | Marrom escuro               | -                           |
| ISP-3                   | ++++        | Cinza claro          | Cinza claro                 | -                           |
| ISP-4                   | ++++        | Preto                | Marrom claro                | -                           |
| ISP-5                   | +           | Amarelo claro        | Amarelo                     | -                           |
| ISP-6                   | ++          | Branco opaco         | Branco                      | -                           |
| ISP-7                   | ++          | Branco               | Marrom escuro               | -                           |

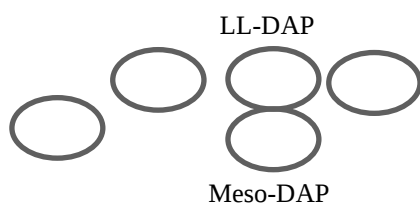
+ Pobre; ++ Fraco; +++ Bom; ++++ Excelente; \_ Sem pigmento

Na análise micromorfológica foram observadas hifas com filamentos ramificados e espiralados com a superfície dos esporos ondeada (Figura 14) característica típica do gênero *Streptomyces*. Essa descrição encontra-se de acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989).

A identificação da actinobactéria foi confirmada também pelo tipo de ácido diaminopimélico (DAP) presente na parede celular do micro-organismo, através da cromatografia em camada delgada, onde apresentou o isômero LL-DAP, característica do gênero *Streptomyces* como observado na figura 15. Quando a actinobactéria apresenta o isômero Meso-DAP caracteriza outro gênero que não *Streptomyces*.



**Figura 14.** Micromorfologia de *Streptomyces* sp. ACTMS-9H visualizada no microscópio eletrônico de varredura no aumento de 1.600X (A), 50.000X (B) e 100.000X (C) depois de crescida em lamínula inclinada inserida no meio ISP-2 por 21 dias a 30 °C. A letra B indica a cadeia de esporos e a letra C a superfície dessa cadeia de esporos.



**Figura 15.** Cromatografia em camada delgada da parede celular de *Streptomyces* sp. ACTMS-9H. (1) *Nocardia asteroides* (UFPEDA 3503); (2) *Streptomyces regensis* (UFPEDA 3053); (3) DAP (LL-DAP e Meso-DAP) e (4) *Streptomyces* sp. ACTMS-9H.

*Streptomyces* sp. ACTMS-9H foi capaz de utilizar como única fonte de carbono D-frutose, D-galactose, D-manose, D-xilose, lactose, L-arabinose, L-ramnose, maltose, manitol, raffinose e sacarose, não sendo capaz de consumir D-melezitose e trealose. As fontes de nitrogênio utilizadas foram cisteína, histidina, serina, treonina e valina, não sendo capaz de consumir fenilalanina e L-metionina. A linhagem foi capaz de crescer em concentrações de NaCl que variaram de 2 a 12%, sendo o crescimento diminuído em concentrações mais elevadas desse sal. Apresentou crescimento em temperaturas de 30 a 45 °C, crescimento em pH de 5 a 9 e sensibilidade aos antibióticos amicacina, ciprofloxacina, cloranfenicol, imipenem, estreptomicina, tetraciclina e vancomicina, conforme tabela 4.

**Tabela 4.** Características bioquímicas, fisiológicas e resistência aos antibióticos de *Streptomyces* sp. ACTMS-9H.

| Características Bioquímicas |   | Características Fisiológicas |     | Resistência a Antibióticos |           |
|-----------------------------|---|------------------------------|-----|----------------------------|-----------|
| <b>Fontes de Carbono</b>    |   | <b>NaCl%</b>                 |     | Amicacina                  | 39±1,41   |
| D-frutose                   | + | 2%                           | +++ | Ampicilina                 | -         |
| D-galactose                 | + | 5%                           | +++ | Amoxicilina                | -         |
| D-manose                    | + | 7%                           | ++  | Cefotaxima                 | -         |
| D-melezitose                | - | 9%                           | ++  | Ciprofloxacina             | 30,5±2,12 |
| D-xilose                    | + | 12%                          | +   | Cloranfenicol              | 19,5±0,71 |
| Lactose                     | + |                              |     | Eritromicina               | -         |
| L-arabinose                 | + | <b>Temperatura</b>           |     | Imipenem                   | 39±1,41   |
| L-ramnose                   | + | 30%                          | +++ | Norfloxacina               | -         |
| Maltose                     | + | 37%                          | ++  | Oxacilina                  | -         |
| Manitol                     | + | 45%                          | +   | Rifampicina                | -         |
| Raffinose                   | + |                              |     | Estreptomicina             | 21±1,41   |
| Sacarose                    | + | <b>pH</b>                    |     | Tetraciclina               | 25±0,0    |
| Trealose                    | - | 5%                           | +   | Vancomicina                | 45,5±0,71 |
|                             |   | 6%                           | ++  |                            |           |
|                             |   | 8%                           | ++  |                            |           |
| <b>Fontes de Nitrogênio</b> |   | 9%                           | ++  |                            |           |
| Arginina                    | + |                              |     |                            |           |
| Cisteína                    | + |                              |     |                            |           |
| Fenilalanina                | - |                              |     |                            |           |
| Histidina                   | + |                              |     |                            |           |
| L-metionina                 | - |                              |     |                            |           |
| Sreina                      | + |                              |     |                            |           |
| Treonina                    | + |                              |     |                            |           |
| Valina                      | + |                              |     |                            |           |

+ Positivo; ++ Bom; +++ Excelente; - Negativo

O gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae, subordem Streptomycineae, ordem Actinomicetales, subclasse Actinobacteridae, classe Actinobactéria e apresenta o maior número de espécies descritas. *Streptomyces* foi descrito pela primeira vez por Ferdinand Conh em 1875 que observou na microscopia colônias com micélio em forma de cabelo enrolado denominando a espécie de *Streptotrix foersteri*. No solo, este gênero produz compostos voláteis como o geosmim que dá ao solo o cheiro característico de terra molhada (DREWS, 1999; HOPWOOD, 2007; NCBI, 2010).

Bouizgarne et al. (2009); Sudha e Selvam (2011); Zhong et al. (2011) demonstraram que o gênero *Streptomyces* é bastante encontrado na rizosfera de plantas e de fácil identificação pela presença da cadeia de esporos que podem se apresentar de diferentes formas, como espiraladas, verticiladas ou retas.

Estudos realizados por Silva (2010) em solo da rizosfera de *Paullinia cupana* Kunth do município de Maués - Amazonas identificou através da técnica do microcultivo de 54 actinobactérias isoladas com potente atividade antimicrobiana, 19 (35%) pertencentes ao gênero *Streptomyces*, as outras actinobactérias identificadas pertenciam aos gêneros *Nocardiopsis*, *Actinomadura* e *Planobispora*.

Borneman e Triplett (1997) descreveram pela primeira vez através da análise molecular do DNA total a biodiversidade microbiana em solos de floresta e pastagem da Amazônia mostrando a presença de 18% de sequências que não pertenciam a nenhum gênero bacteriano conhecido.

#### **5.1.1. Caracterização Molecular**

A extração de DNA genômico da cultura pura de *Streptomyces* sp. ACTMS-9H foi realizada com êxito, obtendo-se 200 ng de DNA. A boa qualidade de DNA extraído foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR da sequência 16S do DNAr, conforme figura 16.

A análise da sequência quase completa do gene 16S do DNAr (1460 pb) mostrou que *Streptomyces* sp. ACTMS-9H está intimamente relacionado com *Streptomyces hygrosopicus* S75-5, apresentando 96% de similaridade com número de acesso ao GenBank ([gi|170280647|gb|EU521700.1|](#)).



**Figura 16.** Gel de agarose 1,2% mostrando a amplificação do DNA de *Streptomyces* sp. ACTMS-9H. M: marcador molecular 100 pb (Ameresco); 1: Produto de PCR com aproximadamente 1500 pb utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores 27f/1492r.

A linhagem encontra-se depositada na Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, como *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H (UFPEDA 3370), sob imersão em óleo mineral e liofilizada.

*Streptomyces hygroscopicus* é uma espécie, que produz uma variedade de antibióticos pertencentes a diferentes classes com estrutura distinta e possuindo certas propriedades biológica, como agentes antimicrobianos e antitumorais. Muitos desses antibióticos são compostos patenteados (ANZAI et al., 2008; GESHEVA, 2009). De acordo com um estudo realizado por Rong e Huang (2012) mais de 650 tipos de substâncias bioativas foram produzidas por *Streptomyces hygroscopicus* e espécies a ela relacionada. Membros desse clado ainda continuam sendo um dos principais objetos de triagem de novas substâncias bioativas para combater a propagação de patógenos resistentes aos antibióticos e para o desenvolvimento de novos pesticidas com resíduos não-tóxicos ou de baixa toxicidade.

## 5.2. Fermentação e Preparação dos Extratos Brutos

Durante a fermentação em cultivo submerso, *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H mostrou bom crescimento em meio farinha de soja (MPE) com coloração marrom difusível. A partir de 550 mL dessa fermentação foram obtidos 87 g de biomassa que após extraída com metanol, teve seu extrato concentrado em

rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C, obtendo-se 2,88 g, representando um rendimento de 3,32%. Para o líquido metabólico foram obtidos 440 mL que após extraído com acetato de etila pesou 627,01 g, quando esse extrato foi concentrado conseguiu-se 0,32 g, o que corresponde a um rendimento de 0,05%.

