

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

LAÍS LUDMILA DE ALBUQUERQUE NERYS

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTICÂNCER DE
METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces sp.*

Recife

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

LAÍS LUDMILA DE ALBUQUERQUE NERYS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTICÂNCER DE
METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces sp.* UFPEDA 3407**

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. Área de Concentração: Microbiologia e Citotoxicidade.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva.

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Nerys, Laís Ludmila de Albuquerque

Avaliação das atividades antimicrobiana e anticâncer de metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp UFPEDA 3407 / Laís Ludmila de Albuquerque Nerys- Recife: O Autor, 2015.

67 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Jaciana dos Santos Aguiar

Coorientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biotecnologia, 2015.

Inclui referências, apêndice e anexo

1. Actinobactéria 2. Câncer 3. *Streptomyces* I. Aguiar, Jaciana dos Santos (orientadora) II. Silva, Teresinha Gonçalves da (coorientadora) III. Título

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-334

*ATA DA TRIGÉSIMA QUARTA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL DO CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA
24 DE FEVEREIRO 2015.*

Aos 24 (vinte e quatro) dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze (2015), às 14 horas, na sala de aula 3 do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, em sessão pública, teve início a defesa da Dissertação intitulada "Avaliação das atividades antimicrobiana e anticâncer de metabólitos produzidos por streptomyces sp" da aluna Laís Ludmila de Albuquerque Nerys, na área de concentração Produtos Bioativos, sob a orientação da Profa. Teresinha Gonçalves da Silva. A mestranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de MESTRE, em Biotecnologia Industrial. A Banca Examinadora foi indicada pelo colegiado do programa de pós-graduação em 29/01/2015, na sua Quadragésima Quinta Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.006578/2015-86 em (24/02/2015) composta pelos Professores: Teresinha Gonçalves da Silva, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco; Gláucia Manoella de Souza Lima, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco; Thatiana Montenegro Stamford Arnaud, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Dissertação. Concluída a explanação, a candidato foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder a mesma a menção Aprovada da referida Dissertação. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 24 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^{ra}. Teresinha Gonçalves da Silva

Prof^{ra}. Gláucia Manoella de Souza Lima

Prof^{ra} Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me dar forças para seguir diante dos obstáculos que foram surgindo ao longo do caminho.

A minha mãe, **Sara Nerys**, pelo apoio, investimentos e por tudo que sempre fez por mim.

As minhas orientadoras prof^a Dr^a **Teresinha Gonçalves da Silva** e Dr^a **Jaciana dos Santos Aguiar** pelas oportunidades oferecidas desde a graduação, paciência e ensinamentos.

As professoras Dr^a. **Janete Magali de Araújo** e Dr^a **Gláucia Manoella de Souza Lima** por terem me acolhido em seu laboratório, pela paciência e palavras de incentivo e ensinamentos.

Aos amigos do **Laboratório de Bioensaios e Pesquisa de Fármacos (LBPF)** pela ajuda direta e indireta nos experimentos, em especial **Sandrine Arruda, Bruno Iraquitã, Elizabeth Borba, Tonny Cley, Jéssica Barbosa e Larissa Cardoso**, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos amigos do **Laboratório Genética de Micro-organismos**, **Evelyn, Wanda, Nataliane**, por me auxiliarem na descontaminação, esterilização, meios de cultura,...

Aos amigos do **Laboratório de Processos Biotecnológicos**, **Iranildo, Vanessinha, Juliette, Monique e João pé-de-feijão**, que fizeram da rotina cansativa momentos de alegria.

Aos amigos da Pós-Graduação, mais que amigos uma nova família, **Raphael, Gabrielle, Nina, Sabrina, Carla, Samara, Hortência, Suellen e Heloise**. Sem o apoio e carinho de vocês não teria chegado tão longe.

As técnicas **Fátima e Marcela** pelo apoio.
Obrigada.

Laís Nerys

RESUMO

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas que se destacam pela sua grande potencialidade de produzir diversos metabólitos secundários bioativos de interesse científico e industrial. Mais de 50% dos metabólitos microbianos bioativos descobertos são produzidos, tais como antimicrobianos e antitumorais, pelas actinobactérias principalmente pelo gênero *Streptomyces*. O câncer é considerado um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo a segunda causa de morte no Brasil e no mundo. Diante da diversidade de tecnologias e pesquisas aplicadas no campo das neoplasias, ainda não há uma terapia eficaz para o tratamento de todos os tipos de câncer e os quimioterápicos utilizados atualmente apresentam elevada toxicidade. Neste contexto, o presente projeto objetivou avaliar o potencial antimicrobiano e anticâncer dos extratos brutos produzidos pela *Streptomyces* UFPEDA 3407. Após fermentação e extração dos metabólitos com diferentes solventes, foram realizados ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica nas diferentes linhagens de células cancerígenas humanas (HL- 60, HT-29 e MCF-7) e em eritrócitos murinos. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos da biomassa extraídos com acetona, etanol e metanol apresentaram um bom espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e leveduras. Nos ensaios de citotoxicidade, os mesmos extratos reduziram de maneira significativa a viabilidade das linhagens tumorais, mostrando resultados bastante promissores.

Palavras-chave: Actinobactérias; Câncer; *Streptomyces*

ABSTRACT

Actinomycetes are Gram-positive bacteria with high potential to produce various bioactive secondary metabolites of scientific and industrial interest. More than 50% of bioactive microbial metabolites discovered to date are produced by actinomycetes mainly by genus *Streptomyces*. Cancer is considered a major public health problem in developed and developing countries, and the second cause of death in Brazil and in the world. Given the diversity of technologies and applied research in the field of cancer, there is still no effective therapy for the treatment of all types of cancer and the chemotherapy drugs used today have high toxicity. In this context, this project aimed to evaluate the antimicrobial potential anticancer and crude extracts produced by *Streptomyces actinobacteria* UFPEDA 3407. After fermentation and extraction of metabolites with different solvents, tests were conducted to evaluate the antimicrobial and cytotoxic activity in different strains of human cancer cells (HL- 60, HT-29 and MCF-7) and murine erythrocytes. Partial results showed that the extracts of biomass extracted with acetone, ethanol and methanol had a good spectrum of action against Gram-positive bacteria and yeasts. In the cytotoxicity assays, the same extracts significantly reduced the viability of tumor cell lines, showing promising results.

Keywords: Actinobacteria; Cancer; *Streptomyces*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns antibióticos produzidos pelo gênero <i>Streptomyces</i> .	22
Tabela 2 - Taxas brutas da incidência de câncer em homens e mulheres para o ano de 2014, por região no Brasil.	25
Tabela 2 - Micro-organismos teste usados na atividade antimicrobiana.	29
Tabela 3 - Linhagens de células e seus respectivos meios de cultura.	35
Tabela 4 - Médias dos diâmetros e desvio padrão dos halos de inibição (mm) do bloco de gelose de <i>Streptomyces</i> sp. UFPEDA 3407 frente a diversos micro-organismos testes.	38
Tabela 5 - Média e desvio padrão dos halos de inibição (mm) do <i>Streptomyces</i> sp UFPEDA 3407 a cada 24 horas de fermentação.	39
Tabela 6 - Médias dos diâmetros e desvio padrão dos halos de inibição dos extratos da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. UFPEDA 3407 frente a diversos micro-organismos teste.	41
Tabela 7 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos estratos acetônico, etanólico e metanólico de <i>Streptomyces</i> sp UFPEDA 3407 em µg/mL.	43
Tabela 8 – Prospeção química por Cromatografia em Camada Delgada dos metabólitos secundários bioativos produzidos pela actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp UFPEDA 3407.	46
Tabela 9 - Percentual de inibição do crescimento celular (CI%) dos extratos e partições em seis linhagens tumorais testados na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.	49
Tabela 10 - Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI ₅₀) e o intervalo de confiança (CI 95%) do extrato bruto e partições em seis linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenças morfológicas de Actinobactérias.	13
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i> .	16
Figura 3. Produtos naturais utilizados na terapêutica.	22
Figura 4. Alguns fármacos obtidos a partir de produtos naturais utilizados na terapia antineoplásica.	23
Figura 5. Esquema da metodologia usada no teste do bloco de gelose	28
Figura 6. Fluxograma da extração do composto bioativo	31
Figura 7. Halos de inibição do bloco de gelose de <i>Streptomyces</i> sp. UFPEDA 3407	37
Figura 8. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) exibindo a presença de terpenos.	45
Figura 9. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) exibindo a presença de cumarina.	45
Figura 10. Placa exibindo halos de inibição da bioautografia.	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.2 ACTINOBACTÉRIAS	12
2.2.1 Características gerais das Actinobactérias	12
2.2.2 Identificação das Actinobactérias	14
2.2.3 Gênero <i>Streptomyces</i>	15
2.2.4 Metabólitos produzidos por Actinobactérias	17
2.2.4.1 Atividade antibacteriana e antifúngica	17
2.2.4.2 Atividade antiviral	18
2.2.4.4 Atividade anti-inflamatória	18
2.2.3.5 Atividade citotóxica	18
2.2.4.6 Atividade inseticida	18
2.2.4.8 Atividade promotora de crescimento vegetal	19
2.3 ANTIBIÓTICOS	19
2.3.1 Resistência Bacteriana aos Antibióticos	20
2.4 PRODUTOS NATURAIS E CÂNCER	21
2.3 CÂNCER	24
2.5.1 Aspectos gerais	24
2.5.2 Terapia antitumoral	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. METODOLOGIA	28
4.1 OBTENÇÃO DA ACTINOBACTÉRIA	28
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	28
4.2.1 Ensaio Primário	28
4.2.2 Ensaio Secundário	29
4.2.2.1 Fermentação em Cultivo Submerso	29
4.3 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO	30
4.3.1 Separação da massa celular	30
4.3.1.1 Extração do antibiótico – biomassa	31
4.3.1.2 Extração do antibiótico – líquido metabólico	31
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS	32
4.4.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	32
4.4.1.1 Leitura da Microplaca	33
4.4.2 Determinação da concentração mínima bactericida	

e fungicida (CMB/CMF)	33
4.5 PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS	33
4.5.1 Bioautografia	35
4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA	36
4.7 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	36
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - ENSAIO PRIMÁRIO	38
6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - ENSAIO SECUNDÁRIO	40
6.3 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO - BIOMASSA E LÍQUIDO METABÓLICO	41
6.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS	43
6.5 PROSPECÇÃO QUÍMICA	45
6.6 BIOAUTOGRAFIA	47
6.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA	49
6.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	52
7. CONCLUSÃO	53
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE - Meios utilizados nas culturas	66
ANEXO A - Ofício de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	67

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser agressivas e incontroláveis, podendo levar a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (INCA, 2014).

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo ainda importante causa de morte no Brasil e no mundo. Estimativas preveem que o número de casos deverá aumentar para 12 milhões até 2030 (WHO, 2010). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, também válida para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer (INCA, 2014).

Neste contexto, estudos de novos compostos com atividade antineoplásica, que têm como fontes produtos naturais têm sido realizado de forma incessantemente pelas indústrias farmacêuticas. Esforços vêm sendo dirigidos no sentido de desenvolver fármacos antitumorais mais eficazes do que os quimioterápicos já disponíveis, porém com menor toxicidade e potencial para desenvolver resistência terapêutica, que apresentem seletividade em baixas dosagens e ofereçam o mínimo possível de efeitos colaterais. (MORAIS et al., 2014).

Nas últimas décadas diversos produtos naturais vêm sendo descobertos e caracterizados, muitos com ações terapêuticas isoladas principalmente de micro-organismos, com destaque para as actinobactérias, seguida dos fungos, cianobactérias e mixobactérias (OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2011).

As actinobactérias são importantes bactérias produtoras de compostos bioativos que se destacam por apresentarem diferentes atividades biológicas como, antifúngica e antitumoral. Mais de 60% dos fármacos aprovados são derivados de compostos naturais, sendo 50% derivados de actinobactérias, sendo assim um grupo econômico e biologicamente importante (MORAIS et al., 2014; RAVIKUMAR; FREDIMOSSES; GNANADESIGAN, 2012).

Entre estes metabólitos secundários produzidos por actinobactérias estão os compostos com atividade antimicrobiana que possam atuar no tratamento de doenças infecciosas. O uso inadequado e excessivo desses antimicrobianos leva ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes, tornando-se uma ameaça à saúde pública, o que contribuem para efetivação de estudos que direcionem à descoberta de novos antimicrobianos (ALVAN; EDLUND; HEDDINI, 2011).

Muitas actinobactérias estão envolvidas em processos de ciclagem da matéria orgânica, na biorremediação de xenobióticos, na síntese de vitaminas e enzimas de aplicação industrial, participam da conversão e produção de biocombustíveis (SALAZAR; ORDOÑEZ, 2013) e na produção de antibióticos de diferentes classes como aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, políenios, poliéteres, e tetraciclinas (ANTUNES et al., 2013; ZOTCHEV, 2012).

Tendo em vista a grande importância destes micro-organismos juntamente a necessidade na descoberta de novos fármacos, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano e anticancerígeno dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces*, justificado pelo potencial que estas bactérias apresentam em produzir metabólitos com diversas aplicabilidades, principalmente para uso medicinal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ACTINOBACTÉRIAS

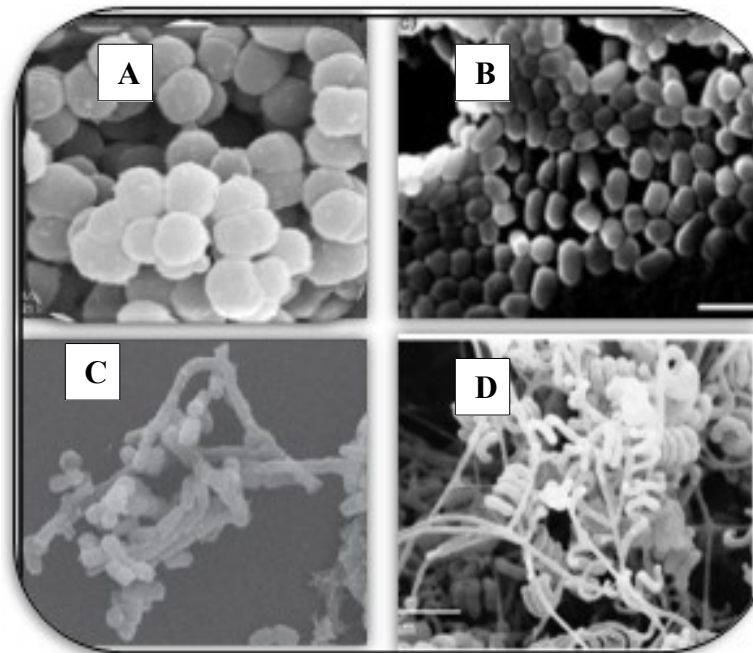
2.1.1 Características gerais das actinobactérias

As actinobactérias ou actinomicetos são grupos heterogêneos de bactérias Gram-positivas que apresentam uma grande diversidade morfológica e reprodutiva comparados com outros micro-organismos Gram-positivos, como o crescimento de forma lenta (ARAÚJO, 1998) e a síntese de metabólitos de interesse científico e industrial (BALLAV; DASTAGER; KERKAR, 2012). A parede celular destas bactérias filamentosas é formada por isômeros do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP) ou ainda por ácidos diamino, como lisina, ornitina ou butírico (LECHEVALIER, 1989; SHARMA, 2014).

Taxonomicamente as actinobactérias estão classificadas, dentro do Filo e da classe de Actinobacteria, que compreende 16 ordens, 43 famílias, 201 gêneros e centenas de espécies, que compartilham entre si o DNA com alto teor de guanina e citosina (G+C). A presença dessas bases nitrogenadas pode exceder 70% do total de bases nucleotídicas, variando de 51% a mais de 70% em *Corynebacteria* e *Streptomyces*, respectivamente. Uma exceção é o genoma de *Tropheryma hipplei*, um patógeno obrigatório intestinal humano, com menos de 50% de guanina e citosina (G+C) em seu DNA (GOODFELLOW et al., 2012).

As actinobactérias possuem um metabolismo variado utilizando diferentes fontes de carbono e energia, o que leva a encontrar exemplares autotróficos, heterotróficos ou quimiotróficos (KENNEDY, 1999). As actinobactérias de importância biotecnológica, como o gênero *Streptomyces*, apresentam como características: crescimento aeróbio, mesófilo e pH neutro (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; GOODFELLOW; WILLIAMS; MORDARSKI, 1998). De acordo com o gênero, as actinobactérias podem exibir diferentes características micromorfológicas, como cocoide em *Micrococcus*, cocobacilo em *Arthrobacter*, fragmentação de hifas em *Nocardia* spp. ou micélio ramificado altamente diferenciados como visto em *Streptomyces* spp. (Figura 1). (LETEK et al., 2012; RAJU et al., 2010)

Figura 1. Diferenças morfológicas de actinobactérias.



A: *Micrococcus* sp.; B: *Arthrobacter* sp.; C: *Nocardia asteroides*; D: *Streptomyces violaceusniger*
 Fonte: A: Chen et al., 2008; B: Kageyama et al., 2008; C: Ribeiro et al., 2008; D: Hayakawa; Yoshida; Limura, 2004.

Na natureza, as actinobactérias possuem ampla distribuição que incluem: comensais da planta (*Leifsonia* spp), fixadores de nitrogênio (*Frankia* spp.), saprófitas (*Oerskovia* spp.), patógenos (*Mycobacterium* spp.), simbiontes do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp), porém o solo é o habitat mais comum, onde correspondem a 30 % do total de micro-organismo (por exemplo, *Streptomyces* spp.) (GEORGE, et al., 2012; KENNEDY, 1999; MEHRAVAR, SARDARIL, OWLIA, 2010; VENTURA et.al., 2007). Estudos recentes revelam a presença de actinobactérias também em desertos (BULL; ASENJO, 2013), associadas a esponjas marinhas (ABDELMOHSEN; BAYER; HENTSCHEL, 2014; VICENTE, 2013), em praias e dunas (SHARMA et al., 2013). Essa ocorrência em diferentes ecossistemas provém da diversidade metabólica e da evolução destes micro-organismos em desenvolver mecanismos específicos de dispersão.

O crescimento de alguns grupos de actinobactérias ocorre através de elementos filamentosos em forma de micélio, semelhantes a hifas dos fungos, unicelular durante a fase inicial (SCHLEGEL, 1993; THENMOZHI; KANNABIRAN, 2012). Algumas espécies reproduzem-se pela formação de esporos (esporangiósporos ou conidiósporos) resistentes a dessecação e caracterizados de acordo com o gênero. Outras espécies ocorrem pela

fragmentação das hifas, como *Nocardia*, em que as hifas fragmentam-se em muitas células baciliformes ou cocoides, com capacidade de cada uma formar um novo micélio (CARVALHO; OLIVEIRA; DER SAND, 2012; VENTURA et.al., 2007).

As actinobactérias possuem um grande valor industrial, devido à habilidade em sintetizar metabólitos secundários com diversas propriedades biológicas, como produtoras de vitaminas, enzimas, imunomoduladores, antiparasíticos, anti-helmínticos, antiprotozoários, antivirais, antimicrobianos, além de herbicidas e inseticidas de ampla aplicação na agricultura (DEMAIN; SANCHEZ, 2009; GEORGE et al., 2012; RAVIKUMAR; FREDIMOSSES; GNANADESIGAN, 2012; SHARMA, 2014). Esta diversidade metabólica é exemplificada pela variabilidade em colonizar ambientes de condições extremas, determinando a grande adaptabilidade. (ARAÚJO, 1998; EL-SHATOORY; EL-SHENAWY; EL-SALAM, 2009).

A produção de antibióticos é a mais importante e a mais estudada. A maioria dos fármacos, cerca de 70% em uso comercial foram isolados de actinobactérias, dos quais 75% são utilizados na medicina, dentre estes, a estreptomicina, neomicina e eritromicina (KUMAR et al., 2012).

2.2.2 Identificação das Actinobactérias

A identificação das actinobactérias pode ser realizada por meio de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares. As características morfológicas usadas na identificação das actinobactérias são: ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo, coloração e sua fragmentação ou produção de esporos em tipo, número e arranjo da cadeia (LECHEVALIER, 1989). Com o auxílio do microscópio eletrônico é possível obter informações adicionais sobre a superfície dos esporos (BULL, 2004; OLIVEIRA, 2003).

Análises bioquímicas e fisiológicas obtidas a partir do estudo da composição da parede celular pode-se avaliar 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) para diferenciar alguns gêneros de actinobactérias (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997).

Dentre as técnicas moleculares mais utilizados podemos citar a reação em cadeia polimerase (PCR) e o sequenciamento de regiões intergênicas que auxiliam na identificação de muitas espécies de micro-organismos e suas relações filogenéticas (DEVEREUX; HINES;

STAHL, 1996) e tem como vantagem não precisar do isolamento da sequência que foi amplificada (STRINGARI, 2004).

O PCR é um método *in vitro* para amplificação de material genético e consiste na realização de cópias de DNA usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA. Por meio desta técnica pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar 100 bilhões de moléculas similares em algumas horas (BITTENCOURT, 2008) e a partir dela é possível realizar diferentes metodologias quando associadas a outras ferramentas moleculares, como: detecção de genes em um DNA genômico, quantificação de sequências específicas; análise da estrutura de genomas; evolução molecular; identificação de mutações, novos membros de famílias (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998; NEIVA, 2007).

Já o sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S (ITS) baseia-se na existência de sequências altamente conservadas nos genes DNAr da subunidade menor dos ribossomos (RNAr 16S) de todas as bactérias e sequências intersticiais variáveis nessas moléculas que são espécie-específicas. A molécula de RNAr 16S é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a sua identificação e classificação. A amplificação, por PCR, de sequências de DNA complementares a sequências variáveis do DNAr 16S de um micro-organismo desconhecido e sua comparação com sequências variáveis do RNAr 16S de espécies conhecidas, fornece informação suficiente para identificá-lo como membro de uma espécie ou grupo conhecido ou colocá-lo em uma nova espécie (NEIVA, 2007).

A combinação de diferentes métodos tem sido empregada para o entendimento da diversidade, filogenia, evolução e taxonomia dos micro-organismos.

2.2.3 Gênero *Streptomyces*

O nome *Streptomyces* teve origem a partir da descoberta de Ferdinand Cohn, em 1875, observando colônias que apresentavam crescimento ramificado e denominou *Streptotrix* que significa “cabelo enrolado”. Posteriormente, proposto por Waksman e Henrici (1943), o nome *Streptomyces* teve seu nome originado a partir da combinação das primeiras actinobactérias estudadas e inicialmente denominadas *Streptothrix* e *Actinomyces*, o agente da actinomicose *A. bovis*, que significa “fungo enrolado” e favorecia a ideia de actinobactéria como um grupo intermediário entre fungo e bactéria (WAKSMAN, 1943; WILLIAMS; GOODFELLOW; ALDERSON, 1989; STACKEBRANDT; SCHUMANN, 2006).

Taxonomicamente, o gênero *Streptomyces* pertence ao Filo *Actinobacteria*, pertence a ordem *Actinomycetales* e agora estão restrito aos membros da família *Actinomycetaceae*

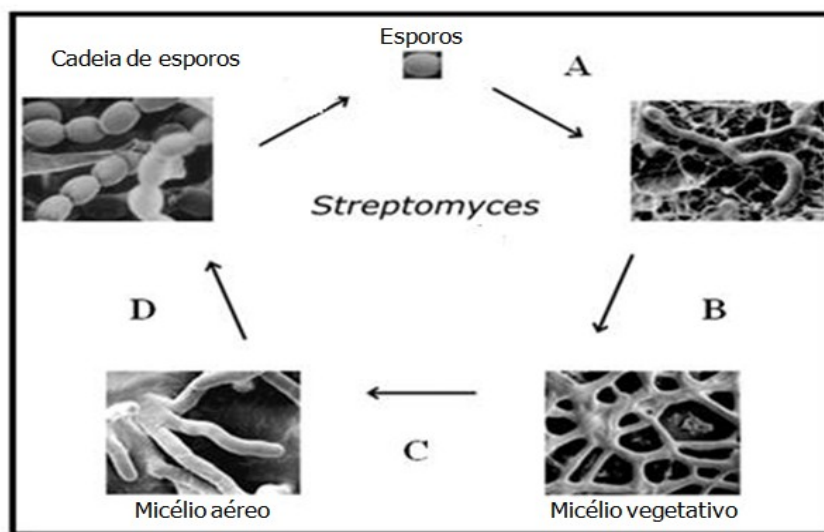
(GOODFELLOW et al., 2012). São bactérias aeróbias, gram-positivas e apresentam alto conteúdo de citosina e guanina em seu genoma. Desenvolvem-se preferencialmente em pH alcalino e neutro, crescimento semelhante aos fungos filamentosos, porém com filamentos finos, geralmente de 0,5 – 1,2 μm de diâmetro com comprimento indefinido. Os membros desse gênero podem ser diferenciados de outras actinobactérias através da parede celular, composta por ácido L-diaminopimérico e glicina (DIETZ; MATHEWS, 1971; DYSON, 2011; MADIGAN et al., 2010).

Mais de 500 espécies de *Streptomyces* são conhecidas e podem ser encontradas em diversos habitats, com destaques para o solo, onde perfazem cerca de 30% da microbiota, e ambientes aquáticos (lagos, rios, mares) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O gênero *Streptomyces* possuem um único cromossomo linear, com cerca de 8 MB a 10 MB dependendo da espécie, e plasmídeos que podem ser circulares ou lineares (HWANG et al., 2014). Uma característica interessante do genoma é a presença de grupos de genes que codificam enzimas biossintéticas responsáveis pela síntese de metabólitos secundários bioativos não relacionados estruturalmente. Muitas dessas enzimas são responsáveis pela síntese das principais classes de antibióticos produzidos por *Streptomyces* que incluem: aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, políenios, poliéteres, e tetraciclinas (ANTUNES et al., 2013).

O ciclo de vida de *Streptomyces* é complexo, se iniciando com a germinação do esporo, dando origem a um micélio vegetativo, que é formado por hifas ramificadas que penetram no substrato auxiliando na metabolização das fontes orgânicas pela ação de enzimas extracelulares (PADILLA, 1998). Esse micélio vegetativo (hifas primárias) dá origem ao micélio aéreo (hifas secundárias) que por sua vez, passam por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos. Nessa fase, ativa-se o metabolismo secundário, em que são produzidos principalmente antibióticos e pigmentos. A liberação de esporos fecha um ciclo de crescimento (Figura 2) (HWANG et al., 2014; BIBB, 2005).

Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces* sp.



A: germinação dos esporos; **B:** Crescimento do micélio vegetativo; **C:** Crescimento do micélio aéreo; **D:** Esporulação. Fonte: McGregor J. F. (1954).

Os esporos de *Streptomyces* são menores, quando comparados com outras bactérias como os produzidos por *Bacillus*, e mais resistentes a condições adversas, podendo sobreviver por longos períodos no estado desidratado (FLARDH; BUTTNER, 2009). Em comparação com outros gêneros de actinobactérias, os estreptomicetos são responsáveis por cerca de 80% do total de antibióticos de uso clínico. (MADIGAN, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.2.4 Metabólitos produzidos por Actinobactérias

Os micro-organismos produzem diversas substâncias bioativas envolvidas em funções ecológicas. Porém, muitas destas substâncias são desconhecidas sendo, portanto, candidatos promissores para a descoberta de moléculas com aplicações em diferentes áreas industriais. Estas substâncias são definidas como metabólitos e podem ser classificadas em primários e secundários (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

Os metabólitos primários e secundários é que os metabólitos primários são produzidos em pequenas concentrações durante o crescimento vegetativo e são essenciais para o seu desenvolvimento. Muitos dos produtos obtidos durante o crescimento microbiano pelo metabolismo primário são utilizados diretamente pelas indústrias como aminoácidos (lisina, fenilalanina), álcoois (etanol), açúcares (frutose), ácidos orgânicos (acético, láctico),

vitaminas (biotina), polióis (manitol, glicerol), entre outros (DEMAIN, 1998; DEMAIN, 2000; RAJASEKARAN et al., 2009).

Já os metabólitos secundários são produzidos durante a fase germinativa, quando ocorre o processo de esporulação. Isso ocorre em condições limitantes de nutrientes ou sob outras situações de estresse ambiental (HWANG et al., 2014). Os metabólitos secundários produzidos não essenciais para o seu crescimento, porém exercem efeitos diversos entre os sistemas vivos como regulador e/ ou modulador – inibindo a proliferação de outros micro-organismos, aumentando a chance de germinação de seus esporos e consequentemente sua sobrevivência (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Os metabólitos secundários apresentam estruturas pouco comuns e sua formação é regulada por diferentes fatores: nutrientes, taxa de crescimento, controle de *feedback*, enzimas de inativação e indução, além destes, possuem distribuição taxonômica restrita, ou seja, nem toda linhagem de uma espécie é capaz de produzir mesmo metabólito (BIBB, 2005; DEMAIN, 1998; MARTÍN; CASQUEIRO; LIRAS, 2005; NIGAM, 2009).

Segundo Liu et al. (2013) dos metabólitos bioativos obtidos a partir de micro-organismos, 45% são produzidos por actinobactérias, 38 % por fungos e 17% por outros grupos de bactérias. Estes metabólitos incluem compostos com diferentes atividades biológicas, muitos em uso industrial. Alguns produtos naturais obtidos a partir de actinobactérias e seu potencial nas áreas farmacêuticas e agroquímicas são exemplificados a seguir:

2.2.4.1 Atividade antibacteriana e antifúngica

Dois compostos ativos foram obtidos a partir de *Streptomyces roseogilvus*, isolado de lodo marinho na China. Ambos apresentam atividades antimicrobiana e antitumoral, porém apenas um dos compostos foi identificado e denominado griseoviridina (LIN; LIU, 2010).