Na fermentação em meio sólido de arroz parbolizado, a linhagem também exibiu bom crescimento. A cor do substrato mudou para marrom e o crescimento micelial de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H apresentou-se acinzentado. A partir de 90 g de arroz parboilizado foram obtidos 5,94 g de extrato metanólico, o que representa um rendimento de 6,6%.

O processo fermentativo em meio sólido costuma apresentar rendimentos melhores que a fermentação em cultivo submerso, como relatado por Robinson; Singh; Nigam (2001) ao comparar os prós e contras da fermentação sólida com a fermentação submersa. Um estudo realizado por Selvameenal; Radhakrishnan; Balagurunatha (2009) utilizando farelo de trigo na fermentação em meio sólido obteve para cada 10 g de farelo de trigo 0,420 g de extrato bruto, isso significa um rendimento de 4,2%. Esses estudos corroboram com o nosso trabalho.

### 5.3. Obtenção das Partições e Prospecção Química

O extrato metanólico da biomassa (0,5 g) foi escolhido para ser particionado porque apresentou melhor atividade antimicrobiana e citotóxica (ver Tabela 6 e 8). A partição líquido-líquido com *n*-hexano apresentou um rendimento de 4% (0,02 g), quando particionado com acetato de etila, 2% (0,01 g) e, 2-butanol, 66% (0,33 g).

Os resultados da prospecção química dos extratos metanólico da biomassa, butanólico, aquoso III e acetoetílico do líquido metabólico analisados por cromatografia em camada delgada para identificar as classes de metabólitos secundários indicaram a presença de alcalóides, açúcares redutores e saponinas nos extratos metanólicos da biomassa e butanólico; alcalóides e açúcares redutores no extrato aquoso III e alcalóides, açúcares redutores, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides no extrato acetoetílico do líquido metabólico, conforme Tabela 5.

Thomas et al. (2011) realizaram uma investigação química preliminar de extratos provenientes tanto da biomassa quanto do líquido metabólico de 36 bactérias isoladas de diversos habitats. O extrato metanólico da biomassa de uma bactéria, denominada B-2, demonstrou a presença de alcalóides, carboidratos, compostos

fenólicos, proteínas e aminoácidos. O líquido metabólico extraído sucessivamente com éter de petróleo, acetato de etila e clorofórmio, indicando a presença de esteróis quando extraído com éter de petróleo e clorofórmio, quando extraído com acetato de etila, a presença de flavonóides e esteróis.

**Tabela 5.** Prospeção química por cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H.

| Metabólitos              | EMeOH 9H-B | EBuOH | EH <sub>2</sub> O III | EAcOEt 9H-LM |
|--------------------------|------------|-------|-----------------------|--------------|
| Alcalóides               | +          | +     | +                     | +            |
| Açúcares redutores       | +          | +     | +                     | +            |
| Compostos fenólicos      | -          | -     | -                     | +            |
| Flavanóides              | -          | -     | -                     | -            |
| Taninos                  | -          | -     | -                     | -            |
| Triterpenos e Esteróides | -          | -     | -                     | +            |
| Saponinas                | +          | +     | -                     | -            |

EMeOH 9H-B: Extrato metanólico da biomassa; EBuOH: Extrato butanólico; EH<sub>2</sub>O III: Extrato aquoso III; EAcOEt: Extrato acetotílico do líquido metabólico. Os sinais (+) e (-) indicam, respectivamente, presença ou ausência da classe dos compostos.

Naik; Harindran; Varde (2001) identificaram a presença de alcalóide no líquido metabólico da fermentação de *Streptomyces* CDRIL-312. Esse alcalóide, pimprinina, foi purificado utilizando cromatografia em coluna sobre sílica gel e cromatografia em camada delgada preparativa. Algumas atividades farmacológicas, como atividade antimicrobiana *in vitro*, toxicidade aguda, atividade anticonvulsivante e atividade analgésica foram realizadas. Pimprinina apresentou fraca atividade antimicrobiana. Sua atividade anticonvulsivante foi promissora e semelhante a atividade do difenilhidantoína sódica, uma droga padrão utilizada no tratamento da epilepsia .

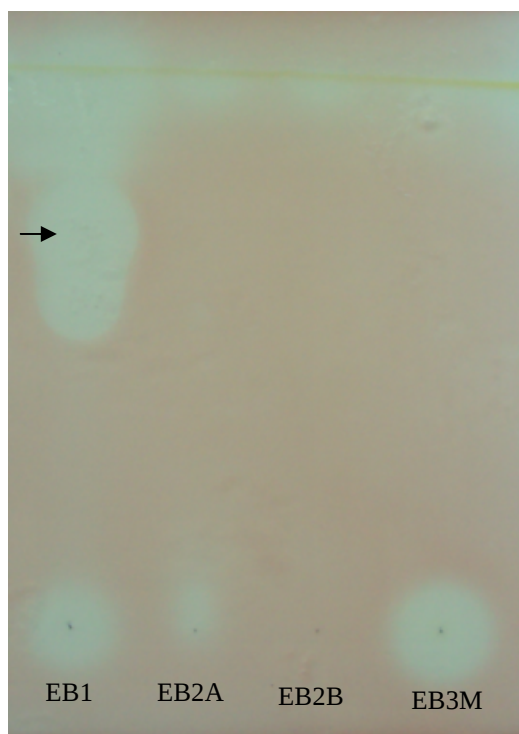
#### 5.4. Fracionamento em Cromatografia em Coluna *Flash* e Bioautografia

O extrato butanólico proveniente da partição do extrato metanólico da biomassa apresentou bom rendimento e atividades antimicrobiana e citotóxica promissoras (ver Tabela 7 e 9), sendo selecionado para fracionamento em cromatografia em coluna *flash*.

Cerca de 1,3 g desse extrato fracionado resultou em quatro frações: EB1 (0,29 g), EB2A (0,13 g), EB2B (0,001 g) e EB3M (0,32 g) que representam respectivamente um rendimento de 22; 9,75; 0,09 e 24%.

Após o fracionamento, todas as frações obtidas foram analisadas por bioautografia utilizando a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, para observar se os compostos presentes em cada fração eluídos no sistema de solventes  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1) apresentavam atividade antibacteriana. Todas as frações apresentaram pelo menos um composto com atividade frente a *S. aureus* (Figura 17).

Esses dados não informam a natureza dos compostos responsáveis pela ação antibacteriana, por isso outra placa eluída no mesmo sistema foi revelada com Dragendorff. A comparação entre as placas permitiu determinar um alcalóide presente na fração EB1 com Rf 0,7 que apresentou atividade antibacteriana frente a *S. aureus*. Os alcalóides presentes nas frações EB2A e EB3M não migraram do ponto de aplicação.



**Figura 17.** Bioautografia realizada com quatro frações, obtidas pelo fracionamento em coluna *flash*, aplicada no sistema clorofórmio:metanol (9:1). A seta indica um composto da fração EB1 que se trata de um alcalóide com Rf 0,7.

Um pigmento produzido por *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *ossamyceticus*, isolado do deserto do Thar na Índia, parcialmente purificado a partir da cromatografia em camada delgada por Selvameenal; Radhakrishnan; Balagurunatha (2009) teve sua

atividade antimicrobiana determinada utilizando a técnica de bioautografia, onde foi encontrado uma mancha com Rf de 0,77 que apresentou atividade contra MRSA, VRSA, *E. coli* e *Klebsiella* sp. com halos de inibição respectivamente de 15, 20, 15 e 10 mm. Os resultados do rastreamento químico identificou que o grupo funcional presente no composto bioativo é uma molécula que contém açúcar.

A bioautografia ao localizar a atividade antimicrobiana de um extrato, partição ou fração no cromatograma, permite uma pesquisa rápida de novos agentes antimicrobianos através do estudo bioguiado. Esse método detecta, mesmo em pequenas quantidades, compostos antimicrobianos ativos em misturas complexas de compostos. Trata-se de uma técnica qualitativa que não informa os valores da concentração mínima inibitória (SCORZONI et al., 2007).

## 5.6. Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana realizada pelo teste de susceptibilidade para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) mostrou que os extratos metanólico da biomassa, acetoetílico do líquido metabólico e metanólico da fermentação em meio sólido apresentaram melhor atividade frente a bactérias Gram-positivas, bactéria álcool ácido-resistente, leveduras e fungos filamentosos. Os menores valores da CIM foram atribuídos ao extrato metanólico da biomassa (Tabela 6). A concentração final do DMSO, agente de solubilização dos extratos utilizado no ensaio, não afetou na inibição do crescimento dos micro-organismos teste.

Embora a fermentação em meio sólido como relatado por Robinson; Singh; Nigam (2001) tenha sido usada com êxito para a produção de enzimas e metabólitos secundários, no nosso estudo, os metabólitos produzidos na fermentação em cultivo submerso de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H apresentaram os melhores resultados da atividade antimicrobiana.

Segundo Charoensopharat et al. (2008), a maioria dos antibióticos provenientes de *Streptomyces* sp. são metabólitos secundários extracelular que têm sido utilizados como agentes anticancerígenos, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórios, antiparasitários e inseticidas. Em nosso estudo, os metabólitos secundários intracelular (biomassa), quando comparados aos metabólitos secundários extracelular (líquido metabólico), apresentaram os valores menores da CMI.