Em solos paraibanos foram isoladas cepas de *Streptomyces* spp. (Sp-1 e Sp-2) cujos metabólitos secundários apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Trichophyton rubrum* e *T. inkin* (OLIVEIRA et al., 2010).

Rosly et al. (2014) avaliaram o extrato acetônico da fermentação de *Streptomyces* sp. H7372 e o mesmo inibiu, *in vitro*, a bactéria *Helicobacter pylori* ATCC, responsável pela infecção da mucosa estomacal.

2.2.4.2 Atividade antiviral

Raveh et al. (2013) isolaram e identificaram o composto antimicina A1a, da actinobactéria marinha *Streptomyces kaviengensis*, com potente atividade antiviral contra o vírus da encefalite equina cuja concentração de inibição é inferior a 4nM. O composto reduziu o vírus circulante no sistema nervoso central de camundongos infectados, aumentando as taxas de sobrevivência, e inibiu a proliferação RNA viral das culturas celulares de vírus pertencentes a família *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Picornaviridae*, e *Paramyxoviridae*.

2.2.4.4 Atividade anti-inflamatória

Renner et al. (1999) isolaram de *Streptomyces* sp. o composto denominado ciclomarina A, um novo heptapeptídeo cíclico que mostrou atividade anti-inflamatória significativa em modelos experimentais tanto *in vivo* como *in vitro*.

Cruz et al. (2013) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato acetônico de *Streptoverticillium* sp em dois modelos inflamatórios: edema de orelha induzido por óleo de cróton e peritonite induzida por carragenina. Os extratos foram capazes de reduzir o edema e a migração de leucócitos na peritonite.

2.2.3.5 Atividade citotóxica

Wang et al. (2011) identificaram um novo composto derivado da quinolina, obtido da fermentação da actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp. NEAU50. Este composto mostrou atividade citotóxica frente a linhagem de células cancerígenas humana de pulmão (A-549) com o valor de CI_{50} igual a $29.3 \mu\text{M/L}^{-1}$.

Shaaban et al. (2011) isolaram oito novos compostos denominados landomicina P-W, juntamente a outros anguciclinona, a partir da fermentação de *Streptomyces cyanogenus* S-136. Todos os compostos apresentaram citotoxicidade para linhagens de células de câncer de mama (MCF7 e MDA-MB-231).

Kamala et al. (2014) isolaram a actinobactéria *Nocardiopsis* sp. de sedimentos marinho na ilha indiana de Nancowry, e seu extrato acetotílico purificado mostrou-se citotóxico para as linhagens de células cancerígenas de pulmão (NCI-H460) com CI_{50} igual a $40 \mu\text{M/L}$.

2.2.4.6 Atividade inseticida

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*. Os metabólitos de sete isolados de actinobactérias causaram 100% de

mortalidade e foram identificados como *Streptomyces fungicidicus*, *S. griseus*, *S. albus*, *S. rochei*, *S. violaceus*, *S. alboflavuse* *S. griseofuscus* (EL-KHAWAGH; HAMADAH; ELSHEIKH, 2011).

Anwar et al (2014) isolaram 51 actinobactérias de solo salino, na região do Paquistão. Destes, 17 foram identificadas como *Streptomyces* sp. e apresentaram atividade inseticida e larvicida com 100% de mortalidade contra *Tribolium castaneum* e 3º instar larval de *Culex quinquefasciatus*, mosquitos responsáveis por pragas em culturas de cereais e elefantíase.

2.2.4.8 Atividade promotora de crescimento vegetal

Muitas actinobactérias são comumente isoladas de solo que apresentam a capacidade de colonizar a rizosfera ou mesmo o ambiente endofítico de espécies vegetais. Algumas promovem o crescimento de plantas, atuando como biofertilizante, bioestimuladora ou biocontroladora de fitopatógenos (QIN et al., 2012).

Brito (2010) ao cultivar plantas de girassol e pinhão manso em dois solos diferentes, porém ricos e incubados com isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* verificou o crescimento significativo das mesmas e o justificou, possivelmente, pela presença da atividade de enzimas extracelulares e a produção de fitohormônios.

Damasceno (2011) relatou melhor fixação de nitrogênio na parte aérea de tomateiro através de teores significativos de até 76 % da massa seca em raízes de mudas da planta, produzidas em substrato rico com isolados de actinobactérias, além da produção *in vitro* de ácido indol-3-acético, xilanases e celulasas. Descreveu também uma ação nematicida de filtrados da cultura de actinobactérias do gênero *Streptomyces* sobre nematoides juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

Gopalakrishnan et al. (2014) avaliaram o comportamento das raízes de arroz em solo enriquecido com diferentes espécies de *Streptomyces* spp. e observaram que os isolados não só melhoraram o crescimento das raízes, contribuindo com a absorção de minerais e matéria orgânica pelas mesmas, como também contribuíram na produção de diversas enzimas que atuam direta ou indiretamente na promoção do crescimento vegetal.

2.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos podem ser definidos como compostos capazes de causar a morte ou inibir o crescimento de micro-organismos, através da redução do metabolismo microbiano,

podendo, assim ser classificados, como fungicidas/bactericidas ou fungistáticos/bacteriostáticos, respectivamente (CHAMBERS, 2003; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; SILVA et al., 2013). O termo antibiótico foi proposto por Waksman em 1942 e utilizado para definir um composto produzido por um micro-organismo, o qual inibe o crescimento de outro micro-organismo. Ao longo dos anos, esta definição foi expandida para incluir produtos sintéticos e semi-sintéticos. (CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2006; KÜMMERER, 2009).

Durante a segunda metade do século XIX, as pesquisas eram conduzidas na busca de agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica. O pesquisador Paul Ehrlich foi o responsável pelos conceitos de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de micro-organismos a partir de pequenas mudanças estruturais em antibióticos naturais de uma classe já conhecida. Desta forma poderia obter-se um novo antibiótico, porém com diferente atividade antimicrobiana. Seus estudos lhe renderam a descoberta do primeiro antibiótico de origem sintética utilizado contra a sífilis, o salvarsan (AMINOV, 2010; PATRICK, 2005; UJIKAWA, 2003).

No final do século XIX, pesquisadores iniciaram as buscas para descobrir um tratamento capaz de inibir o crescimento e/ou causar a morte de micro-organismos patogênicos. O marco da quimioterapia microbiana ocorreu em 1929 com a descoberta da penicilina pelo biólogo Alexander Fleming, ao observar uma cultura que o fungo *Penicillium notatum*, em placa, produzia uma substância que controlava a proliferação bacteriana de *Staphylococcus aureus*. Embora sua produção em larga escala só tenha ocorrido em 1940, a descoberta motivou uma nova linha 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).

Todas as classes de antibióticos usadas terapeuticamente foram descobertas entre as décadas de 1940-1950, fase conhecida como a “Era de Ouro dos Antibióticos”. Essa fase proporcionou a triagem de produtos naturais microbianos pertencentes às principais classes como β -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos, estreptograminas e quinolonas e síntese de novos antibióticos semi-sintéticos análogos aos antibióticos naturais já existentes (BÉRDY, 2005; FERNANDES, 2006).

A maioria dos antibióticos com importância comercial é produzida por fungos ou bactérias. Dentre as bactérias, a maior variedade em estruturas e em número de antibióticos são derivados de actinobactérias, especialmente pelo gênero *Streptomyces*. Alguns exemplares e sua atividade estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns antibióticos produzidos pelo gênero *Streptomyces*.

Composto	Espécie	Atividade biológica
^{1,3} Actinomicina D	<i>S. sindenensis</i>	antitumoral
² Nistatina	<i>S. noursei</i>	antifúngico
² Estreptomicina	<i>S. griseus</i>	antibacteriano
² Neomicina	<i>S. fradie</i>	antibacteriano
^{1,2} Eritromicina	<i>S. erythraeus</i> .	antibacteriano
⁴ Daptomicina	<i>S. pristinaspiralis</i> .	antibacteriano
³ Mitomicina C	<i>S. caespitosus</i>	antitumoral
² Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	antibacteriano e antifúngico
³ Doxorrubicina	<i>S. peucetius</i>	antitumoral
^{1,3} Valrubicina	<i>Streptomyces</i> sp.	antitumoral
² Tetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	antibacteriano
² Anfoteracina B	<i>S. nodosus</i>	antifúngico

Fonte: ¹DEMAIN; SANCHEZ, 2009; ²MADIGAN et al., 2010; ³OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2011.

Apesar do surgimento de diferentes antibióticos ao longo dos anos, entre os anos 1980-2000, a sua fácil disponibilidade juntamente ao uso indiscriminado vem aumentando a incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

2.3.1 Resistência Bacteriana aos Antibióticos

Os antibióticos estão entre os fármacos mais utilizados no mundo de forma extensivamente na medicina humana e veterinária, na profilaxia ou no tratamento de infecções microbianas e sua introdução na terapêutica representou um grande avanço para a saúde pública (KÜMMERER, 2009). A maioria dos antibióticos usados clinicamente é originada de produtos naturais microbianos ou são derivados destes, ou seja, sintéticos ou semi-sintéticos. Apesar de todo o êxito na descoberta de antibióticos, e avanços no processo da sua produção, as doenças infecciosas continuam sendo a segunda principal causa de morte no mundo (CARVALHO; OLIVEIRA; SAND, 2012; CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006).

As infecções bacterianas causam aproximadamente 17 milhões mortes por ano, afetando todas as classes sociais e idades, principalmente crianças e idosos. O uso abusivo e indiscriminado de fármacos antimicrobianos é apontado pela Organização Mundial de Saúde

(OMS) como o fator responsável, pois o uso descontrolado dos antibióticos tende diminuir ou até mesmo fazer com que este perca sua eficácia clínica exigindo a utilização de antibióticos de amplo espectro no tratamento de infecções mais simples, contribuindo para o surgimento de cepas resistentes (TERRÍVEL et al., 2013).

A resistência microbiana pode ser definida como um mecanismo desenvolvido pelos micro-organismos para diminuir ou inativar a ação dos fármacos (ARIAS; CARRILHO, 2012; BOLIVAR et al., 2011). A resistência bacteriana é um mecanismo de defesa natural e apresenta-se de diferentes formas para impedir a ação dos fármacos, dentre os quais podemos citar: resistência por meio da alteração na permeabilidade da membrana, inativação enzimática, alteração dos sítios de ação impedindo a absorção do fármaco e mutações genéticas. Na maioria das vezes, esta resistência ocorre quando o tratamento não é seguido de forma adequada (OLIVEIRA, 2010).

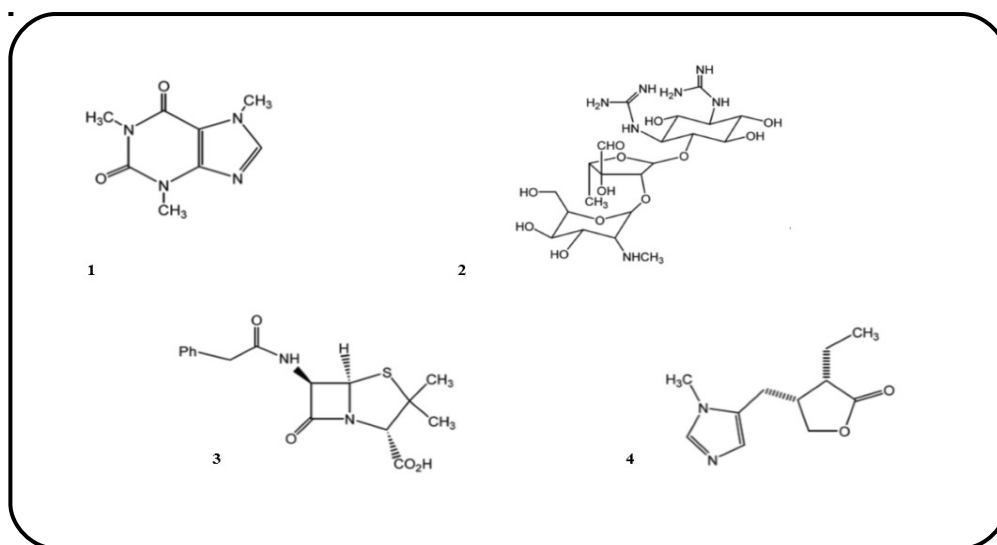
Diante desse contexto, há uma necessidade crescente de reposição de novos antibióticos para suplantar a resistência a partir de produtos naturais bioativos, a fim de evitar a proliferação de populações microbianas multirresistentes.

2.4 PRODUTOS NATURAIS E CÂNCER

A indústria farmacêutica mostra-se um grande interesse em estudar os recursos naturais para obtenção de novos medicamentos (CHAVASCO, et al., 2014). Isso devido a maior diversidade de substâncias químicas presentes na natureza, seja ela obtida de plantas ou micro-organismos, de alto potencial para aplicações terapêuticas, possibilitando a síntese de compostos sintéticos, com o auxílio de emprego de avançadas técnicas de separação, purificação e identificação de tais substâncias (COSTA, 2009; TEITEN et al., 2013).

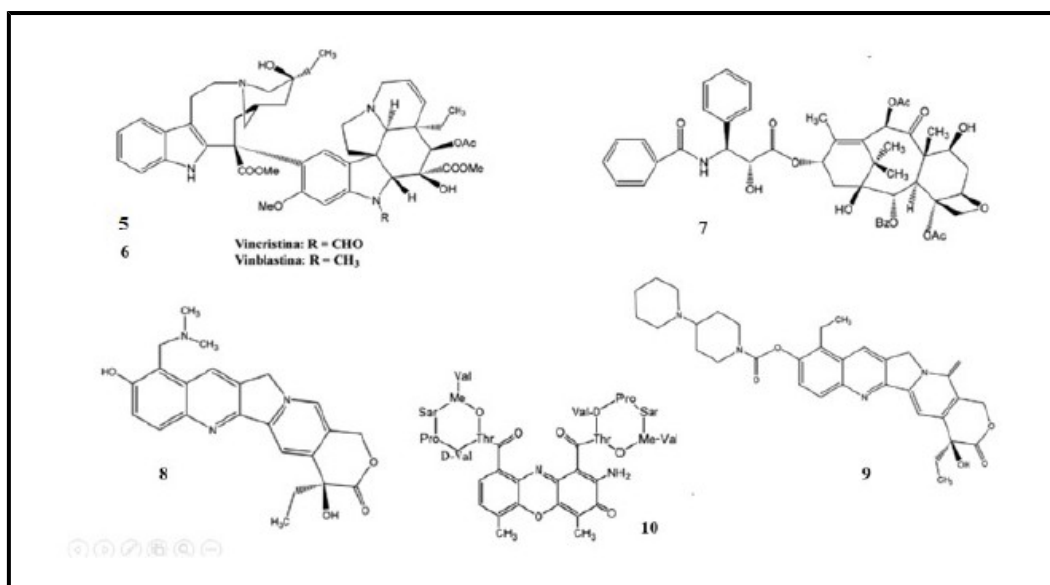
Tais substâncias químicas possuem princípios ativos que podem ser utilizados como precursores na semi-síntese farmacêutica ou em modelos para síntese de novos princípios terapêuticos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Como por exemplo, a cafeína (**1**), estimulante extraído de diferentes plantas, como *Coffea arabica* (café) e *Paullinia cupana* (guaraná); a estreptomicina (**2**), antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose, isolado de *Streptomyces griseus*; a penicilina G (**3**), antibiótico isolado do fungo *Penicillium notatum*; e a pilocarpina (**4**), extraída das folhas da planta *Pilocarpus jaborandi*, utilizada no tratamento do glaucoma (Figura 3) (SOUZA et. al., 2007).