Guimarães; Momesso; Pupo (2010) afirmam que em decorrência da natureza complexa da parede celular das bactérias Gram-negativas, essas são mais resistentes à ação de antibióticos, que não são capazes de atravessar efetivamente a barreira lipídica da camada externa dessas bactérias. Esses achados corroboram com os encontrados no nosso estudo.

**Tabela 6.** Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir da fermentação em cultivo submerso e em meio sólido de *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H em µg/mL.

| Micro-organismos                      | EMeOH 9H-B |        | EAcOEt 9H-LM |        | EMeOH 9H-FS |      |
|---------------------------------------|------------|--------|--------------|--------|-------------|------|
|                                       | CMI        | CMB    | CMI          | CMB    | CMI         | CMB  |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 02            | 3,9        | 15,62  | 125          | 1000   | 15,62       | 62,5 |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 663*          | 3,9        | 15,62  | 500          | > 1000 | 250         | 1000 |
| <i>S. aureus</i> ORSA UFPEDA 700*     | 15,62      | 62,5   | 31,25        | 62,5   | 250         | 1000 |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 705*          | 62,5       | 250    | 7,81         | 31,25  | 62,5        | 125  |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA ORSA 709*     | 250        | 1000   | 15,62        | 62,5   | 31,25       | 62,5 |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA ORSA 718*     | 500        | 1000   | 3,9          | 15,62  | 125         | 500  |
| <i>B. subtilis</i> UFPEDA 86          | 7,81       | 31,25  | 31,25        | 125    | 15,62       | 62,5 |
| <i>M. luteus</i> UFPEDA 100           | 0,12       | 0,48   | 3,9          | 15,62  | 15,62       | 62,5 |
| <i>E. faecalis</i> UFPEDA 138         | 500        | 1000   | 250          | 1000   | 62,5        | 125  |
| <i>E. coli</i> UFPEDA 224             | > 1000     | > 1000 | 125          | 500    | 250         | 500  |
| <i>K. pneumoniae</i> UFPEDA 396       | 250        | 1000   | 250          | 1000   | 250         | 1000 |
| <i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 416       | > 1000     | > 1000 | 250          | 500    | 250         | 500  |
| <i>M. smegmatis</i> UFPEDA 71         | 3,9        | 7,81   | 7,81         | 31,25  | 31,25       | 62,5 |
|                                       | CMF        |        | CMF          |        | CMF         |      |
| <i>C. krusei</i> UFPEDA 1002          | 15,62      | 31,25  | 62,5         | 500    | 125         | 500  |
| <i>C. albicans</i> UFPEDA 1007        | 7,81       | 31,25  | 31,25        | 500    | 62,5        | 500  |
| <i>M. furfur</i> UFPEDA 1320          | 125        | 250    | 250          | 500    | 62,5        | 125  |
| <i>A. niger</i> UFPEDA 2003           | 31,25      | 62,5   | 62,5         | 500    | 125         | 250  |
| <i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2561 | 3,9        | 7,81   | 31,25        | 250    | 62,5        | 250  |
| <i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2562 | 1,95       | 7,81   | 15,62        | 125    | 62,5        | 250  |

EMeOH 9H-B: extrato metanólico da biomassa; EAcOEt 9H-LM: extrato acetotílico do líquido metabólico; EMeOH 9H-FS: extrato metanólico da fermentação em meio sólido. \* Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (ponta de

cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (ferida operatória), *S. aureus* UFPEDA 709 (exsudato purulento), *S. aureus* UFPEDA 718 (secreção traqueal).

Para determinar a CMI das partições e frações foram utilizados os micro-organismos teste que mostaram-se mais suscetíveis ao extrato metanólico da biomassa. A fração EB2B não teve sua atividade antimicrobiana avaliada por conta da baixa quantidade obtida dessa fração 0,001 g. Todas as partições e frações apresentaram atividade antimicrobiana com valores de CMI iguais ou abaixo de 62,5 µg/mL.

A partição com acetato de etila apresentou os valores mais baixos da CMI, 3,9 µg/mL quando testados frente a bactérias Gram-positivas e 0,12 µg/mL frente ao *Mycobacterium smegmatis*. A partição com butanol apresentou CMI de 3,9 µg/mL quando testados frente a *Candida albicans* e *C. krusei*; 1,95 µg/mL frente ao *Aspergillus niger* e 7,81 µg/mL frente ao *Colletotrichum* sp. Dentre as frações, a EB1 se destacou com valores da CMI iguais ou abaixo de 3,9 µg/mL (Tabela 7 e 8).

A partição com acetato de etila apresentou valor da CMI (3,9 µg/mL) frente a *Staphylococcus aureus* ORSA UFPEDA 700 menor que o antibiótico padrão, oxacilina (256 µg/mL). A partição com butanol apresentou valor da CMI (3,9 µg/mL) frente a *C. albicans* menor que o antibiótico padrão, fluconazol (64 µg/mL). Os resultados obtidos mostram o grande potencial da linhagem *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H para produção de metabólitos com atividade antimicrobiana.

Na literatura muitos trabalhos relatam a atividade antimicrobiana de metabólitos provenientes de *Streptomyces hygroscopicus*. He et al. (2002) isolaram de *Streptomyces hygroscopicus* LL-AC98 uma série de novos antibióticos glicopeptídeos (manopeptimicinas) com atividade contra MRSA com CMI variando de 4 a 128 µg/mL. Esses novos antibióticos também exibiram atividade contra *Bacillus subtilis* com CMI entre 8 e 16 µg/mL e *Micrococcus luteus* com CMI entre 1 e 64 µg/mL, porém foi observada baixa atividade contra bactérias Gram-negativas.

Lam et al. (1990) avaliaram a atividade antimicrobiana de himastatina produzida por *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 que apresentou atividade frente ao *B. subtilis* com CMI de 2 µg/mL, *Staphylococcus aureus* com CMI variando de 0,5 a 1 µg/mL e inativo contra bactérias Gram-negativas. Igualmente, Hossain et al. (2004) obtiveram três novas amidas do fracionamento do extrato acetotílico do líquido metabólico de *Streptomyces hygroscopicus* isolado do solo de Rajshahi em Bangladesh com atividade antibacteriana frente ao *B. subtilis* e *S. aureus* com CMI entre 64 e 128 µg/mL.

**Tabela 7.** Atividade antimicrobiana das partições da fase butanólica em µg/mL.

| Micro-organismo                       | EHex  |       | EAcOEt |       | EBuOH |       | EH <sub>2</sub> O I |       | EH <sub>2</sub> O II |       | EH <sub>2</sub> O III |       |
|---------------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|---------------------|-------|----------------------|-------|-----------------------|-------|
|                                       | CMI   | CMB   | CMI    | CMB   | CMI   | CMB   | CMI                 | CMB   | CMI                  | CMB   | CMI                   | CMB   |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 02            | 15,62 | 31,25 | 3,9    | 7,81  | 15,62 | 31,25 | 15,62               | 31,5  | 15,62                | 62,5  | 15,62                 | 62,5  |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 663*          | 15,25 | 31,25 | 3,9    | 15,62 | 15,62 | 62,5  | 15,62               | 62,5  | 15,62                | 62,5  | 15,62                 | 62,5  |
| <i>S. aureus</i> ORSA UFPEDA 700*     | 15,62 | 31,25 | 3,9    | 15,62 | 7,81  | 31,25 | 7,81                | 31,25 | 7,81                 | 31,25 | 7,81                  | 62,5  |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 705*          | 15,62 | 62,5  | 3,9    | 15,62 | 15,62 | 62,5  | 15,62               | 62,5  | 15,62                | 31,25 | 15,62                 | 62,5  |
| <i>B. subtilis</i> UFPEDA 86          | 1,95  | 3,9   | 0,97   | 1,95  | 7,81  | 31,25 | 7,81                | 31,25 | 15,62                | 62,5  | 15,62                 | 62,5  |
| <i>M. luteus</i> UFPEDA 100           | 7,81  | 31,25 | 0,97   | 1,95  | 3,9   | 15,62 | 7,81                | 15,62 | 7,81                 | 31,25 | 7,81                  | 31,25 |
| <i>M. smegmatis</i> UFPEDA 71         | 1,95  | 7,81  | 0,12   | 0,48  | 1,95  | 7,81  | 3,9                 | 7,81  | 3,9                  | 7,81  | 3,9                   | 7,81  |
|                                       | CMF   |       | CMF    |       | CMF   |       | CMF                 |       | CMF                  |       | CMF                   |       |
| <i>C. krusei</i> UFPEDA 1002          | 7,81  | 31,25 | 7,81   | 31,25 | 3,9   | 15,62 | 15,62               | 31,25 | 15,62                | 31,25 | 15,62                 | 31,25 |
| <i>C. albicans</i> UFPEDA 1007        | 3,9   | 7,81  | 3,9    | 7,81  | 3,9   | 15,62 | 15,62               | 31,25 | 15,62                | 31,25 | 15,62                 | 31,25 |
| <i>A. niger</i> UFPEDA 2003           | 3,9   | 7,81  | 3,9    | 7,81  | 1,95  | 7,81  | 1,95                | 3,9   | 3,9                  | 7,81  | 7,81                  | 31,25 |
| <i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2561 | 31,25 | 62,5  | 31,25  | 125   | 7,81  | 31,25 | 15,62               | 62,5  | 31,25                | 125   | 31,25                 | 62,5  |
| <i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2562 | 31,25 | 125   | 15,62  | 62,5  | 7,81  | 31,25 | 15,62               | 125   | 62,5                 | 250   | 62,5                  | 250   |

EHex: extrato hexânico; EAcOEt: extrato acetofílico; EBuOH: extrato butanólico; EH<sub>2</sub>O I: extrato aquoso I; EH<sub>2</sub>O II: extrato aquoso II; EH<sub>2</sub>O III: extrato aquoso III. \* Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (ponta de cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (ferida operatória).