Figura 3. Produtos naturais utilizados na terapêutica.



A maioria dos fármacos antineoplásicos introduzidos na terapêutica, cerca de 60%, teve sua origem de produtos naturais. Dentre eles podemos citar a vimblastina (**5**) e a vincristina (**6**), alcaloides extraídos da planta *Catharanthus roseus* e o paclitaxel (**7**), isolado do fungo *Taxus brevifolia*. Podemos destacar também irinotecam (**8**) e topotecam (**9**), derivados semi-sintéticos da camptotecina, um alcaloide extraído da *Camptotheca acuminata* (COSTA-LOTUFO et. al., 2010) (Figura 4).

Figura 4. Alguns fármacos obtidos a partir de produtos naturais utilizados na terapia antineoplásica.



A partir de *Streptomyces sindenensis* foi isolado o composto actinomicina D (**10**), também com atividade antineoplásica e utilizada no tratamento do câncer (PRAVEEN et al., 2008). Essa descoberta levou ao estudo das substâncias produzidas por outras actinobactérias das quais, muitas são de classes de compostos anticancerígenos conhecidos; algumas delas clinicamente aplicáveis na terapia da doença, tais como antraciclínas, peptídeos, glicosídeos, enediinas, indóis, policetídeos, antimetabólicos, carzinofilina e mitomicinas (DEMAIN; SANCHEZ, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2007; OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2011).

Apesar de existirem vários fármacos em uso clínico para o tratamento de câncer, ainda não existe um fármaco quimioterapêutico que regule a proliferação de células cancerígenas e suas múltiplas vias de sinalização de uma forma altamente específica e sem grandes efeitos colaterais as células adjacentes e ao indivíduo (DE LAS LLAGAS; SANTIAGO; RAMOS, 2014).

2.5 CÂNCER

2.5.1 Aspectos gerais

O câncer é um conjunto de doenças que tem em comum o acúmulo de alterações gênicas em células somáticas, causando uma multiplicação desordenada, habilidade em invadir tecidos adjacentes e a inviabilidade dessas células em realizar as suas funções (GRIFFITHS et al., 2008). Sob intensa ação proliferativa estas células tendem a formação de tumores malignos. Bioquimicamente, a doença é definida como uma perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (INCA, 2012).

A taxa de mortalidade por câncer vem crescendo ao longo dos anos devido ao crescimento populacional e mudanças nos hábitos de vida. No Brasil, a estimativa para o ano de 2015 é de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer (Tabela 1), sendo os mais incidentes o pele não melanoma, próstata, mama, cólon e reto, pulmão e estômago (INCA, 2014).

As causas que induzem ao câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos e/ou costumes próprios de um ambiente social e cultural (INCA, 2012). As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas que levam a alterações genéticas produzidas por mecanismos diversos, como a inativação de

genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os denominados carcinógenos (INCA, 2012; SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003).

Devido à alta incidência do câncer em todo o mundo, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver ou aperfeiçoar terapias antineoplásicas atuais. Dos fármacos quimioterápicos neoplásicos usados no tratamento, Newman e Cragg (2012) relataram que 61% foram obtidos a partir de origens naturais. Tal relato tem despertado o interesse nas pesquisas de novos medicamentos devido à deficiência de um arsenal terapêutico eficaz que trate a doença sem apresentar características tóxicas a células normais bem como a resistência celular aos fármacos (VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009).

Tabela 2. Taxas brutas da incidência de câncer em homens e mulheres para o ano de 2014, por região no Brasil.

Brasil Consolidado		
	Homens	Mulheres
Norte	10.090	9.930
Nordeste	47.520	51.540
Centro-Oeste	21.290	20.150
Sudeste	156.910	142.820
Sul	66.540	49.790
Total por sexo	302.350	274.230
Brasil		576.580

Fonte: Adaptado de INCA (2014).

2.5.2 Terapia antitumoral

O tratamento do paciente com câncer é feito através do uso combinado de várias abordagens terapêuticas. A cirurgia, a radioterapia, a hormonioterapia e a quimioterapia são os tratamentos básicos para vários tipos de câncer que combinados entre si e com o uso de fármacos permite a atuação em diferentes estágios da célula tumoral, dependendo do tipo do tumor (INCA, 2014; CARVALHO; TIRNAUER; PELLMAN, 2003).

A cirurgia é a forma de tratamento mais antiga e baseia-se na remoção do tumor, quando este é localizado e encontra-se em condições anatômicas favoráveis. A radioterapia utiliza diferentes radiações ionizantes (raios X ou raios γ) e é indicada, principalmente, para o tratamento loco-regional do câncer que atinge as células neoplásicas que não podem ser totalmente removidos ou para aqueles que costumam reincidir após o processo cirúrgico; no entanto, as células normais nas regiões adjacentes ao tumor, também são atingidas. Já a

hormonioterapia consiste na introdução de substâncias análogos ou inibidoras de hormônios para tratar as neoplasias sensíveis aos hormônios presentes no organismo (INCA, 2014; SANTOS et al., 2010; SOUZA et al., 2007)

De todas as terapias citadas acima, a quimioterapia ainda é a forma de tratamento mais utilizado e consiste na administração sistêmica de fármacos que interferem no processo de crescimento e divisão celular de células cancerígenas. A quimioterapia é baseada na combinação de fármacos (poliquimioterapia), que apresenta resultados mais eficazes que a monoterapia, pois nos tumores há frequentemente subpopulações de células com sensibilidade diferente às drogas antineoplásicas. Além disso, a poliquimioterapia pode diminuir o risco de resistência aos fármacos empregados. Contudo, a maioria desses fármacos não possui especificidade, lesionando tecidos saudáveis e levando a efeitos colaterais como náuseas, vômitos, anemia, mielossupressão, imunossupressão, alopecia, toxicidade renal, cardiotoxicidade, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, lesão gonadal e esterilidade (SAWADA et al., 2009).

Normalmente a quimioterapia é utilizada como adjuvante, após cirurgia ou radioterapia, ou como paliativo, em casos graves e avançados da doença, visando melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2014).

Sendo assim, faz-se necessário o estudo dos metabólitos bioativos da actinobactéria, pois se acredita possuir potencial para a produção de novas biomoléculas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano e anticâncer dos extratos brutos produzidos por *Streptomyces* sp. UFPEDA 3407.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os metabólitos secundários da fermentação submersa de *Streptomyces* sp UFPEDA 3407;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto produzidos por *Streptomyces* sp UFPEDA 3407;
- Realizar prospecção química dos extratos com melhor atividade antimicrobiana;
- Avaliar o potencial citotóxico do extrato bruto produzidos por *Streptomyces* sp UFPEDA 3407.

4.METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DA ACTINOBACTÉRIA

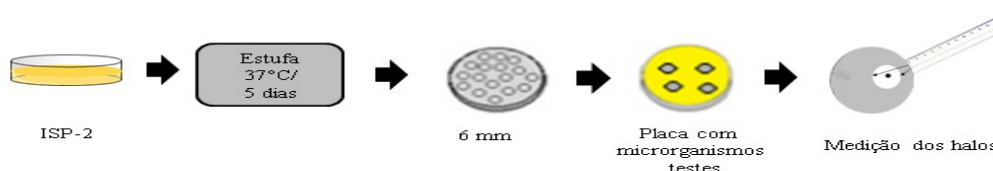
A linhagem bacteriana *Streptomyces* sp. UFPEDA 3407 foi isolada na região de Maués/AM, foi fornecida pelo Laboratório de Coleção de Micro-organismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos.

4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.2.1 Ensaio Primário

Para avaliação da atividade antimicrobiana da actinobactéria, foi realizado o ensaio primário segundo metodologia de Ichikawa e colaboradores (1971), conhecida como “Método do Bloco de Gelose” ou “Teste de difusão em Ágar” (Figura 5) onde o composto bioativo se difunde no ágar. Inicialmente, a actinobactéria foi reativada em meio ISP-2 líquido por 48 h a temperatura ambiente (30°C). Após esse período, a actinobactéria foi plaqueada com alça de Drigalsky em placa de Petri contendo o meio ISP-2. O cultivo foi realizado durante cinco dias na temperatura de 37° C para obtenção de um crescimento em forma de tapete. Após o crescimento, foram retirados blocos circulares de 6 mm de diâmetro com o auxílio de um perfurador esterilizado e transferidos para as placas contendo meio Müller-Hinton (MH) para bactérias e Sabouraud (SAB) para fungos, dependendo do micro-organismo teste que foi previamente inoculado. A composição de todos os meios utilizados encontram-se no anexo 1.

Figura 5 - Esquema da metodologia usada no teste do bloco de gelose.



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Para a atividade antimicrobiana, foram preparadas suspensões das bactérias com densidade de 0,5 da escala de McFarland e realizado o teste de difusão em Ágar, segundo

Kirby e colaboradores (1966), utilizando os micro-organismos da Coleção de Micro-organismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos (Tabela 3). O teste foi realizado em triplicata para a *Streptomyces* sp UFPEDA 3407. As placas foram cultivadas e incubadas a 37°C por 18-24 horas para bactérias e, a 30 °C por 48 horas para leveduras. Após o período de cultivo o diâmetro dos halos foi medido (mm).

Tabela 3. Micro-organismo teste usados na atividade antimicrobiana.

Micro-organismos	UFPEDA	Meio de Cultivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	02	MH
<i>Micrococcus luteus</i>	06	MH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	MH
<i>Bacillus subtilis</i>	86	MH
<i>Candida khruzei</i>	1002	SAB
<i>Candida albicans</i>	1007	SAB

Mh: Muller-Hilton; SAB: Sabouroud. Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

4.2.2 Ensaio Secundário

4.2.2.1 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 6 blocos de gelose de 10 mm de diâmetro retirados do crescimento em forma de tapete da linhagem em ISP-2, cultivada por 13 dias a 37 °C, e submetidos à agitação por 48 h (180 rpm/ 30 °C). Para fermentação, 10% do pré-inóculo foi adicionado em frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio MPE seguido da agitação a 180 rpm durante 96h. A atividade antimicrobiana e o pH foram acompanhados a cada 24h (LYRA et al., 1964).

4.3 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO

4.3.1 Separação da massa celular

Após fermentação, o líquido metabólico foi separado da massa celular por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos em tubos de Falcon, contendo 10 mL do fermentado.(LYRA et al., 1964).

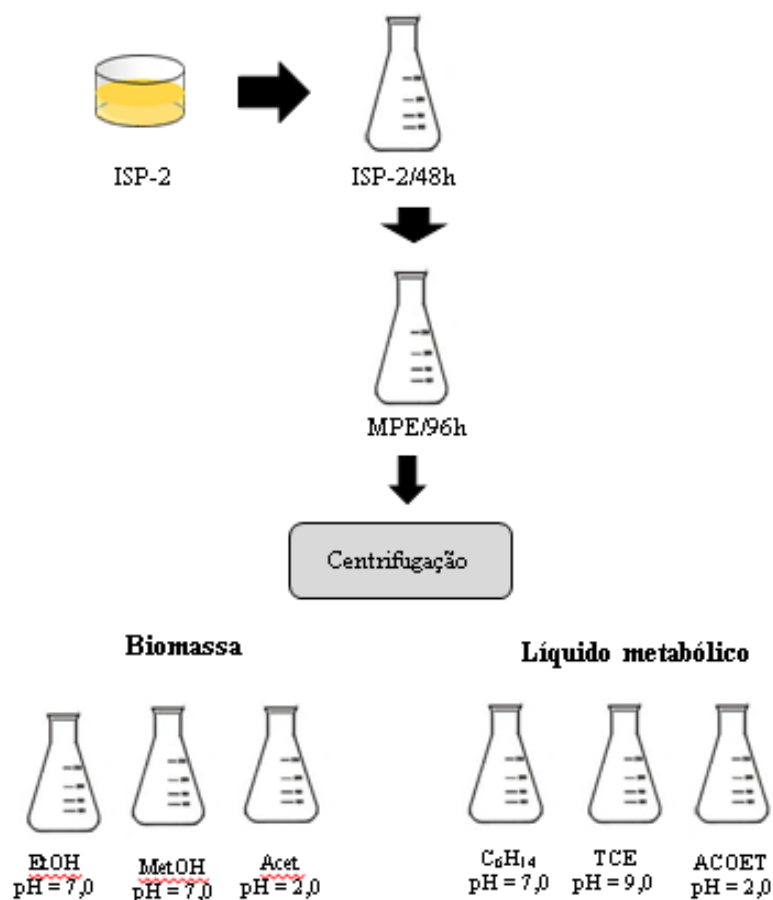
4.3.1.1 *Extração do composto bioativo – biomassa*

A extração do princípio ativo da biomassa foi realizada com solventes miscíveis em água (etanol, metanol e acetona) em pH 7,0, 7,0 e 2,0, na proporção 1:2 (p/v) sob agitação durante 15 minutos em agitador mecânico e filtrados com funil de decantação para separação do extrato. Em seguida, o pH dos solventes e do extraído da biomassa foram reajustados para 7,0 e realizado o teste de difusão em ágar utilizando-se discos de papel embebidos com 50µL de cada frente aos micro-organismos testes. A partir deste teste, foi possível verificar qual solvente que melhor extraiu o composto bioativo da biomassa pela análise dos halos de inibição (LYRAet al., 1964).

4.3.1.2 *Extração do antibiótico – líquido metabólico*

Para extração do antibiótico do líquido metabólico foram utilizados solventes não miscíveis em água (hexano e clorofórmio e acetato de etila) em pH 7,0, 9,0 e 2,0, na proporção de 1:3 (v/v) seguido de agitação por 15 minutos. Após agitação, os extratos dos solventes foram separados com o auxílio de funil de separação. O líquido metabólico esgotado foi reajustado para pH 7,0 e realizado o teste de difusão em ágar utilizando-se discos de papel embebidos com 50 µL de cada extrato dos solvente frente aos micro-organismos testes. Esse teste selecionou o solvente que melhor extraiu o antibiótico pela análise dos halos de inibição (LYRAet al., 1964).

Figura 6. Fluxograma da extração do composto bioativo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

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).

Os micro-organismos utilizados foram provenientes da Coleção de Micro-organismos UFPEDA e foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, para bactérias e 10^7 UFC/mL para leveduras.