**Tabela 8.** Atividade antimicrobiana das frações da fase butanólica em µg/mL.

| Micro-organismo                       | EB1  |       | EB2A  |       | EB3M  |       |
|---------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                       | CMI  | CMB   | CMI   | CMB   | CMI   | CMB   |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 02            | 1,95 | 7,81  | 15,62 | 31,25 | 15,62 | 31,25 |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 663*          | 1,95 | 7,81  | 15,62 | 62,5  | 15,62 | 62,5  |
| <i>S. aureus</i> ORSA UFPEDA 700*     | 1,95 | 7,81  | 15,62 | 62,5  | 15,62 | 62,5  |
| <i>S. aureus</i> UFPEDA 705*          | 1,95 | 15,62 | 15,62 | 62,5  | 15,62 | 62,5  |
| <i>B. subtilis</i> UFPEDA 86          | 0,48 | 1,95  | 15,62 | 62,5  | 7,81  | 31,25 |
| <i>M. luteus</i> UFPEDA 100           | 1,95 | 7,81  | 7,81  | 31,25 | 7,81  | 31,25 |
| <i>M. smegmatis</i> UFPEDA 71         | 0,48 | 0,97  | 3,9   | 15,62 | 3,9   | 15,62 |
|                                       | CMF  |       | CMF   |       | CMF   |       |
| <i>C. krusei</i> UFPEDA 1002          | 3,9  | 15,62 | 7,81  | 31,25 | 7,81  | 31,25 |
| <i>C. albicans</i> UFPEDA 1007        | 3,9  | 15,62 | 7,81  | 31,25 | 7,81  | 31,25 |
| <i>A. niger</i> UFPEDA 2003           | 3,9  | 7,81  | 3,9   | 7,81  | 3,9   | 7,81  |
| <i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2561 | 1,95 | 7,81  | 1,95  | 1,95  | 3,9   | 7,81  |
| <i>Colletotrichum</i> sp. UFPEDA 2562 | 0,48 | 1,95  | 1,95  | 1,95  | 3,9   | 7,81  |

EB1, EB2A e EB3M: frações provenientes do extrato butanólico. \* Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (ponta de cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (ferida operatória).

Cletramicina isolada do líquido metabólico de *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623 endofítico da raiz de *Clethra barbinervis* no Japão mostou atividade antifúngica frente a levedura *Candida albicans* com CMI de 8 µg/mL e fraca atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FURUMAI et al., 2003). Quatro compostos (tetrins A e B, tetramicina A e B) isolados por Zhang et al. (2011) do líquido metabólico de *Streptomyces hygroscopicus* BS-112 apresentou atividade frente ao *Aspergillus flavus* com CMI de 3,13; 12,56; 1,56 e 6,25 µg/mL, respectivamente.

*Streptomyces hygroscopicus* 111-81 produz o antibiótico macrolídeo AK-111-81 que exibi atividade antibacteriana e antifúngica (GESHEVA; IVANOVA; GESHEVA, 2005). Essa linhagem também produz os antibióticos poliéter IM-111-81, azalomicina B e o antifúngico AK-111-81 que expressa atividade contra *Fusarium graminearum* e outros fungos fitopatogênicos (GESHEVA, 2009).

Prapagdee; Kuekulvong; Mongkolsuk (2008) encontraram nos metabólitos extracelulares de *Streptomyces hygroscopicus* isolado da rizosfera de arrozais e pomares da Tailândia atividade antifúngica frente ao *Colletotrichum gloeosporioides*. O fungo *Colletotrichum* sp. é um patógeno típico de plantas que costuma ser responsável pela doença conhecida como antracnose que originam prejuízos em várias culturas, por exemplo, na cultura do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth).

## 5.7. Atividade Citotóxica

A triagem inicial do potencial citotóxico dos extratos, partições e frações foram realizadas em três linhagens tumorais humanas: HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe), HT-29 (câncer de cólon) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão). Os resultados obtidos através do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras na concentração de 50 µg/mL encontram-se na Tabela 9.

O extrato metanólico da biomassa e o extrato acetoetílico do líquido metabólico provenientes da fermentação em cultivo submerso apresentaram alta atividade, onde a inibição do crescimento celular variou entre 75 a 95% nas linhagens testadas. O extrato metanólico proveniente da fermentação em cultivo submerso apresentou moderada atividade, onde a inibição do crescimento celular variou entre 68 a 71%. Todas as partições apresentaram uma inibição do crescimento celular acima de 80%. Das quatro frações, apenas a fração EB2B, não apresentou atividade citotóxica.

**Tabela 9.** Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos, partições e frações em três linhagens tumorais testados na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

| Amostras                   | Linhagens Celulares (IC%) |            |            |
|----------------------------|---------------------------|------------|------------|
|                            | HEp-2                     | HT-29      | NCI-H292   |
| <b>EMeOH 9H-B</b>          | 75 ± 4,2                  | 97,1 ± 1   | 94,7 ± 0,5 |
| <b>EAcOEt 9H-LM</b>        | 83,7 ± 1                  | 92,7 ± 0,8 | 87,3 ± 0,5 |
| <b>EMeOH 9H-FS</b>         | 67,9 ± 1                  | 71,4 ± 0,4 | 69,3 ± 0,2 |
| <b>EHex</b>                | 95,1 ± 0,8                | 80,2 ± 0,2 | 81,7 ± 0,5 |
| <b>EAcOEt</b>              | 100 ± 0,2                 | 100 ± 0,7  | 99,3 ± 0,3 |
| <b>EBuOH</b>               | 96,8 ± 1,4                | 96,4 ± 1,1 | 95,8 ± 1   |
| <b>EH<sub>2</sub>O I</b>   | 98,7 ± 1,8                | 99,4 ± 1,2 | 99,6 ± 0,8 |
| <b>EH<sub>2</sub>O II</b>  | 96,7 ± 0,7                | 96,1 ± 0,6 | 96,6 ± 0,8 |
| <b>EH<sub>2</sub>O III</b> | 90,5 ± 0,1                | 80,4 ± 0,1 | 93 ± 0,2   |
| <b>EB1</b>                 | 97,6 ± 2,4                | 100 ± 0,3  | 93 ± 0,2   |
| <b>EB2A</b>                | 89,8 ± 0,2                | 91,1 ± 5,7 | 80,1 ± 0,9 |
| <b>EB2B</b>                | SA                        | SA         | SA         |
| <b>EB3M</b>                | 90,9 ± 0,4                | 94,5 ± 0,3 | 91,5 ± 0,7 |

EMeOH 9H-B: extrato metanólico da biomassa; EAcOEt 9H-LM: extrato acetoetílico do líquido metabólico; EMeOH 9H-FS: extrato metanólico da fermentação em meio sólido; EHex: extrato hexânico; EAcOEt: extrato acetoetílico; EBuOH: extrato butanólico; EH<sub>2</sub>O I: extrato aquoso I; EH<sub>2</sub>O II: extrato aquoso II; EH<sub>2</sub>O III: extrato aquoso III; EB1, EB2A, EB2B e EB3M: frações provenientes do extrato butanólico. SA: sem atividade; pouca atividade: 1 ≥ 50%; moderada atividade: 50 ≥ 75%; alta atividade: 75 ≥ 100%.

A análise da citotoxicidade pelo teste do MTT é um método rápido e sensível que apresenta a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. Esse método vem sendo utilizado no programa de screening do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano. O NCI, inicialmente, realizou um screening em três linhagens de células tumorais que seleciona os compostos a serem testados em outras 60 linhagens. Essa triagem inicial detecta mais de 95% dos compostos ativos nas 60 linhagens (CRAGG; NEWMAN, 2000; SKEHAN et al., 1990).

Neste trabalho, todas as partições e as frações EB1, EB2A e EB3M apresentaram uma inibição do crescimento celular acima de 80%, e seus valores de IC<sub>50</sub> (concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular) foram determinados

em quatro linhagens tumorais humanas: HEp-2, HT-29, NCI-H292 e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) (Tabela 10).

A partição com acetato de etila apresentou os valores mais baixos da  $IC_{50}$ , quando testados frente às linhagens HEp-2 (0,13  $\mu\text{g/mL}$ ), HT-29 (0,09  $\mu\text{g/mL}$ ) e NCI-H292 (0,19  $\mu\text{g/mL}$ ). A partição com butanol apresentou uma  $IC_{50}$  de 0,11  $\mu\text{g/mL}$  frente a HL-60. Dentre as frações, a EB1 se destacou com valores da  $IC_{50}$  menores ou iguais a doxorrubicina, utilizada como padrão. Essa fração mostrou uma maior seletividade pela HL-60 com uma  $IC_{50}$  de 0,009  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 10.** Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ) e o intervalo de confiança (IC 95%) das partições e frações em quatro linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.

| Amostras                   | $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) e IC 95% |               |               |              |
|----------------------------|-----------------------------------------|---------------|---------------|--------------|
|                            | HEp-2                                   | HT-29         | NCI-H292      | HL-60        |
|                            | 1,3                                     | 3,62          | 5,11          | 3,92         |
| <b>EHex</b>                | 1,02 - 1,68                             | 2,36 - 5,54   | 3,97 - 6,58   | 3,0 - 5,14   |
|                            | 0,13                                    | 0,09          | 0,19          | 0,16         |
| <b>EAcOEt</b>              | 0,08 - 0,19                             | 0,04 - 0,23   | 0,13 - 0,3    | 0,12 - 0,2   |
|                            | 0,21                                    | 0,4           | 0,62          | 0,11         |
| <b>EBuOH</b>               | 0,12 - 0,36                             | 0,11 - 1,52   | 0,32 - 1,21   | 0,03 - 0,4   |
|                            | 0,69                                    | 0,69          | 1,55          | 0,14         |
| <b>EH<sub>2</sub>O I</b>   | 0,45 - 1,04                             | 0,28 - 1,7    | 1,18 - 2,04   | 0,06 - 0,3   |
|                            | 0,7                                     | 3,31          | 5,22          | 3,23         |
| <b>EH<sub>2</sub>O II</b>  | 0,52 - 0,96                             | 1,78 - 6,17   | 3,64 - 7,48   | 2,56 - 4,06  |
|                            | 0,19                                    | 1,18          | 1,38          | 0,98         |
| <b>EH<sub>2</sub>O III</b> | 0,07 - 0,53                             | 0,73 - 1,9    | 1,15 - 1,66   | 0,83 - 1,17  |
|                            | 0,02                                    | 0,08          | 0,01          | 0,009        |
| <b>EB1</b>                 | 0,01 - 0,03                             | 0,06 - 0,12   | 0,003 - 0,07  | 0,004 - 0,01 |
|                            | 0,69                                    | 2,9           | 6,76          | 6,74         |
| <b>EB2A</b>                | 0,58 - 0,82                             | 1,85 - 4,52   | 5,06 - 9,04   | 5,45 - 8,34  |
|                            | 2,92                                    | 14,73         | 25,7          | 10,22        |
| <b>EB3M</b>                | 2,11 - 4,04                             | 11,31 - 19,18 | 18,09 - 36,49 | 5,46 - 19,12 |
|                            | 0,7                                     | 0,4           | 0,01          | 0,02         |
| <b>Doxorrubicina</b>       | 0,3 - 1,4                               | 0,3 - 0,5     | 0,004 - 0,3   | 0,01 - 0,02  |

EHex: extrato hexânico; EAcOEt: extrato acetatoetílico; EBuOH: extrato butanólico; EH<sub>2</sub>O I: extrato aquoso I; EH<sub>2</sub>O II: extrato aquoso II; EH<sub>2</sub>O III: extrato aquoso III; EB1, EB2A, EB2B e EB3M: frações provenientes do extrato butanólico.

De acordo com os critérios do NCI, um extrato bruto é considerado promissor para purificação posterior quando apresenta uma  $IC_{50}$  inferior a 30  $\mu\text{g/mL}$  (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). As partições e frações testadas apresentaram valores de  $IC_{50}$  abaixo do valor determinado pelo NCI para todas as linhagens testadas.

A boa atividade citotóxica das frações pode ser atribuída a presença de alcalóides que são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e biologicamente ativos. Isso porque ao longo dos últimos anos, um grande número de alcalóides com atividades anticâncer têm sido isolados de plantas, animais e micro-organismos, como as actinobactérias (BALLAV; DASTAGER; KERKAR, 2012; KUMAR; RAWAT, 2011).

Ravikumar; Fredimoses; Gnanadesigan (2012) avaliaram a atividade citotóxica do extrato acetoetílico do líquido metabólico de *Streptomyces* sp. ACT 01, em linhagens de câncer mama (MCF7 e MDA-231). O extrato apresentou atividade contra MCF7 com  $IC_{50}$  inferior a 30  $\mu\text{g/mL}$ . Nesse extrato foi detectada a presença de alcalóides.

O fracionamento bioguiado do extrato acetoetilico do líquido metabólico de uma actinobactéria marinha conduziu ao isolamento de dois alcalóides indolocarbazólicos conhecidos, K252 e arciriaflavina, que exibiram atividade citotóxica contra K562 (leucemia mielóide crônica). K252 e arciriflavina induziu a morte celular por apoptose na concentração de 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente (LIU et al., 2007).

Alcalóides de piperidina são componentes típicos de plantas e raramente isolados a partir de fontes microbianas. Puder; Krastel; Zeeck (2000) isolaram cinco novos alcalóides de piperidina, denominados streptazones A, B1, B2, C, e D, a partir do líquido metabólico de *Streptomyces* sp. FORM5 e A1. O streptomone A mostrou citotoxicidade significativa quando testado contra MCF7, HMO2 (adenocarcinoma do estômago), Hep G2 (carcinoma hepatocelular), Kato III (carcinoma do cólon).

Na literatura também há inúmeros trabalhos relatando a atividade citotóxica de metabólitos produzidos por *Streptomyces hygroscopicus*. Igarashi et al. (2006) isolaram de *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451 um novo composto citotóxico, pterocidina, que apresentou atividade contra NCI-H522 (câncer de pulmão), OVCAR-3 (carcinoma de ovário), SF539 (glioblastoma) e LOX-IMVI (melanoma) com valores de  $IC_{50}$  entre 2,9 e 7,1  $\mu\text{M}$ .

Himastatina isolada da fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 mostrou citotoxicidade contra HCT-116 (câncer colorretal) com  $IC_{50}$  de 9,7  $\mu\text{g/mL}$  (LEET et al., 1995). Enquanto, cletramicina isolada de *Streptomyces*

*hygroscopicus* TP-A0623 exibiu citotoxicidade moderada contra HeLa (carcinoma do colo do útero) (FURUMAI et al., 2003).

Um novo análogo de geldanamicina isolado da fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* A070101 apresentou citotoxicidade contra MCF-7, SK-MEL-2 (melanoma) e CR-L23 (carcinoma pulmonar) com IC<sub>50</sub> respectivamente de 142; 496 e 278 nM (ZHANG et al., 2010). *Streptomyces hygroscopicus* K309-27-1 modificado geneticamente produziu dois novos derivados de geldanamicina que apresentaram atividade contra SKBR-3 (câncer de mama) com IC<sub>50</sub> de 280 e 481 nM, resultado 10 a 20 vezes mais elevado que o derivado de geldanamicina utilizado atualmente em ensaios clínicos (BUCHANAN et al., 2005).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitiu concluir que:

- A actinobactéria ACTMS-9H é *Streptomyces hygroscopicus*;
- A fermentação em meio sólido de arroz parbolizado apresentou melhor rendimento que a fermentação em cultivo submerso em meio farinha de soja (MPE). Entretanto, as atividades antimicrobiana e citotóxica mostraram que os metabólitos provenientes do cultivo submerso apresentaram melhores resultados;
- A prospecção química em cromatografia em camada delgada indicou a presença de alcalóides, açúcares redutores e saponinas nos extratos metanólicos da biomassa e butanólico; alcalóides e açúcares redutores no extrato aquoso III e alcalóides, açúcares redutores, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides no extrato acetoetílico do líquido metabólico;
- Quatro frações obtidas em cromatografia em coluna *flash* quando analisadas por bioautografia apresentaram pelo menos um composto com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, havendo na fração EB1, no teste qualitativo, a presença de um alcalóide ( $R_f$  0,7) com atividade antimicrobiana;
- A atividade antimicrobiana da fração EB1 mostrou valores da CMI iguais ou abaixo de 3,9  $\mu\text{g/mL}$  frente a bactérias Gram-positivas, bactéria álcool ácido-resistente, leveduras e fungos filamentosos;
- Atividade citotóxica da fração EB1 apresentou valores da  $IC_{50}$  frente às linhagens tumorais humanas HEP-2, HT-29, NCI-H292 e HL-60, sempre menores ou iguais a doxorrubicina, utilizada como padrão, sendo mais seletividade para HL-60 com uma  $IC_{50}$  de 0,009  $\mu\text{g/mL}$ .

## REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, A.; KAMPFER, P. Growth and morphological appearance of thermotolerant and thermophilic actinomycetes. **Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft**, v. 60, n. 4, p. 139-145, 2000.
- ALENZI, F. Q.; LOTFY, M.; WYSE, R. KH. Swords of cell death: caspase activation and regulation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 271-280, 2010.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, n.48, p. 589-601, 1988.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v.1, p. 1-7, 2010.
- ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 51, p. 797-814, 2001.
- ÂNGELO, P. C. S. et al. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 117–124, 2008.
- ANIBOU, M.; CHAIT, A.; ZYAD, A.; TAOURIT, M.; OUHDOUCH, Y.; BENHERREF, A. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 24, p. 2019–2025, 2008.
- ANTAL, N.; FIEDLER, H.; STACKEBRANDT, E.; BEIL, W.; STROCH, K.; ZEECK, A. Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. TU6368. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 2, p. 95-102, 2005.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. R. M.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X.; DIAS, C. S. DIAS; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- ANZAI, K.; OHNO, M.; NAKASHIMA, T.; KUWAHARA, N.; SUZUKI, R.; TAMURA, T.; KOMAKI, H.; MIYADOH, S.; HARAYAMA, S.; ANDO, K. Taxonomic distribution of *Streptomyces* species capable of producing bioactive

compounds among strains preserved at NITE/NBRC. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 287-295, 2008.