4.4.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição, em placas com 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Neste ensaio, foram distribuídos volumes de 180 µL de meio líquido (MH ou SAB) de acordo com o micro-organismo, na coluna 1 e 100 µL nas demais colunas. Em seguida, foram adicionados mais 20 µL dos extratos nos poços da coluna 1 e realizada a microdiluição (1000 - 0,48 µg/mL) até a coluna 12. Após diluição, cada poço foi inoculado com 10 µL da suspensão microbiana padronizada.

Os poços de 1-3 da linha H não receberam o inóculo, sendo assim, o controle de esterilidade do meio. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e, a 30 °C por 48 horas para leveduras.

4.4.1.1 Leitura da Microplaca

Após o período de cultivo, as microplacas bacterianas foram reveladas com 25 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 é definida como a menor concentração da droga que inibe o crescimento do micro-organismo.

O mesmo procedimento repetiu-se com as microplacas de leveduras, utilizando como revelador o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo tetrazólio (MTT) e incubação por 1-3 horas para que ocorresse a mudança de coloração nos poços (HJERTSTEDT, J. et al, 1998). O MTT é um corante amarelo indicador de óxido-redução que reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Isto torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas de púrpura, daquelas mortas que mantêm a sua cor. A CIM é definida como a menor concentração da droga que inibe o crescimento do micro-organismo. Os testes foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes.

4.4.2 Determinação da concentração mínima bactericida e fungicida (CMB/CMF)

A CMB e CMF foram definidas como a menor concentração da substância 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 MH ou SAB, incubada a 37

°C por 18-24 horas para bactérias e, a 30 °C por 48 horas para leveduras. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

4.5 PROSPECÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A prospecção química comparativas foi realizada com alíquotas de 10 µL de cada extrato que apresentaram atividade antimicrobiana, foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio TLC contendo Sílica Gel 60 F254 (Merck), 60mm x 100mm. Depois de secas, cada placa foi analisada em luz ultravioleta de comprimento de onda curto e longo, borrifada com um revelador e analisada com ou sem aquecimento ou incidência de luz ultravioleta dependendo do revelador utilizado (HARBORNE, 1998; METZ, 1961; RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; ROBERTSON et al., 1956; SHARMA; DAWRA, 1991; VEJA; MELAGÓN, 2006; WAGNER; BLADT, 1996).

Os reveladores utilizados foram:

- Dragendorff (DRG) para alcaloides (coloração amarela-laranja);
- Hidróxido de potássio (KOH) para antraquinonas (vermelho-amarelo) e cumarinas (azul-verde) – análise a olho nu e com luz ultravioleta de comprimento de onda de 365nm;
- Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTZ) para açúcares redutores são evidenciados após revelação com solução aquosa de e aquecimento;
- Reagente de NEU (Difenilboriloxietilamina 1% em EtOH) para compostos fenólicos (bandas com fluorescência levemente azulada) e flavonóides (bandas laranja a vermelho) quando revelados com o e analisada em UV.
- FeCl₃ (cloreto férrico, 1,5%) para taninos (coloração verde, púrpura, azul ou preto);
- Lieberman-Burchard para terpenos e esteroides (coloração marrons a azuladas) após revelação com o reagente de e aquecimento;
- Anisaldeído para uma revelação universal dos compostos presentes nos extratos.

4.5.1. Bioautografia

A fração antimicrobiana foi determinada baseando-se na técnica CCD Bioautografia (CHOMA; EDYTA, 2011; SCHER et al., 2004; STANECK, J. L.; ROBERTS, 1974). Foram aplicados 10 µL do extrato com melhor atividade antimicrobiana e citotóxica em placa de sílica gel 60 F254 (Merck) utilizando o sistema de solventes $C_6H_{14}:CHCl_3:CH_2Cl_2:C_4H_8O_2:MetOH:H_2O$ (1:3:4:1:1, v/v), para os extratos da biomassa etanólico e acetônico e $C_4H_8O_2:MetOH:H_2O$ (3:3:3, v/v) para o extrato da biomassa metanólico. Após a corrida cromatográfica foi realizada a revelação biológica aplicando sobre a placa o meio de cultura MH fundido, inoculado com uma suspensão de *Staphylococcus aureus* UFPEDA com densidade de 0,5 na escala de MacFarland e incubada a 37°C por 24 horas. Após este período, a 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.

Após o período de incubação, para a melhor visualização dos resultados, as placas de CCD contendo o meio com inóculo sobreposto foram totalmente borrifadas com solução aquosa de MTT (2,5mg/mL) e incubadas por 1-2 horas para posterior leitura. A atividade foi detectada através da formação de halo de inibição contra um fundo roxo. Após mensuração da movimentação das bandas calculou-se o fator de retenção (Rf).

4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA

As linhagens de células tumorais foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Foram utilizadas seis linhagens de células, cultivadas em garrafas para cultura de células em seus respectivos meios de cultura (Tabela 4). Estes meios foram suplementados com soro fetal bovino a 10% e com antibióticos a 1%, penicilina e estreptomicina incubada em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. O acompanhamento do crescimento celular foi realizado através do microscópio de inversão.

Foi realizado um *screening* inicial com a concentração de 50 dos extratos e aqueles que apresentaram 70% de inibição celular teve suas concentrações seriadas (0,048 - 50µg/mL).

Tabela 4. Linhagens de células e seus respectivos meios de cultura.

Linhagem de células	Meio de cultivo
HEp-2 (câncer de laringe)	DMEM
HL-60 (leucemia)	RPMI
HT- 29 (câncer de cólon)	DMEM
MCF-7 (câncer de mama)	RPMI
NCI-H292 (câncer de pulmão)	DMEM
RAW 264.7 (macrófagos murino)	DMEM

Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

A avaliação da atividade citotóxica dos compostos em células humanas foi realizada através do teste de MTT. Esse ensaio baseia-se na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo tetrazólio (MTT) em formazan, pela ação da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). Suspensões celulares de 10^5 células/mL (NCI-H292, HEp-2, MCF-7, RAW 264.7) e $0,3 \times 10^6$ células/mL (HL-60) foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas com os produtos em concentrações seriadas (0,048 - 50 μ g/mL) durante 72h. Após esse período, as células foram re-incubadas com MTT (5 mg/mL) por mais 3 h, os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO e a absorbância foi lida em 540 nm, usando um leitor de microplacas.

4.7 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para a realização desse experimento foram utilizados camundongos albinos Swiss *Mus musculus*, pesando 30 g (aproximadamente 60 dias de nascidos), provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. Os animais foram mantidos sob temperatura de $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, com ciclo claro e escuro (12h) e água e ração *ad libidum*. Os protocolos experimentais realizados seguirão os princípios técnicos e éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto foi submetido e aceito pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Pernambuco, processo 23076.005794/2014-23.

Os metabólitos que apresentaram atividade citotóxica significativa foram avaliados quanto ao seu potencial em causar lesões na membrana plasmática das células, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. O sangue foi coletado de camundongos Swiss (*Mus musculus*), previamente anestesiados, por punção cardíaca (n=3). Os eritrócitos foram lavados em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) por centrifugação (3000 rpm/ 5 min), o sobrenadante descartado e então as células foram ressuspensas em solução salina para se obter uma solução de eritrócitos (SE) a 2%. Em seguida, os extratos na concentração de 500µg/mL foram incubados com eritrócitos em placa com 96 poços. Após incubação por 1 hora sob agitação constante e a temperatura ambiente, a placa permaneceu em repouso por um período de uma hora, após o qual o sobrenadante foi analisado. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas (450 nm). Neste ensaio, a concentração efetiva 50% (CE₅₀) e o respectivo intervalo de confiança 95% foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa *GraphPad Prism* 5.0. Apenas os extratos que apresentaram valores de CE₅₀ < 200 µg/mL foram considerados hemolíticos (AGUIAR et al., 2012; COSTA-LOTUFO et al., 2005).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade e atividade hemolítica foram expressos como média ± e.p.m (erro padrão da média) e comparados com os controles por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Newman-Keuls. A concentração inibitória (CI₅₀) e a concentração máxima capaz de provocar 50% do efeito máximo (CE₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram obtidos a partir de regressão não-linear utilizando o programa *GraphPadPrism*.

A análise estatística dos dados foi efetuada com o auxílio do programa *GraphPad Prism* e os dados foram apresentados como média ± desvio da média de três experimentos independentes.

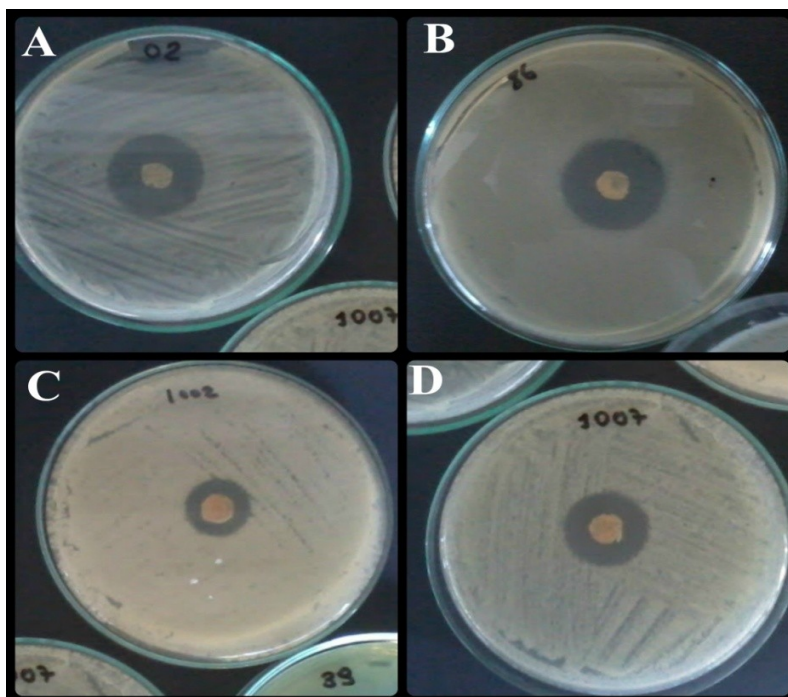
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - ENSAIO PRIMÁRIO

A atividade antimicrobiana foi realizada com actinobactéria *Streptomyces* sp UFPEDA 3407 através do Teste de bloco de gelose ou de difusão em ágar, frente a diferentes micro-organismos. Este teste de antagonismo permitiu que o metabólito secundário produzido pela actinobactéria em meio sólido se difundisse no meio de cultura inibindo o crescimento do micro-organismo teste. A presença do metabólito secundário ativo proporcionou a formação de um halo transparente ao redor do disco, cujo diâmetro indicou o potencial antimicrobiano, frente a determinado micro-organismo teste.

Os resultados obtidos mostraram que a actinobactéria apresenta um bom espectro de ação com atividade para bactérias (Gram-positivas) e fungos (leveduriforme), com halos de inibição variando entre 19 a 26 mm (Figura 7 e Tabela 5)

Figura 7. Halos de inibição do bloco de gelose de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3407.



A: *S. aureus* (UFPEDA-02); **B:** *B. subtilis* (UFPEDA-86); **C:** *C. krusiie* (UFPEDA-1002); **D:** *C. albicans* (UFPEDA-1007) Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Tabela 5. Médias dos diâmetros e desvio padrão dos halos de inibição (em mm) do bloco de gelose de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3407 frente a diversos micro-organismos teste.

Micro-organismos	Halos de inibição (mm)
<i>S. aureus</i> UFPEDA 02	26 ± 1,0
<i>M. luteus</i> UFPEDA 06	-
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 39	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 86	26 ± 1,0
<i>C. khruziie</i> UFPEDA 1002	19,3 ± 0,6
<i>C. albicans</i> UFPEDA 1007	22,3 ± 0,7

Média ± desvio-padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Zhao et al (2009) realizaram teste de difusão em ágar de actinobactérias isoladas de sedimentos marinhos chinês, Província de Hunan, e observaram que algumas estirpes mostraram amplo espectro de atividade antimicrobiana. Alguns isolados apresentaram atividade fungicida, enquanto outros apresentaram atividade contra *P.aeruginosa*, *S. aureus* e *B. subtilis*, com halos de até 22 mm, 30 mm, 25 mm e 26 mm, respectivamente.

Higginbotham e Murphy (2010) ao avaliar a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* isolado de solo cambojano mostraram que a actinobactéria apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras apresentou um bom espectro de ação frente a um *S. aureus* MRSA mostrando halos de até 22 mm de diâmetro.

Pazhanimurugan et al., (2012) isolaram *Streptomyces* do solo indiano e o mesmo mostrou atividade antimicrobiana para *S. aureus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, e *K. pneumoniae*, com halos que variavam de 12 a 16 mm de diâmetro.

Samer e Al-Hulu (2015) isolaram trinta actinobactérias do solo coletado na cidade de Hilla, Iraque. Cinco isolados exibiram atividade antimicrobiana para *S. aureus*. A actinobactéria identificada como *Streptomyces* sp foi ativo contra *S. aureus* com 20 mm de zona de inibição.

6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - ENSAIO SECUNDÁRIO

A fermentação busca determinar as melhores condições de crescimento da actinobactéria, bem como o melhor meio e tempo, para a produção do antibiótico. O diâmetro dos halos verificados a cada 24 horas possibilitou determinar o melhor tempo de fermentação do micro-organismo, como mostra a tabela 6.

Tabela 6. Média e desvio padrão dos halos de inibição (em mm) e pH de *Streptomyces* sp UFPEDA 3407 a cada 24 horas de fermentação.

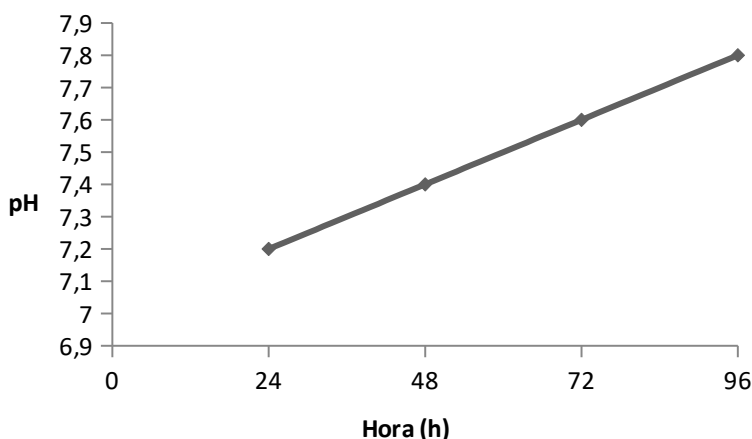
Micro-organismos	24h	48h	72h	96h
<i>S. aureus</i> UFPEDA 02	-	12 ± 0,6	14 ± 1,0	16,7 ± 1,6
<i>M. luteus</i> UFPEDA 06	-	15 ± 0	21,3 ± 0,6	21,3 ± 0,6
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 39	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 86	-	-	14,3 ± 1,2	18,3 ± 0,6
<i>C. khruziie</i> UFPEDA 1002	-	12,7 ± 1,2	13,3 ± 1,2	13,3 ± 1,2
<i>C. albicans</i> UFPEDA 1007	-	19,7 ± 0,6	18 ± 1,4	19 ± 0

Média ± desvio-padrão da média. Elaborado pelo autor (2015).

O melhor tempo para produção do composto bioativo foi de 96 horas para cinco dos seis micro-organismos que se mostraram sensíveis, onde foi observado o aumento no halo de inibição para alguns micro-organismos testes satisfatório (halos > 15 mm), quando comparado com os halos de 72 horas. *P. aeruginosa* exibiu resistência a cada 24 horas em que ocorreu a fermentação.

Foi observado que o pH variou em 0,2 a cada 24 h de fermentação (Gráfico 1). Reddy et. al. (2011) também observaram uma influência significativa do pH do meio líquido ao fermentar *Streptomyces rochei* visando à produção de metabólitos bioativos. No seu estudo foi obtido um pH ótimo variando entre 7,5 e 8,0, o qual estimulou a produção de metabólitos bioativos e o crescimento do micélio no meio.

Gráfico 1 – Variação do pH a cada 24 horas de fermentação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Pfefferle e colaboradores (2000) relatam que a maioria dos metabólitos secundários, como os antibióticos, são produzidos por espécies geneticamente distintas e também através de diferentes vias metabólicas, podendo assim, as condições ambientais serem fatores altamente significativos para alterações na produção de antibióticos durante a fermentação. Parâmetros envolvidos no processo de fermentações tais como pH, temperatura, composição nutricional do meio e o tempo de fermentação, devem ser determinados para quantificar os metabólitos secundários produzidos pela linhagem isolada.

6.3 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO BIOATIVO - BIOMASSA E LÍQUIDO METABÓLICO

Após a determinação do melhor tempo de fermentação, a actinobactéria *Streptomyces* sp UFPEDA 3407 foi submetida ao processo fermentativo e teve seu composto bioativo extraído da biomassa com solventes miscíveis em água e do líquido metabólico com solventes não miscíveis em água e em diferentes pHs.

Os resultados obtidos mostraram que o metabólito bioativo da biomassa da actinobactéria *Streptomyces* sp UFPEDA 3407 extraídos com os solventes acetona, etanol e metanol (rendimentos de 1,29%, 2,22% e 0,32%, respectivamente) apresentaram um bom espectro de ação com atividade para bactérias (Gram-positivas) e fungos (leveduriforme),

apresentando médias dos halos de inibição, no geral, entre 14 a 16,5 mm, conservando uma boa atividade antimicrobiana, como pode ser observado na tabela 7.

Os extratos do líquido metabólito apresentaram baixo rendimento (extrato hexânico do líquido metabólico – LM H: 0,001%; extrato clorofórmico do líquido – LM TCE: 0,002%; e, extrato acetoetílico do líquido metabólico – LM ACOET: 0,11%) e como não apresentaram atividade para nenhum dos micro-organismos testados, também, não foram utilizados para os demais testes.

Silva (2009) ao realizar processo de otimização para produção de compostos bioativos da actinobactéria *Streptomyces* sp. (UFPEDA 3407) destacou o cultivo submerso em meio farinha de soja (MPE) e obteve os melhores resultados de rendimentos nos extratos obtidos da biomassa, aproximadamente 0,05% de aumento para cada hora de fermentações extraídas, também, com os solventes acetona, etanol e metanol, corroborando com nossos resultados.

Tabela 7. Médias dos diâmetros e desvio padrão dos halos de inibição dos extratos da actinobactéria *Streptomyces* sp. UFPEDA 3407 frentes a diversos micro-organismos teste.

MICRO-ORGANISMOS	EXTRATOS		
	BM Acet (1)	BM MetOH (2)	BM EtOH (3)
<i>S. aureus</i> UFPEDA 02	14,5 ± 0,7	14 ± 1,4	13,5 ± 0,7
<i>M. luteus</i> UFPEDA 06	-	16 ± 0	16 ± 1
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 39	-	-	-
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 86	-	14,5 ± 0,7	14,5 ± 0,7
<i>C. khruziie</i> UFPEDA 1002	16,5 ± 0,7	-	16,5 ± 0,7
<i>C. albicans</i> UFPEDA 1007	16,5 ± 0,7	15,5 ± 0,7	15,5 ± 0,7

Média ± desvio-padrão da média; BM Ac (1): extrato acetônico da biomassa; BM EtOH (2): extrato etanólico da biomassa; BM MetOH (3): extrato metanólico da biomassa. Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Um dos fatores que levaram as bactérias Gram-positivas terem apresentado uma maior sensibilidade aos metabólitos secundários produzidos, do que as bactérias Gram-negativas estão relacionadas às diferenças estruturais observadas nas paredes celulares desses micro-organismos, sendo essas diferenças, possíveis de alterar o desempenho do metabólito

secundário produzido pelo micro-organismo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por 90% de peptidoglicano, diferente das bactérias Gram-negativas que possuem uma parede celular mais complexa, além de uma membrana externa que não é observada nas bactérias Gram-positivas. Todos esses fatores interferem na resistência a antibióticos, observadas nessas espécies (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Outro fator pode ter sido o próprio método de difusão. Embora este teste permita a mensuração e comparação com padrões de seus halos de inibição são considerados métodos qualitativos e por isso se prestam muito bem para estudos de *screening* biológico com vista a determinar o perfil de sensibilidade do composto (extrato ou substância) em teste. Uma limitação destes métodos refere-se a sua própria concepção que é a difusão, pois já foi estabelecido na literatura que a polaridade da substância ou extrato testado influencia diretamente na sua difusão pelo meio de cultivo, não apresentam resultados satisfatórios (RIOS; RECIO, 2005; RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). Além destes, não podem ser desconsiderados os fatores físico-químicos em que o micro-organismo é exposto e erros de manipulação.

6.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

A atividade antimicrobiana do extrato bruto da biomassa de *Streptomyces sp.* UFPEDA 3407 foi avaliada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), apenas para os extratos que apresentaram halos de inibição mais significativos no teste de difusão em ágar, apresentada na Tabela 7.

Este ensaio confirma a atividade dos extratos revelada pelo método anterior por ser uma metodologia mais sensível do que a do disco, pois há um maior contato entre as substâncias extraídas e o micro-organismo, já que ambos estão em uma suspensão. Os micro-organismos testes escolhidos para a determinação da CMI foram os mesmos utilizados no teste antimicrobiano por difusão de disco.

O extrato bruto metanólico da biomassa apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas com valores de CMI iguais ou abaixo de 31,2 µg/mL, enquanto para as leveduras 31,2 µg/mL e 125 µg/mL. Já o extrato bruto acetônico da biomassa apresentou valores de CMI semelhantes ao do extrato bruto metanólico para as bactérias gram-positivas, porém mostrou-se menos eficaz para as leveduras com valores variando entre 500 a 1000

µg/mL. O extrato bruto etanólico da biomassa apresentou valores da CMI iguais ou abaixo de 31,2 µg/mL quando testado frente as bactérias (Tabela 8).

Nenhuns dos três extratos apresentaram atividade antimicrobiana para o micro-organismo gram-negativo *P. aeruginosa*.

Tabela 8. Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos acetônico, etanólico e metanólico de *Streptomyces* sp UFPEDA 3407 em µg/mL.

Micro-organismos	Extratos		
	BM Acet (1)	BM EtOH (2)	BM MetOH (3)
<i>S. aureus</i> UFPEDA 02	CMI 31,2 CMB 62,5	CMI 15,6 CMB 31,2	CMI 15,6 CMB 31,2
<i>M. luteus</i> UFPEDA 06	CMI 31,2 CMB 62,5	CMI 31,2 CMB 62,5	CMI 31,2 CMB 62,5
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 39	CMI - CMB -	CMI - CMB -	CMI - CMB -
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 86	CMI 15,6 CMB 31,2	CMI 7,8 CMB 31,2	CMI 15,6 CMB 31,2
<i>C. khruziie</i> UFPEDA 1002	CMI 1000 CMF > 1000	CMI 250 CMB 500	CMI 125 CMB 125
<i>C. albicans</i> UFPEDA 1007	CMI 500 CMF 1000	CMI 125 CMF 250	CMI 31,2 CMB 125

CMI: concentração mínima inibitória; CMB: concentração mínima bactericida; CMF: concentração mínima fungicida; BMAc (1): extrato acetônico da biomassa; BM EtOH (2): extrato etanólico da biomassa; BM MetOH (3): extrato metanólico da biomassa. Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Aliagiannis et. al. (2001) consideram fortes inibidores os extratos com CMI até 500 µg/mL, inibidores moderados aqueles entre 600 e 1500 µg/mL e inibidores fracos os que apresentam CMI acima 1600 µg/mL.

Manivasagan et al. (2009) isolaram de sedimentos marinhos em Tamilnadu (Índia) a actinobactéria *Streptomyces* Sp. PM-32 e seu extrato acetoetilico após purificação apresentou concentração inibitória mínima entre 16 a 74 µg / mL.

Balachandran et al. (2014) isolaram de *Streptomyces galbus* um composto denominado 2,3-dihidroxi-9,10-antraquinona. O composto mostrou valores de CMI de 12,5 µg/mL contra bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *S. typhimurium* e boa atividade para alguns isolados clínicos: 12,5 µg/mL contra *K. pneumoniae* (ESBL-3971), *K. pneumoniae* (ESBL-3894) e *S. aureus* (MRSA) e de 50 µg / mL para *C. albicans*.

Lacretet al.(2015) isolaram três compostos de *Streptomyces zhaozhouensis* CA-185989 isolada de sedimento marinho na costa de Guiné Equatorial e os três compostos, identificados

como macrolactâmicos-tetraminas policíclicos, mostraram atividade antifúngica contra *C. albicans* e *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) com valores de CMI inferiores a 64 µg / mL.

A membrana externa das bactérias Gram-negativas apresenta uma barreira resistente à penetração de vários agentes antimicrobianos e estas possuem também um espaço periplasmático com enzimas capazes de inativar alguns antibióticos (GUIMARÃES; MONESSO; PUPO, 2010) sendo esta a razão da diferença na vulnerabilidade dos micro-organismos.

Estes estudos corroboram com o nosso trabalho, pois também foi observado atividade antimicrobiana dos extratos da biomassa de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3407 frente a bactérias Gram-positivas e leveduras. Através destes dados nota-se a alta potência antibiótica desses compostos, evidenciada pelas pequenas doses necessárias para se obter a CMI.

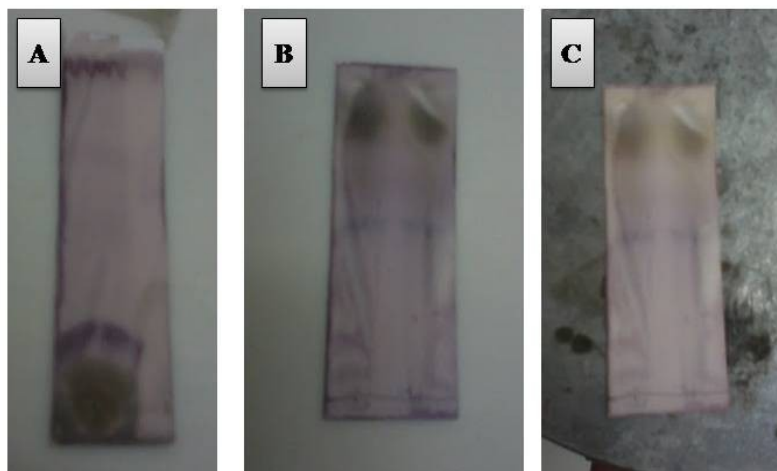
Dessa forma, a linhagem de *Streptomyces* sp UFPEDA 3407 do nosso estudo, mostra ser uma actinobactéria com elevado potencial devido à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. É importante ressaltar que os resultados da CMI dos extratos brutos obtidos neste estudo estão expressos em µg/mL, indicando assim, que o composto produzido por esta linhagem é ativo em pequenas concentrações. Resultados melhores de CMI poderão ainda ser relatados após purificação dos extratos brutos.

6.5 PROSPECÇÃO QUÍMICA

Foi realizada a prospecção química dos extratos brutos da biomassa de *Streptomyces*, pois os metabólitos produzidos por este micro-organismo mostraram apresentar boa atividade antimicrobiana.

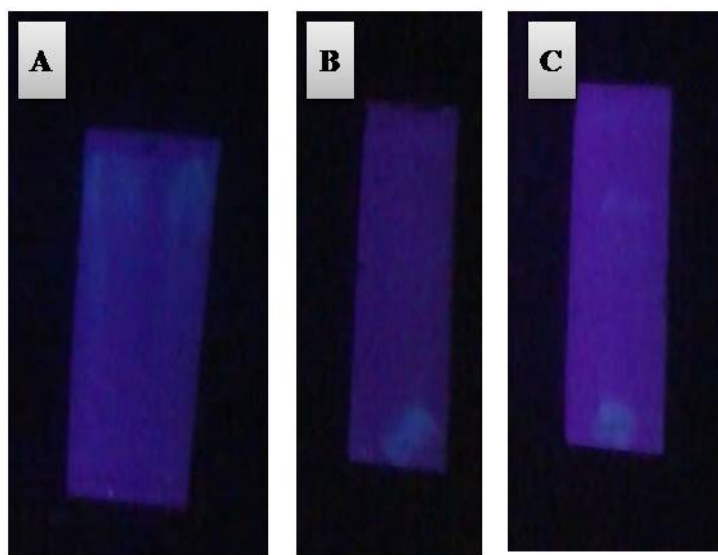
Alíquotas de cada amostra foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada para identificar a classe de metabólitos secundários. Nos extratos brutos da biomassa, foi possível verificar a presença de terpenos e cumarinas (Figura 8-9 e Tabela 9).

Figura 8: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) exibindo a presença de terpenos.



A: BMAc (1): extrato acetônico da biomassa; **B:** BM EtOH (2): extrato etanólico da biomassa; **C:** BM MetOH (3): extrato metanólico da biomassa. Fonte: Elaborado pelo autor (2015). Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Figura 9 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) exibindo a presença de cumarina.



A: BMAc (1): extrato acetônico da biomassa; **B:** BM EtOH (2): extrato etanólico da biomassa; **C:** BM MetOH (3): extrato metanólico da biomassa. Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Tabela 9. Prospecção química por Cromatografia em Camada Delgada dos metabólitos secundários bioativos produzidos pela actinobactéria *Streptomyces* sp UFPEDA 3407.

METABÓLITOS	BM MetOH	BM EtOH	BM Acet
Esteroides e terpenos	+	+	+
Alcaloides	-	-	-
Antraquinona e	+	+	+
Cumarina	-	-	-
Flavonoides	-	-	-
Taninos	-	-	-
Açúcares redutores	-	-	-

Presença (+); ausência (-). Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Takagi et al (2005) isolaram dois terpenos, naftoterpenos **B** e **C** do extrato acetoetílico de *Streptomyces* sp. CL190 e estes apresentaram atividade antioxidante.