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

ATLAS, R. M. **Principles of Microbiology**. 2nd Edn. WCB Publishers, Dubuque, 2004, p. 1035-1045.

ATTA, H. M.; HAROUN, B. M.; KHALIFA, M. A. Physico-chemical characteristics of vernamycin-A antibiotic biosynthesis by streptomyces SP-AZ-SH-29. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 247–255, 2011.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, 2004.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**. v. 24, p. 1225-1244, 2007.

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

BAXEVANIS, C. N.; PEREZ, S. A.; PAPAMICHAIL, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 58, p. 317-324, 2009.

BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio: reverter o câncer. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 184, p. 50-57, 2002.

BENEZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.

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

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**, v. 15, n. 9-10, p. 60-63, 2003.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 8, n. 2, p. 2008-215, 2005.

BICAS, J. L.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4518–4531, 2009.

BITTENCOURT, H. N. S.; BRUNSTEIN, C. G. Fármacos antineoplásicos. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 502-531.

BORGES, K. B.; BORGES, W. D. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, M. T. PUPO; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron**, v. 20, n. 4, p. 385–397, 2009.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BOUIZGARNE, B.; LANOOT, B.; LOQMAN, S.; SPROER, C.; KLENK, H. P.; SWINGS, J.; OUHDOUCH, Y. *Streptomyces marokkonensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Argania spinosa* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2857–2863, 2009.

BRUCE, A. C. Anticancer drugs. In Devitta VT, Hellman S, Rosenberg SA (Ed.), **Cancer, principles and Practice of Oncology**. Philadelphia: Lippincott, 1993, p. 325-340.

BUCHANAN, G. O.; REGENTIN, R.; PIAGENTINI, M.; RASCHER, A.; MCDANIEL, R.; GALAZZO, J. L.; LICARI, P. J. Production of 8-demethylgeldanamycin and 4,5-epoxy-8-demethylgeldanamycin from a recombinant strain of *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 607-610, 2005.

BULL, A. T. **Microbial Diversity and Bioprospecting**. 1 ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, 2004.

BUTLER, M; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford: Blackwell, 1992.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475–516, 2008.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A risosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, P.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992, p. 41-57.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Definition of MRSA. Disponível em <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 12 de março de 2011.

CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos: considerações gerais. In: GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc-Graw Hill, 2003. p. 859-875.

CHAROENSOPHARAT, K.; THUMMBENJAPONE, P.; SIRITHORN, P.; THAMMASIRIRAK, S. Antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. No 87. **African Journal of Biotechnology**, v. 7 , n. 9, p. 1362-1368, 2008.

CHATER, K. F.; HORINOUCI, S. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 9-15, 2003.

CHATER, K. F.; MERRICK, M. J. “*Streptomyces*” In: Parish, J. H. **Developmental Biology of Prokaryotes**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1979.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2684–2691, 2011.

CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 361, n. 1469, p. 761-768, 2006.

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

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

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twentieth Informational Supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi**. Approved standard: M27-A3 e M38-A2. Wayne (PA): CLSI, 2008.

COOK, A. E.; MEYERS, P. R. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1907–1915, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 12, p. 1-15, 2000.

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

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

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, p. 259–264, 1998.

DEMAIN, A. L. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: DEMAI, A. L. **Secondary metabolites:**

**theirs function and evolution.** Chichester; J. Wiley. 1992. p. 3-23 (Ciba Foundation Symposium, 171)

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug Discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DEVEREUX, R.; HINES, M. E.; STAHL, D. A. A cycling: characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons. **Microbial Ecology**, v. 32, n.3, p. 283-292, 1996.

DREWS, G. Ferdinand Cohn: a promoter of modern microbiology. **Nova Acta Leopoldina**, v. 80, p. 13-43, 1999.

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

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

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 12, p. 666-673, 2006.

FISCHER, P. M.; GLOVER, D. M.; LANE, D. P. Targeting the cell cycle. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, p. 417-423, 2004.

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

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455-461, 2008.

FURUMAI, T.; YAMAKAWA, T.; YOSHIDA, R.; IGARASHI, Y. Clethramycin, a new inhibitor of pollen tube growth with antifungal activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623. I. Screening, taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v. 56, n. 8, p. 700-704, 2003.

GADELHAK, G. G.; EL-TARABILY, K. A.; AL-KAABI, F. K. Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 7, n. 4, p. 627-633, 2005.

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

GAO, B.; GUPTA, R. S. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2401-2412, 2005.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 2004.

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. **Microbiological Research**, v. 160, p. 243-248, 2005.

GESHEVA, V. Optimization of the production medium for biosynthesis of antifungal antibiotic Ak-111-81 by phosphate-deregulated mutant of *Streptomyces hygroscopicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 158, p. 20-24, 2009.

GOLDSTEIN, B. P.; SELVA, E.; GASTALDO, L.; BERTI, M.; PALLANZA, R.; RIPAMONT, F.; FERRARI, P.; DENARO, M.; ARIOLI, V.; CASSANI, G. A40926, a new glycopeptide antibiotic with Anti-*Neisseria* activity. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 12, p. 1961-1966, 1987.

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

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

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

HAFIDH, R. R.; ABAS, F.; ABDULAMIR, A. S.; JAHANSHIRI, F.; BAKAR, F. A.; SEKAWI, Z. A Review: Cancer Research of Natural Products in Asia. **International Journal of Cancer Research**, v. 5, p. 69-82, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

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

HATSU, M.; SASAKI, T.; MIYADOH, S.; WATABE, H.; TAKEUCHI, Y.; KODAMA, Y.; OIKASA, Y.; KAJII, K.; SHOMURA, T.; YAMAMOTO, H.; SEZAKI, M.; INOUE, S.; KONDO, S. SF2487, a new polyether antibiotic produced by *Actinomadura*. **Journal of Antibiotics**, v. 43, n. 3, p. 259-266, 1990.

HE, H.; WILLIAMSON, R. T.; SHEN, B.; GRAZIANI, E. I.; YANG, H. Y.; SAKYA, S. M.; PETERSEN, P. J.; CARTER, G. T. Mannopeptimycins, novel antibacterial glycopeptides from *Streptomyces hygroscopicus*, LL-AC98. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 9729-9736, 2002.

HEMACHANDRAN, K.; BHARATHI, S.; RADHAKRISHNAN, M.; BALAGURUNATHAN, R. Studies on extended beta lactamase producing, biofilm forming clinical bacterial pathogens and its *invitro* inhibition by actinobacterial extracts. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.8, p. 210-213, 2011.

HOPWOOD, D. A. ***Streptomyces in Nature and medicine: the antibiotics makers***. Oxford University Press, New York, 2007.

HOSSAIN, M. S.; HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, M. M.; MONDOL, M. A. M.; BHUIYAN, M. S. A.; GRAY, A. I.; FLORES, M. E.; RASHID, M. A. Amides from the fungus *Streptomyces hygroscopicus* and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2147-2151, 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 17 de setembro de 2011.

IGARASHI, Y.; MIURA, S. S.; FUJITA, T.; FURUMAI, T. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 3, p. 193-195, 2006.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acessado em: 20 de julho de 2012.

KALTENPOTH, M.; GOTTLER, W.; HERZNER, G.; STROHM, E. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. **Current Biology**, v. 15, n. 5, p. 475-479, 2005.

KATZUNG, G. B. **Basic and Clinical Pharmacology**, 9th edn., McGraw-Hill Medical, United States of America, 2003.

KAVITHA, A.; PRABHAKAR, P.; VIJAYALAKSHMI, M.; VENKATESWARLU, Y. Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL\_333. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 335-345, 2010.

KAWAMOTO, I.; TAKASAWA, S.; OKACHI, R.; KOHAKURA, M.; TAKAHASHI, I.; NARA, T. A new antibiotic victomycin (XK 49-1-B-2) I. Taxonomy and production of the producing organism. **Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 5, p. 358-365, 1975.

KEKUDA, T. R. P.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Studies on antioxidant and anthelmintic activity of two *Streptomyces* species isolated from Western Ghat soils of Agumbe, Karnataka. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 1, p. 26-29, 2010.

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

KERN, M. E., BLEVINS, K. S. **Micologia médica - Texto e Atlas**. 2 ed, São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KIM, B. S.; MOON, S. S.; HWANG, B. K. Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. **Canadian Journal of Botany**, v. 77, n. 6, p. 850-858, 1999.

KITA, K.; SHIOMI, K.; OMURA, S. Advances in drug discovery and biochemical studies. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 5, p. 223-229, 2007.

KUMAR, D.; RAWAT, D. S. Marine natural alkaloids as anticancer agents. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, p. 213-268, 2011.

KUMAR, S. S.; PHILIP, R.; ACHUTHANKUTTY, C. T. Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps. **Current Science**, v. 91, n. 6, p. 807-811, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**, 7th edn., WB Saunders, China, 2004, p. 1552.

KURI, C. M. B. The guarana industry in Brazil. **International Business & Economics Research Journal**, v. 7, n. 5, p. 87-98, 2008.

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

LAM, K. S.; HESLER, G. A.; MATTEI, J. M.; MAMBER, S. W.; FORENZA, S. Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus*. I. Taxonomy of producing organism, fermentation and biological activity. **Journal of Antibiotics**, v. XLIII, n. 8, p. 956-960, 1990.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of Antibiotic and Other Bioactive Microbial Metabolites**. Plenum Press: New York, 1993.