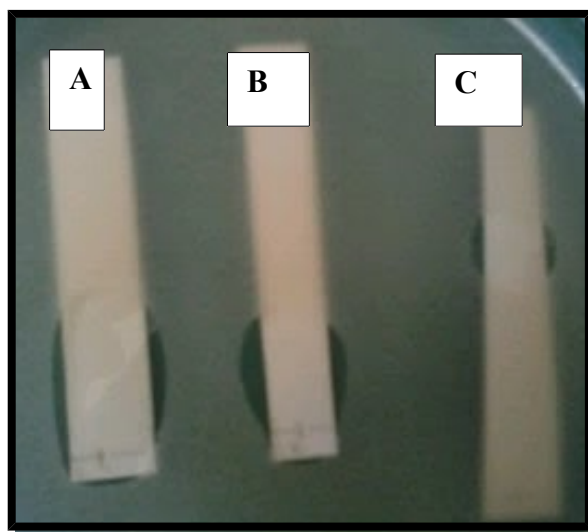
Motohashi et al (2008) isolaram do sedimento marinho de Tokushima (Japão) a actinobactéria *Streptomyces* sp. MS239. A prospecção química do extrato purificado possibilitou o isolamento de dois novos terpenoides nomeado ácido 5-dimetil-indol-3-carboxílico e ácido 8-A80915G que apresentaram atividade antimicrobiana para *B. subtilis*.

Thomas et al (2011) realizaram a prospecção química de 36 extratos bacterianos isoladas de diferentes habitats. O extrato metanólico da biomassa de uma das bactérias identificada como B-2 exibiu a presença de alcaloides, carboidratos, compostos fenólicos, proteínas e aminoácidos, enquanto que no líquido metabólico os solventes inorgânicos, éter de petróleo e acetato de etila, permitiram a extração de flavonoides e esteróis.

6.6 BIOAUTOGRAFIA

Os três extratos estudados apresentaram frações com atividade bacteriana. O extrato da biomassa mostrou uma fração com fator de retenção (Rf) 0,4 para os extratos da biomassa acetônico e etanólico e uma fração com Rf 0,7 para o extrato da biomassa metanólico com atividade frente a *S. aureus* (Figura 10). A purificação destes compostos poderá esclarecer estes resultados preliminares.

Figura 10. Placa exibindo halos de inibição da bioautografia.



A: BMAc (1): extrato acetônico da biomassa; **B:** BM EtOH (2): extrato etanólico da biomassa; **C:** BM MetOH (3): extrato metanólico da biomassa. Fonte: Elaborado pelo autor (2015). Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Hozzein, Rabie, Ali (2011) isolaram actinobactérias no deserto egípcio. Após extração utilizando acetato de etila, realizaram a purificação parcial por coluna e a bioautografia, utilizando o sistema heptano:acetato de etila (3:2). A técnica utilizada revelou que a estirpe *Streptomyces* D332 foi capaz de produzir apenas um único composto ativo com Rf de 0,28, para uma bactéria Gram-positiva.

Pazhanimurugan et al (2012) isolaram vinte actinobactérias do solo indiano (Tamil Nadu, sul da Índia). Uma delas foi identificada como *Streptomyces aureocirculatus* e após extraírem o composto bioativo com acetato de etila, realizaram a purificação parcial por coluna e bioatografia utilizando o sistema clorofórmio: metanol (40:60). A bioautografia mostrou duas bandas com valores de Rf iguais a 0,465 e 0,685, respectivamente, apresentaram atividade contra *S. aureus*.

Kaur e Manhas (2013) isolaram a actinobactéria *Streptomyces hydrogenans* em solo indiano e o extrato acetoetílico, após purificação parcial com sistema de solventes metanol:clorofórmio (7:3), mostrou com bioautografia a presença de três compostos bioativos com valores de Rfs iguais a 0,31, 0,62 e 0,82, respectivamente, também para *S. aureus*.

É importante destacar que a bioautografia é uma técnica rápida e eficiente para a detecção de antimicrobianos presentes nos extratos, onde geralmente há misturas complexas de compostos, mesmo estando em pequenas quantidades. No entanto, a técnica restringe à identificação da banda que possui atividade antimicrobiana e não informa os valores da

concentração mínima inibitória, nem natureza dos compostos responsáveis pela ação antimicrobiana. No entanto, diferentes estudos relatam que a maioria dos compostos produzidos pelo gênero *Streptomyces* com atividade antibacteriana detectada pelo método da bioautografia, possuem Rfs semelhantes aos encontrados no nosso trabalho. (HOZZEIN, RABIE, ALI, 2011; KRISHNAVENI et al., 2011; SCORZONI et al., 2007).

6.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Na tabela 10 pode-se observar os resultados, em percentuais, da inibição do crescimento celular (CI%) da triagem inicial da citotoxicidade dos extratos brutos na concentração de 50 µg/mL.

O extrato acetônico da biomassa (BM Acet) proveniente da fermentação em cultivo submerso apresentou alta atividade com 94,0 % de inibição para as linhagens HT-29 (câncer de cólon) e 91,3% para MCF-7 (câncer de mama). E a atividade foi moderada atividade para as linhagens HEP-2 (câncer de laringe), HL-60 (leucemia) e NCI-H292 (câncer de pulmão) com valores de inibição inferiores a 70%.

O extrato metanólico da biomassa (BM MetOH) apresentou moderada atividade para Hep-2 e Ncl-H292, onde a inibição do crescimento celular foram inferiores a 70%, respectivamente, e alta atividade para H-60 (leucemia), HT-29 (câncer de cólon) e MCF-7 (câncer de mama) com valores até 94%.

O extrato etanólico da biomassa (BM EtOH) foi o que apresentou os maiores valores de inibição iguais a 100% para a linhagem tumoral Hep-2 (câncer de laringe), HL-60 (leucemia) e MCF-7 (câncer de mama), 96% para HT-29 (câncer de cólon). A atividade foi moderada para NCI-H292 (câncer de pulmão) com valor de inibição igual a 69,0%.

Tabela 10. Percentual de inibição do crescimento celular (CI%) dos extratos e partições em seis linhagens tumorais testados na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

EXTRATOS	LINHAGENS CELULARES					
	HEp-2	HL-60	HT-29	MCF-7	NCI-H292	RAW 264.7
BM Acet	66,0 ± 0,6	61,0 ± 0,4	94,0 ± 1,1	91,3 ± 1,0	68,0 ± 0,6	95,4 ± 2,1
BM EtOH	100,0 ± 1,2	100,0 ± 0,3	96,0 ± 1,2	100,0 ± 0,0	69,0 ± 0,3	95,0 ± 2,2
BM MetOH	64,2 ± 1,0	82,1 ± 0,2	94,2 ± 0,7	86,3 ± 2,1	68,0 ± 0,6	89,0 ± 2,4
DOX	79,3 ± 2,6	93,0 ± 0,6	64,1 ± 1,1	75,0 ± 2,1	94,1 ± 2,0	96,5 ± 0,8

BMAc: extrato acetônico da biomassa; BM EtOH: extrato etanólico da biomassa; BMMetOH: extrato metanólico da biomassa; DOX: doxirrubicina; SA: sem atividade; pouca atividade: $1 \geq 50\%$; moderada atividade: $50 \geq 70\%$; alta atividade: $70 \geq 100\%$; ± erro padrão da média.

O ensaio do MTT é um teste rápido e sensível usado para determinar possíveis efeitos danosos às mitocôndrias e ao metabolismo celular (FISCHER et al., 2003). É um método vantajoso já que minimiza a necessidade no uso dos animais em experimento, assim como, fornece dados para determinar a toxicidade em célula ou órgão específico (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002).

Os extratos (0.39 – 50µg/mL) que apresentaram atividade moderada ($> 70\%$ de inibição) em duas linhagens foram submetidos a determinação da concentração que inibe 50 % do crescimento em relação ao controle negativo (CI_{50}).

Todos os extratos brutos apresentaram $CI_{50} < 30$ µg/mL frente as linhagens testadas (Tabela 11) revelando que esses extratos brutos após purificação se mostram promissores (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

Tabela 11. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) e o intervalo de confiança (CI 95%) do extrato bruto e partições em seis linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.

EXTRATOS	LINHAGENS CELULARES					
	HEp-2	HL-60	HT-29	MCF-7	NCI-H292	RAW 264.7
BM	n.t.	n.t.	18,9	24,1	n.t.	10,4
Acet BM	16,38	7,08	14,6 -24,6 7,15	20,2 – 28,8 8,55	n.t.	8,7 – 12,4 1,31
EtOH	13,8-19,4	5,8 – 8,6	6,1 – 8,4	7,4 – 9,8		1,0 – 1,8
BM	n.t.	7,6	10,6	10,6	n.t.	10,3
MetOH		5,3 – 10,8	9,6 – 11,6	15.2 -22,9		9,4- 11,3
DOX	0,3 0,3 – 0,4	0,1 0,1 – 0,1	1,8 1,4 - 2,4	0,1 0,1 – 0,2	0,1 0,1-0,1	0,35 0,3-0,5

BMAc: extrato acetônico da biomassa; BM EtOH: extrato etanólico da biomassa; BMMetOH: extrato metanólico da biomassa; DOX: doxirrubicina; n.t.: não testado. Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Estes resultados são semelhantes aos obtidos para outras espécies do gênero *Streptomyces* conforme descrito a seguir.

Cheng et al. (2013) isolaram e identificaram nove tipos de napiradiomicinas extraído de *Streptomyces* sp. SCSIO 10428. Os compostos identificados como napiridiomicina **1** e **4** e exibiram alta citotoxicidade contra linhagem celular de carcinoma colorretal humano (HCT-116) com o valor de CI₅₀ igual a 4,19 e 1,41 µg/ mL, respectivamente.

Wu et al (2014) avaliaram também a citotoxicidade de quatro compostos análogos a antraquinonas (**1-4**) isolados de *Streptomyces* sp. WS-13394. Todos os compostos apresentaram atividades contra as linhagens cancerígenas celulares, sendo compostos análogos **1**, **3** e **4** para as linhagens de câncer gástrico (BGC-823) e câncer de mama (MCF-7) com CI₅₀ 0,99 e 3,54 µg /mL respectivamente, enquanto antraquinona **2** exibiu citotoxicidade contra as linhagens carcinoma hepatocelular (HepG2), melanoma maligno humano (A875), câncer gástrico (BGC-823) e câncer de mama (MCF-7) com CI₅₀ de 2,29 e 4,90, 0,99, e 1,66 µg /mL, respectivamente.

Sudha Srikesavan e Selvam (2014) isolaram do solo marinho indiano quatro actinobactérias, PCL-1, SU-2, SU-4 e SU13, e seus extratos acetotílico exibiram atividade citotóxica para células HEp-2 e células VERO pelo ensaio de MTT. Os isolados,

posteriormente identificadas como *Streptomycesavidinii*, *S. cacaoi*, *S. coelicolor* e *S. cavourensis*, mostraram valores de CI_{50} para a linhagem cancerígena celular Hep-2 iguais a 64,5, 32,1, 125, 16,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e para a linhagem celular VERO os valores foram de CI_{50} de 94,6, 64,5, 250, 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Prashanthi e Varalakshmi (2015) isolaram três actinobactérias do solo marinho identificadas como *Prauserella marina*, *Streptomyces sindenensis* e *S. spiroverticillatus*. A fração purificada do extrato acetotílico de *P. marina* revelou fator de retenção (Rf) 0,8 que inibiu a proliferação da linhagem celular cancerígena cervical (HeLa) em 77, 68, 54 e 40% nas concentrações de 15, 10, 5, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os valores de CI_{50} da fração foi iguais 3,3 $\mu\text{g/mL}$.

6.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os extratos acetônico, etanólico e metanólico da biomassa causaram hemólise aos eritrócitos murinos, com valores da concentração efetivas iguais a 127,8 $\mu\text{g/mL}$, 150,8 $\mu\text{g/mL}$ e 166,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Tais resultados sugerem que o efeito citotóxico seja causado por danos à membrana celular.

O ensaio da atividade hemolítica é realizado para determinar o potencial que a substância teste apresenta em causar lise a membrana celular (SAURAV; KANNABIRAN, 2012). A membrana do eritrócito é uma estrutura dinâmica que responde diretamente às interações com fármacos e mudanças em sua estrutura ou no citoesqueleto podem causar hemólise, associado a casos clínicos como anemia hemolítica (COSTA-LOTUFO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011).

Suthindhiran e Kannabiran (2009) ao investigar o potencial hemolítico do extrato bruto de *Streptomyces* sp.VITSDK1, isolada de sedimentos marinhos, verificaram atividade hemolítica significativa para eritrócitos de murinos e humanos com CE_{50} de 127 $\mu\text{g/mL}$ e 168 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, corroborando com os resultados obtidos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que:

- A fermentação em cultivo submerso por 96 horas em meio farinha de soja (MPE) mostrou ser o melhor tempo para obtenção do composto bioativo;
- Os extratos da biomassa apresentaram atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-positivas e leveduras;
- A prospecção química revelou a presença de dois compostos, sendo um com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* – como determinado pela bioautografia;
- Os extratos da biomassa etanólico e metanólico apresentaram maiores efeitos citotóxicos nas linhagens testadas e a maior atividade foi frente as linhagens HL- 60, HT-29 e MCF-7.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Particionar o extrato que melhor apresentou atividades antimicrobiana e citotóxico;
- Avaliar a citotoxicidade das frações do extrato particionado;
- Visualizar as alterações morfológicas provocadas pela citotoxicidade através da morfologia de linhagem cancerígena leucêmica Hl-60;
- Avaliar o mecanismo de morte celular.
- Identificar a actinobactéria em nível de espécie.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. R.; BAYER, K.; HENTSCHEL, U. Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 381-399, 2014.
- AGUIAR, J. S. et al. Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4124-4140, 2012.
- ALLEY, M. C et al. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell.Lines Using a MicrocultureTetrazolium Assay.**Cancer Reserch**, v. 48, p. 589-601, 1988.
- ALIGIANNIS N. et. al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-70, 2001.
- ALVAN G.; EDLUND C.; HEDDINI A. The global need for effective antibiotics – summary for plenary presentatios. **Drug Resistance Updates** v. 14, p. 70-76, 2011.
- 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.
- ANWAR, S. et al. Insecticidal Activity of Actinomycetes Isolated from Salt Range, Pakistan against Mosquitoes and Red Flour Beetle. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n. 1, p. 83-92, 2014.
- ANTUNES, T. C. et al. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 131-138, 2013.
- ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA CNPMA, p. 351-367, 1998.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- BALACHANDRAN, C. et al. Antimicrobial and Cytotoxicity Properties of 2,3-Dihydroxy-9,10-Anthraquinone Isolated from *Streptomyces galbus* (ERINLG-127). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3513–3528, 2014.
- 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.
- BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 208–215, 2005.

BOLIVAR, P. et al., Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galiummexicanum*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 137, p. 141-147, 2011.

BRITO, M.A.M. *Estreptomicetos promotores de crescimento de planta de girassol Helionthusannuus L e Pinhão Manso Iatrophacurcos L*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Cruz das Almas – BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UENF, p. 86, 2010.