LECHEVALIER, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Williams e Wilkins, v.4, 1989.

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

LEE, J. L.; HWABG, B. K. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 407-417, 2002.

LEE, S. J.; KIM, H. P.; PARK, B. K.; AHN, S. C.; LEE, H. S.; AHN, J. S. Topical anti-inflammatory activity of dianemycin isolated from *Streptomyces* sp. MT 2705-4. **Archives of Pharmacal Research**, v. 20, n. 4, p. 372-374, 1997.

LEET, E.; SCHROEDER, D. R.; GOLIK, J.; MATSON, J. A.; DOYLE, T. W.; LAM, K. S.; HILL, S. E.; LEE, M. S.; WHITNEY, J. L.; KRISHNAN, B. S. Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus*. III. Structural elucidation. **Journal of Antibiotics**, v. 49, n. 3, p. 299-311, 1995.

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

LIU, H.; QIN, S.; WANG, Y.; LI, W.; ZHANG, J. Insecticidal action of quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2243-2248, 2008.

LIU, R.; ZHU, T.; LI, D.; GU, J.; XIA, W.; FANG, Y.; LIU, H.; ZHU, W.; GU, Q. Two indolocarbazole alkaloids with apoptosis activity from a marine-derived actinomycete Z2039-2. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n.3, p. 270-274, 2007.

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

MANTOVANI, A. Inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, p. 36-37, 2009.

MEHRAVAR, M.; SARDARI, S.; OWLIA, P. Screening of membrane active antimicrobial metabolites produced by soil actinomycetes using membrane models. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 1, n. 4, 2010.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, p.56- 65, 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. **Recombinant DNA - Part F**. In: A polymerase catalyzed chain reaction, San Diego: Academic Press, 1987, p. 335-350.

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**, v. 88, p. 1-10, 2001.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acessado em: 24 de outubro de 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, n. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p.1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NONOMURA, H. Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. **Journal of Fermentation Technology**, v. 52, p. 78-92, 1974.

NOROVSUREN, Z. H.; OBOROTOV, G. V.; ZENOVA, G. M.; ALIEV, R. A.; ZVYZGINTSEV, D. G. Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes. **Biological Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 505-507, 2007.

OGUNMWONYI, I. N. H. Actinomycetes diversity of Tyume River and Nahoon beach. Honours dissertation submitted to Department of Biochemistry and Microbiology, University of Fort Hare, Alice South Africa, 2008.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 2, 144-164, 2011.

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

OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. O.; SOUZA, I. A. S.; CORNEJO, L. C. Atividade antifúngica e cinética de morte microbiana de extratos obtidos de *Streptomyces* spp. isolados de solos paraibanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 60-64, 2010.

PARK, J. O.; EL-TARABILY, K. A.; CHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Patogénese of *Streptoverticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 361-365, 2002.

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

PEREIRA, J. C. **Populações de actinomicetos como compostos da comunidade bacteriana nos solos**. Disponível em: <[www.cnpad.gov.br](http://www.cnpad.gov.br)>. Acessado em 19 de março de 2010.

PERVAIZ, S. Anti-cancer drugs of today and tomorrow: are we close to making the turn from treating to curing cancer? **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 19, p. 1723-1734, 2002.

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

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M.; MOLL, H.; HENTSCHEL, U. Anti-Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from mediterranean sponges. **Marine Drugs**, v. 8, p. 373-380, 2010.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 330-337, 2008.

PUDER, C.; KRASTEL, P.; ZEECK, A. Streptazones A, B1, B2, C, and D: new piperidine alkaloids from *Streptomyces*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.9, p. 1258-1260, 2000.

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

RAMÍREZ, N. D.; SERRANO, J. A. R.; SANDOVAL, H. T. Microorganismos extremófilos. actinomicetos halófilos em México. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 56-71, 2006.

RAVIKUMAR, S.; FREDIMOSSES, M.; GNANADESIGAN, M. Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 92-96, 2012.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.

REDDY, V. P. V.; RAO, S. N. S. S.; PRATIBHA, M. S.; SAILAJA, B.; KAVYA, B.; MANORAMA, R. R.; SINGH, S. M.; SRINIVAS, R. T. N.; SHIVAJI, S. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Lovenbreen glacier, an Arctic glacier. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 8, p. 538-546, 2009.

REMYA, M.; VIJAYAKUMAR, R. Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. **Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology**, v. 15, n. 1, p. 13-19, 2008.

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

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

ROBBINS; COTRAN. Patologia - **Bases Patológicas das Doenças**. 7ª ed., Elsevier – Campus, 2005.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284-289, 2001.

RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

RONG, X.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 7-18, 2012.

SACRAMENTO, D. R.; COELHO, R. R. R.; WIGG, M. D.; LINHARES, L. F. T. L.; SANTOS, M. G. M. S.; SEMÊDO, L. T. A. S.; SILVA, A. J. R. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 225-229, 2004.

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

SAKAI, T.; SAMEISHIMA, T.; MATSUFUJI, M.; KAWAMURA, N.; DOBASHI, K.; MIZUI, Y. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. I. Taxonomy, fermentation, isolation and screening. **Journal of Antibiotics**, v. 57, n. 3, p. 173-179, 2004.

SCHECK, A. C.; PERRY, K.; HANK, N. C.; CLARK, CLARK, W. D. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2006, v. 6, n. 27 p. 1-9, 2006.

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

SEIXAS, R. J.; KESSLER, A.; FRISON, V. B. Atividade física e qualidade de vida em pacientes oncológicos durante o período de tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 3, p. 321-330, 2010.

SELVAMEENAL, L.; RADHAKRISHNAN, M.; BALAGURUNATHAN, R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 499-504, 2009.

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

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

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

SHINICHI, K.; WATANABE, H.; HERSKETH, A.; ENSIGN, J. C; OCHI, K. Expression analysis of the ssAg gene product, associated with sporulation and cell division in *Streptomyces griseus*. **Microbiology**, v. 143, p. 1077-1086, 1997.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 6, n.3, p. 313-340, 1966.

SILVA, J. M. **Isolamento de actinobactérias do solo da região Maués/AM e avaliação do potencial antimicrobiano**. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) - Faculdade de Formação de Professores de Nazaré da Mata, Universidade de Pernambuco, Recife, 2010.

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

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer - drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, n. 82, v. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural products in advances clinical trials applied to câncer. **Revista Fitos**, v.3, p. 25-41, 2007.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. Proposal for a new hierarchic classification system, actinobactéria class nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n.2, p. 479-491, 1997.

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

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

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Academic Press, London 6, 1990, p. 71–133.

SUN, C.; WANG, Y.; WANG, Z.; ZHOU, J.; JIN, W.; YOU, X.; GAO, H.; ZHAO, L.; SI, S.; LI, X. Chemomicin A, a new angucyclinone antibiotic produced by *Nocardia*

*mediterranei* subsp. *kanglensis* 1747-64. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 3, p. 211-215, 2007.

SUZUKI, K.; NAGALI, K.; SUZUKI, Y. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. **Actinomycetologia**, v. 8, n. 2, p. 122-127, 1994.

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

TAECHOWISAN, T.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S.; TAYLOR, W. C. Anti-inflammatory activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW 264.7 Cells. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 2, p. 203- 211, 2007.

TALBOT, G. H.; BRADLEY, J.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; SCHELD, M.; BARTLETT, J. G. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p. 657-668, 2006.

TANAKA, Y.; KOMAKI, H.; YAZAWA, K.; MIKAMI, Y. Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: producing strain, isolation and biological activity. **Journal of Antibiotics**, v. 50, n. 12, p. 1036-1041, 1997.

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

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

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. **Tetrahedron**, v. 64, p. 7583–7586, 2008.

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

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VIERSTRAETE, A. 1999. Disponível em <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Acessado em 27 de julho de 2012.

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

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

WANG, Z.; SUN, Y. Targeting p53 for novel anticancer therapy. **Translational Oncology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2010.

WEINBERG, R. A. p53 e apoptose: guardião e executor. In: WEINBERG, R. A. (Ed.). **A biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; GENE-TRAK, D. J. L. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H. A.; SACKIN, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, v. 129, n.6, p. 174-1813, 1983.

WILLIAMS, S. T.; SHARP, M. E.; HOLT, J. G. (1989) **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol 4. Williams and Wilkins, Baltimore, p 2492–2504.

WU, Y.; LU, C.; QUIN, X.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants. **Current Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 475-482, 2009.

YAN, Y.; ZHANG, H.; LIU, L.; XIAN, H.; CUI, D. Isolation and identification of dominant microorganisms in rhizosphere of continuous cropping with peanut. **College of Life Science**, v. 51, n. 6, p. 835-42, 2011.

YE, L.; ZHOU, Q.; LIU, C.; LUO, X.; NA, G. XI, T. Identification and fermentation optimization of a marine-derived *Streptomyces Griseorubens* with anti-tumor activity. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 38, n. 1, p. 14-31, 2009.

YU, Y.; LI, H.; ZENG, Y.; CHEN, B. Phylogenetic diversity of culturable bacteria from Antarctic Sandy intertidal sediments. **Polar Biology**. v. 33, p. 869–875, 2010.

ZAKALYUKINA, YU. V.; ZENOVA, G. M.; ZVYAGINTSEV, D. G. Acidophilic soil actinomycetes. **Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 342-345, 2002.