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

BULL, A.T.; ASENJO, J.A. Microbiology of hyper-arid environments: Recent insights from the Atacama Desert, Chile. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 1173–1179, 2013.

CARVALHO, T. S.; OLIVEIRA, D. V.; DER SAND, S. T. Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetosendofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos. **Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.6, n. 3, p.154-157, 2012.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends Cell Biology**, v. 5, p. 229-237, 2003.

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

CHAVASCO, J.M et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from Southern Minas Gerais, Cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.56, n. 1, p. 13-20, 2014.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.

CHEN, H-H. et al. *Micrococcus endophyticus* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Aquilariasinensis* roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1070 – 1075, 2008.

CHENG, Yuan-Bin; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Cytotoxic and Antimicrobial Napyradiomycins from Two Marine-Derived, MAR 4 *Streptomyces* Strains, **European Journal of Organic Chemistry**, v. 18, p.1-17, 2013.

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.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M.T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência Hoje**, v. 286, n. 30, 2012.

COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 58-66, 2009.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 231–1234, 2002.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 21–30, 2005.

COSTA-LOTUFO L.V et. al. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRUZ, R. B. et al. Acetone extract from *Streptovercillium sp.*, a bacterium isolated from Brazilian Cerrado soil, induces anti-inflammatory activity in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, 2013.

DAMASCENO, J.C.A. *Actinobactérias na promoção de crescimento e controle de Meloidogyne javanica em mudas de tomateiro*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Cruz das Almas – BA: UFRB, p. 95, 2011.

DEMAIN A. L. **Small bugs, big business: the economic power of the microbe**. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499–514, 2000.

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

DEMAIN A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 259–64, 1998.

DE LAS LLAGAS, M. C.; SANTIAGO, L.; RAMOS, J. D. Cytotoxicity and Apoptotic Activity of *Ficus pseudopalma* Blanco leaf extracts against human prostate cancer cell lines. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research January**, v. 13, n. 1, p. 93-100, 2014.

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

DIETZ, A.; MATHEWS, J. Classification Of Streptomyces Spore Surfaces Into Five Groups. **Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 527-533, 1971.

DYSON P. J. ***Streptomyces: molecular biology and biotechnology***. [Wymondham]: Caister Academic; 2011.

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

EL-SHATOORY, S. A.; EL-SHENAWY, N. S.; Abd EL-SALAM, I. M. Antimicrobial, antitumor and in vivo cytotoxicity of actinomycetes inhabiting marine shellfish. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1547-1555, 2009.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nature Biotechnology**, v.24, p. 1497 – 1503, 2006.

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

GEORGE M et al. Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 2265-2271, 2012.

GOPALAKRISHNAN, S. et al. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. **Microbiological Research**, v.169, p. 40– 48, 2014.

GOODFELLOW M. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer; 2012.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 119-142, 2010.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. Introduction to and importance of actinomycetes, In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic Press, p. 2-5, 1998.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 699, 2008.

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.

HAYAKAWA M.; YOSHIDA Y.; LIMURA Y. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 973-81, 2004.

HIGGINBOTHAM, S. J.; MURPHY, C. D. Identification and characterization of a *Streptomyces* sp. Isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 82-86, 2010.

HJERTSTEDT, J. et al. Comparison of fungal viability assays using *Candida albicans* yeast cells undergoing prolonged incubation in the absence of nutrients. **Mycoses** v. 41, p. 487-492, 1998.

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

HWANG, K. S. et al. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 255–268, 2014.

ICHIKAWA. T; ISHIKURA, T; OZAKI, A.A improvement of kasugamycin – Producing Strain by the Agar Piece Method and Prototroph Method. **Folia Microbiológica**, v.16, p. 218-224, 1971.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação – Rio de Janeiro, p. 129, 2012.

KAGEYAMA, A. et al. *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 53–56, 2008.

KAMALA, K. et al. Isolation and characterization of biologically active alkaloids from marine actinobacteria *Nocardiopsis* sp. NCS1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 63–69, 2015,

KAUR, T.; MANHAS, R. K. Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16J. *Basic Microbiol.*, v. 53, p. 1–11, 2013.

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

KUMAR, P. S. et al. Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n.12, p. 936-943, 2012.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417–434, 2009.

LACRET, R. et al. New Ikarugamycin Derivatives with Antifungal and Antibacterial Properties from *Streptomyces zhaozhouensis*. **Marine Drugs**, v. 13, p. 128-140, 2015.

LECHEVAILIER, 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 & Wilkins, v. 4, 1989.

LETEK, M.; et al. Cytoskeletal Proteins of Actinobactéria. **International Journal of Cell Biology**, 2012.

LIN, Q.; LIU, Y. A new marine microorganism strain L0804: taxonomy and characterization of active compounds from its metabolites. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 1549-1556, 2010.

LIU, J.T. et al. Bioactive natural products from the antarctic and arctic organisms. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 617–626, 2013.

LYRA, F. D. A. et al. Ciclamicina e ciclacidina, dois novos antibióticos corados, produzidos pelo *Streptomyces capoamus* nov. sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 36, 323-334, 1964.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed. 12 ed., p. 1160, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª Edição, p. 610, 2004.

MANIVASAGAN, P. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of an Actinobacteria (*Streptomyces* Sp. PM-32) Isolated from an Offshore Sediments of the Bay of Bengal in Tamilnadu. **Advances in Biological Research** v. 3 n. 5-6, p. 231-236, 2009.

MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 282–293, 2005.

MCGREGORJ., F. Nuclear division and the life cycle in a *Streptomyces* sp. **Journal of General Microbiology**, v. 11, p. 52, 1954.

MEHRAVAR, M.; SARDARI1, 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.

MORAIS et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ**, v. 17, n.1, p. 27-34, 2014.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 53-63, 1983.

MOTOHASHI, K. et al. Studies on terpenoids produced by Actinomycetes: oxaloterpins a, b, c, d, and e, diterpenes from *Streptomyces* sp. ko-3988. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 75–80, 2008.

NEWMAN D. J.; CRAGG G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal Natural Products**, v. 70, p. 461-77, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NIGAM, PS. Production of bioactive secondary metabolites. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. Springer Netherlands, p. 129-145, 2009.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 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 N. F. *Uso indiscriminado de antibióticos nos serviços de atenção básica* [monografia]. Ipatinga (MG): Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

OLIVEIRA, T. L. et al. 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.

OLIVEIRA et al. Biological evaluation of twenty-eight ferrocenyl tetrasubstituted olefins: Cancer cell growth inhibition, ROS production and hemolytic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3778-3787, 2011.

PATRICK, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press**: New York, 2005, cap.16; PATRICK, G. L.; **An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press**: New York, cap. 10, 1995.

PAZHANIMURUGAN R. et al. Bioactive potential of actinobacteria against drug resistant pathogens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 5, p. 167-173, 2012.

PFEFFERLE, C.; et. al. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. **Jornal of Biotechnology**, v. 80, p. 135-142, 2000.

PRASHANTHI, K.; VARALAKSHMI, K. N. *In vitro* cytotoxic and antibacterial potentials of extracts from three marine isolates of Actinomycetes isolated from coastal ecosystems of Tanur, Kerala, India. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 10, p. 57-62, 2015.

PRAVEEN, V. et al., Production of Actinomycin-D by the mutant of a new isolate of *Streptomyces sindenensis*, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 689-692, 2008.

QIN, S. et al., *Nocardioides panzhihuaensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from medicinal plant *Jatropha curcas* L. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, p. 353 – 360, 2012.

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

RAJASEKARAN R. Microbial biotechnology Rapid Advances in an area of massive impact. **Microbial biotechnology Rapid Advances in an area of massive impact**, v. 7,n. 5, p. 19-25, 2008.

RAJU, A. et al. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. **Chemistry European Journal**, v. 16, p.3194 – 3200, 2010.

RAVEH, A. et al. Discovery of potent broad spectrum antivirals derived from marine actinobacteria. **Plos One**, v. 8, n 12, 2013.

RAVIKUMAR S. et al. Antagonistic properties of seagrass associated *Streptomyces* sp. RAUACT- 1: a source for anthraquinone rich compound. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v. 5, n. 11, p. 887–90, 2012.

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, T. V. et. Al. *Streptomyces hyderabadensis* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 61, p. 76–80, 2011.

RENNER, M. K. et al. Cyclomarins A-C, new anti-inflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). **Journal of the American Chemical Society**, v.121, p. 11273–11276, 1999.

RIBEIRO, M.G. et al. Nocardiopsis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 177-185, 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–84, 2005.

RIOS J.L.; RECIO M. C.; VILLAR A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 1127-1149, 1988.

ROSLY, S. A.; S. SASIDHARAN, N.S. LAI. Anti- *Helicobacter pylori* activity of crude acetonic extracts of *Streptomyces* sp. H7372. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 3, p. 247, 2014.

SAGA T.; YAMAGUCHI K. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. **Japan Medical Association Journal**, v. 52, n. 2; p. 103–108, 2009.

SALAZAR, A.; ORDOÑEZ, C. Aislamento e identificación de actinomicetosfijadores de nitrogeno em suelodelJardínBotánico de laUniversidad Tecnológica de Pereira. (Tesis de Químico Industrial, Universidad de Pereira), 2013.

SAMER; AL-HULU. Effects of Some Conditions on Antibacterial Activity of Actinomycetes Spp. Isolated from Soil Samples. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 9, n.1, p. 86-90, 2015.

SANTOS, M. G. et al. Fatores de risco em radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 58, n. 2, p. 191-196, 2010.

SAWADA, N. O. et al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 43, n. 3, p. 581-587, 2009.

SCHER, J. M. et al. Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzaniatrilotata* (L.) S. F. Gray. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2583-2588, 2004.

SCHLEGEL, H. G. **General Microbiology**. 7.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

SILVA, D P. et al., Resíduos de Antibiótico em leite: prevalência, danos à saúde e prejuízos na indústria de laticínios. **Evidência**, v. 13, n. 2, p. 127-152, 2013.

SILVA, J. F. *Avaliação do potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas da região de Maués, Amazonas*. Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Nazaré da Mata: UPE, 2012.

SIEBER O.M.; HEINIMANN K.; TOMLINSON I. P. M. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. **Nature Revist**, v. 3, p. 701-708, 2003.

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, M. Actinomycetes: source, identification, and their applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 801-832, 2014.

SHARMA, C. et al. Saline Waters: a potential source of actinomycetes possessing antibacterial activity. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 242-251, 2013.

SOUZA, M. V. N. et al. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. **RevistaFitos**, n. 2, 2007.

STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. **Introduction to the taxonomy of Actinobacteria**. 3ª ed. Berlin: Prokaryotes, p. 1111, 2006.

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

STRINGARI, D. *Estudo da variabilidade genética de Guinardiaspp por meio de marcadores RAPD e sequências ITS*. Dissertação de mestrado. Curitiba: UFPR, 2004.

SUTHINDHIRAN, K.; KANNABIRAN, K. Hemolytic activity of *Streptomyces* VITSDK1 spp. isolated from marine sediments in Southern India. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, p. 77-86, 2009.

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

TAKAGI, H. et al. Studies on Terpenoids Produced by Actinomycetes: Isolation and Structural Elucidation of Antioxidative Agents, Naphterpins B and C. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 4, p. 275–278, 2005.

TEITEN M-H. et al. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- κ B activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, p. 3850–3858, 2013.

TERRÍVEL, J. et al., Conhecimento dos médicos relativo à prescrição de antibióticos e à resistência microbiana: estudo piloto de comparação de questionário online vs papel. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 3, p. 93-98, 2013.

THENMOZHI, M.; KANNABIRAN, K. Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7. **Oxidant Antioxidant Medicine Science**, v.1, n.1, p. 51-57, 2012.

THOMAS, A. T. et al. *In vitro* anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 279-287, 2011.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia** - 10^a Ed. - Editora: ARTMED, p. 894, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 780, 2008.

UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 149-158, 2003.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

VENTURA, M. et al. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VICENTE J. et al., Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges and their potential for natural product discovery. **Marine Biotechnology**, v. 15, p. 413-424, 2013.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WAKSMAN, S. A.; HENRICI A. T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p. 337–341, 1943.

WANG X. et al. A new quinoline derivative with cytotoxic activity from *Streptomyces* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2313–2315, 2011.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G. **Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL**. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 4, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 2452-2492, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **GLOBOCAN 2008**: cancer incidence and mortality worldwide. Lyon: IARC, 2010. (IARC Cancer Base, 10). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

WU, Z. et al. New Cytotoxic Alkylated Anthraquinone Analogues from a Soil Actinomycete *Streptomyces* sp. WS-13394. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 1, p. 118–121, 2014.

ZHAO, X. et al. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 25, p. 859–866, 2009.

ZOTCHEV, S. Marine actinomycetes as an emergin resource for the drug development pipelines. **Journal of Biotechnology**, v. 158, p. 168-175, 2012.

UL-HASSAN, A.; WELLINGTON, E. M. **Actinobacteria. Encyclopedia of Microbiology**, 3 ed. Oxford: Elsevier, 2009.

APÊNCICE – Meios utilizados nas culturas

1. Composição dos meios de cultura sólidos

Reagentes	ISP-2	MH (Müller-Hilton)	SAB (Sabouraud Agar)
Glicose	4 g	-	40 g
Peptona	-	-	10 g
Extrato de Levedura	4 g	-	-
Extrato de Malte	10 g	5 g	-
Extrato de carne	-	-	-
Hidrolizado de caseína ou Peptona de caseína	-	17,5 g	-
Amido	-	1,5 g	20 g
Ágar	15 g	15 g	-
Água destilada	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7,2	7,0	5,6

2. Composição dos meios de cultura líquidos

Reagentes	ISP-2	MH (Müller-Hilton)	SAB (Sabouraud Agar)	MPE
Glicose	4 g	-	40 g	20 g
Peptona	-	-	10 g	-
Extrato de Levedura	4 g	-	-	-
Extrato de Malte	10 g	5 g	-	-
Extrato de carne	-	-	-	-
Farinha de soja	-	-	-	20 g
Hidrolizado de caseína ou Peptona de caseína	-	17,5 g	-	-
Amido	-	1,5 g	20 g	-
CaCO ₃	-	-	-	2 g
NaCl	-	-	-	5 g
Água destilada	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7,2	7,0	5,6	6,7 – 7,0

Todos os meios de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave vertical durante 15 minutos a 121°C.

ANEXO - Ofício de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (51) 2126 8840 / 2126 9351
Fax: (55 81) 2126 9350
www.ccb.ufpe.br

Ofício nº 08/14

Recife, 05 de maio de 2014.

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.ª Jaciara dos Santos Aguiar
Departamento de Antibióticos – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.005794/2014-23

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "Avaliação da atividade antimicrobiana e anticâncer de metabólitos bioativos produzidos por *Streptomyces* sp".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos
– CCB/UFPE; Animais: camundongos; Linhagem: Albinos
suíços; Sexo: machos; Número de animais previsto no
protocolo: 3; Peso: 30g; Idade: 60 dias.

Atenciosamente,

Marcia Vasconcelos

Profª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 219535