ZHANG, H.; SUN, G. Z.; LI, X.; PAN, H. Y.; ZHANG, Y. S. A new geldanamycin analogue from *Streptomyces hygroscopicus*. **Molecules**, v. 15, p. 1161-1167, 2010.

ZHANG, N.; SUN, C.; SONG, Z.; GUO, H.; ZHANG, B.; QIU, N.; LIU, X. Isolation, purification and characterization of antifungal substances from *Streptomyces hygroscopicus* BS-112. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 51, n. 2, p. 224-232, 2011.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTROM, K.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; STROBEL, G. A. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. **Current Microbiology**, v. 62, n.1, p. 182–190, 2011.

ZHENG, Z.; ZENG, W.; HUANG, Y.; YANG, Z.; LI, J.; CAI, H.; SU, W. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan strait, China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n.1, p. 87-91, 2000.

ZHONG, K.; GAO, X. L.; XU, Z. J.; GAO, H.; FAN, S.; YAMAGUCHI, I.; LI, L. H.; CHEN, R. J. Antioxidant activity of a novel *Streptomyces* strain Eril2 isolated from the rhizosphere of *Rhizoma curcumae* Longae. **Current Research in Bacteriology**, v. 4, n. 2, p. 63-72, 2011.

ZILLI, J.E.; VIEIRA, B.A.H; NECHET, K.L. **Novas oportunidades para exploração da biodiversidade na Amazônia**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_3/biodiversidade/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_3/biodiversidade/index.htm)>. Acessado em: 14 de outubro de 2011.

**APÊNDICE A – Meio de Cultura Utilizado para Identificação da Actinobactéria**  
**ACTMS-9H**

**ALA - Arginina - Levedura - Ágar**

|                                           |         |
|-------------------------------------------|---------|
| L-arginina.....                           | 0,3 g   |
| Glicose.....                              | 1 g     |
| Glicerol.....                             | 1 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....     | 0,3 g   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,2 g   |
| NaCl.....                                 | 0,3 g   |
| Extrato de levedura.....                  | 1 g     |
| Ágar.....                                 | 15 g    |
| Solução de sais.....                      | 1 mL    |
| Água destilada.....                       | 1000 mL |
| pH 6,4                                    |         |

**Solução de traços de sais**

|                                            |        |
|--------------------------------------------|--------|
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....  | 0,1 g  |
| MnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O..... | 0,1 g  |
| ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O..... | 0,1 g  |
| Água destilada.....                        | 100 mL |

**ISP-1 - Triptona - Extrato de levedura - Ágar**

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Triptona.....       | 0,3 g   |
| Ágar.....           | 15 g    |
| Água destilada..... | 1000 mL |
| pH 7,0 -7,2         |         |

**ISP-2 - Extrato de malte - Extrato de levedura - Ágar**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Extrato de levedura..... | 4 g     |
| Extrato de malte.....    | 10 g    |
| Glicose.....             | 4 g     |
| Ágar.....                | 15 g    |
| Água destilada.....      | 1000 mL |

pH 7,2

**ISP-3 - Farinha de aveia - Ágar**

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| Farinha de Aveia.....          | 20 g    |
| Ágar.....                      | 18 g    |
| Solução de traços de sais..... | 1 mL    |
| Água destilada.....            | 1000 mL |

pH 7,2

**ISP-4 - Sais inorgânicos - Amido - Ágar**

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| Amido solúvel.....                                    | 20 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                 | 2 g     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....             | 2 g     |
| NaCl.....                                             | 2 g     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 4 g     |
| CaCO <sub>3</sub> .....                               | 4 g     |
| Ágar.....                                             | 15 g    |
| Solução de traços de sais.....                        | 2 mL    |
| Água destilada.....                                   | 1000 mL |

PH 7,0 – 7,4

**ISP-5 - Glicerol - Asparagina - Ágar**

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| L-asparagina.....                     | 1 g     |
| Glicerol.....                         | 10 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1 g     |
| Ágar.....                             | 15 g    |
| Solução de traços de sais.....        | 1 mL    |
| Água destilada.....                   | 1000 mL |

PH 7,0 – 7,4

**ISP-6 - Peptona - Extrato de ferro - Ágar**

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| Peptona.....                         | 15 g  |
| Protease peptona.....                | 5 g   |
| Citrato de ferro (ico) e amônio..... | 0,5 g |

|                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                                     | 1 g     |
| Tiosulfato de sódio (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> )..... | 0,08 g  |
| Extrato de levedura.....                                                  | 1 g     |
| Ágar.....                                                                 | 15 g    |
| Água destilada.....                                                       | 1000 mL |
| PH 7,0 – 7,2                                                              |         |

#### **ISP-7 - Tirosina - Ágar**

|                                           |         |
|-------------------------------------------|---------|
| Glicerol.....                             | 15 g    |
| L-tirosina.....                           | 0,5 g   |
| L-asparagina.....                         | 1 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....     | 0,5 g   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,5 g   |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,5 g   |
| NaCl.....                                 | 0,01 g  |
| Ágar.....                                 | 15 g    |
| Água destilada.....                       | 1000 mL |
| PH 7,0 – 7,2                              |         |

#### **Meio Base para a Utilização de Fontes de Carbono**

|                                                       |         |
|-------------------------------------------------------|---------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 2,64 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....                 | 2,38 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                 | 5,65 g  |
| MgSO <sub>4</sub> .....                               | 1 g     |
| Solução I.....                                        | 1 mL    |
| Ágar.....                                             | 15 g    |
| Água destilada.....                                   | 1000 mL |

#### **Solução I – Solução de Pridham and Gottlieb**

|                                           |        |
|-------------------------------------------|--------|
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O..... | 0,64 g |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,11 g |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O..... | 0,79 g |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,15 g |
| Água destilada.....                       | 100 mL |

Obs: Fonte de carbono a ser testada adiciona-se 1mL de uma solução 10% (concentração final de 1%); Controle positivo adiciona-se 1mL de uma solução de glicose 10% (concentração final 1%); Controle negativo não é adicionada nenhuma fonte de carbono.

Para cisteína e valina colocou-se uma concentração menor de glicose 0,2% no meio basal devido à alteração completa do meio de cultura em poucos dias de incubação.

### **Meio Base para a Utilização de Fontes de Nitrogênio**

|                                           |         |
|-------------------------------------------|---------|
| Glicose.....                              | 10 g    |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,05 g  |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O..... | 0,001 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....     | 0,1 g   |
| Azul de bromotimol.....                   | 0,03 g  |
| Ágar.....                                 | 15 g    |
| Água destilada.....                       | 1000 mL |

Obs: Fontes de nitrogênio a ser testada adiciona-se 0,1g; Controle positivo tem 0,1g de L-asparagina ou prolina; Controle negativo não tem nitrogênio.

### **Caldo NaCl 2, 5, 7, 9 e 12%**

Caldo BHI (Biobrás) mais NaCl nas concentrações 2, 5, 7, 9 e 12%

Todos os meios de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave vertical durante 15 minutos a 121°C. O pH, quando necessário, foi ajustado com soluções de hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl). Apenas o meio base para a utilização de fontes de carbono foi submetido à esterilização durante 10 minutos a 105°C.

**APÊNDICE B – Soluções para o Estudo da Parede Celular****Solução de Ácido Clorídrico 6 N**

Ácido clorídrico..... 18,4 mL

Água destilada..... 100 mL

**Solução n-Butanol Saturado**

n-butanol..... 110 mL

Água destilada..... 30 mL

**Solução de Ninhidrina 0,2%**

Ninhidrina..... 0,2 g

Butanol saturado..... 100 mL

**Solução Padrão de Ácido Diaminopinélico (DAP)**

Ácido diaminopinélico..... 1,9 g

Butanol saturado..... 100 mL

**Solução para Cromatografia - Fase Móvel**

Álcool metílico..... 80 mL

Ácido clorídrico..... 4 mL

Piridina..... 10 mL

Água destilada..... 26 mL

**APÊNDICE C – Meios de Cultura Utilizados para Fermentação da Actinobactéria  
ACTMS-9H**

**MPE**

Farinha de soja ..... 20 g  
Glicose ..... 20 g  
CaCO<sub>3</sub> ..... 2 g  
NaCl ..... 5 g  
Água destilada ..... 1000 mL  
pH 6,7 - 7,0

**Meio Sólido de Arroz**

Arroz parbolizado ..... 90 g  
Água destilada ..... 90 mL

O meio MPE foi submetido à esterilização em autoclave vertical durante 15 minutos a 121°C, enquanto o meio sólido de arroz à esterilização durante 40 minutos.

## APÊNDICE D – Meios de Cultura Utilizados para Atividade Microbiana

### **BHI** - Brain Heart Infusion - Ágar

BHI ..... 5 g  
 Agar ..... 15 g  
 Água destilada ..... 1000 mL  
 pH 7,0 – 7,4

### **MH** - Mueller Hinton - Ágar

Extrato de carne ..... 5 g  
 Hidrolizado de caseína ou Peptona de caseína . 17,5 g  
 Amido ..... 1,5 g  
 Agar ..... 15 g  
 Água destilada ..... 1000 mL  
 pH 7,0

### **SAB** - Sabouraud - Ágar

Peptona ..... 10 g  
 Glicose ..... 40 g  
 Agar ..... 20 g  
 Água destilada ..... 1000 mL  
 pH 5,6