UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA

ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE DIVERSOS HABITATS

Goiânia
2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a): Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira		
E-mail: bfro.francesco@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [X]Sim [ ] Não		
Vínculo empregatício do autor: -		
Agência de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás		Sigla: FAPEG
País: Brasil	UF: GO	CNPJ: 08.156.102/0001-02
Título: Análise das atividades antimicrobiana e citotóxica de actinobactérias isoladas de diversos habitats		
Palavras-chave: actinobactéria; bioprospecção microbiana; metabólitos bioativos; antibióticos		
Título em outra língua: Analyses of antimicrobial and cytotoxic activities of actinobacteria isolated from diverse habitats		
Palavras-chave em outra língua: actinobacteria; microbial bioprospecting; bioactive metabolites; antibiotics		
Área de concentração: Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Data defesa: 18/03/2015		
Programa de Pós-Graduação: Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Orientador (a): Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira		
E-mail: jdgvieira62@gmail.com		
Co-orientador(a):*-		
E-mail: -		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA Data: 18 / 05 / 2015

Assinatura do (a) autor (a)

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA

ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE DIVERSOS HABITATS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira.

Goiânia
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Rodrigues de Oliveira, Bruno Francesco
Análise das atividades antimicrobiana e citotóxica de actinobactérias isoladas de diversos habitats [manuscrito] / Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira. - 2015.
xviii, 151 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2015.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. actinobactérias. 2. bioprospecção microbiana. 3. metabólitos bioativos. 4. antibióticos. I. Gonçalves Vieira, José Daniel, orient. II. Título.

Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira

Orientador (a): Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Membros:

1. Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

2. Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

3. Prof^{a}. Dr^{a}. Keili Maria Cardoso de Souza

Data: 18/03/2015

"All we have yet discovered is but a trifle in comparison with what lies hid in the great treasury of nature".

Antonie van Leeuwenhoek

A minha amada mãe, **Marli**

Ao meu eterno orientador, **José Daniel**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Marli Rodrigues Corrêa**, *aquela que é responsável por tudo de bom que existe em mim. Mãe, se eu cheguei até aqui foi graças ao seu estímulo, força e perseverança. A senhora é uma guerreira, o meu exemplo absoluto e a maior dádiva que pude receber de Deus foi a de ser seu filho nessa vida. Obrigado por ter sempre me apoiado e entendido as vezes que eu voltava tarde do trabalho para casa e às idas aos finais de semana ao laboratório. O orgulho que a senhora sente desse biomédico aqui é umas das minhas principais motivações para prosseguir em frente. Essa dissertação de mestrado é consequência direta do seu êxito na minha criação e do amor infinito que a senhora tem pelos seus filhos.*

Ao meu irmão, **Luigi Enrico Rodrigues de Oliveira** *("guri nojento"; "Seco"), que toda vez tornava muito mais atrativa a aliviante sensação de matar zumbis do que ler artigos nas noites de domingo.*

Ao Prof. Dr. **José Daniel Gonçalves Vieira** *("Chefe"; "Capitão Caverna") por ter aberto as portas do LAMAB para mim há cinco anos e de lá eu nunca mais quis sair. Professor, com o senhor eu compreendi que é possível ter um coração do tamanho do universo e ser um cientista nato. Além de amar os micro-organismos, você me ensinou a perder a timidez, possuir um pouco mais de autoestima, ter humildade para aprender e ensinar, além de abrir a mente e ter respeito para tudo o que é novo, desconhecido. Eu afirmo que me dediquei tanto em várias situações para te ajudar e retribuir um pouco tudo o que o senhor já fez e faz por mim. Dá gosto ser seu orientando! Desculpa pelos "puxões de orelha" e as perguntas (um pouquinho estúpidas) que eu fazia enquanto trabalhava no fluxo e o senhor me respondia, lá da sua salinha, sempre com paciência e, claro, bom humor. Nós dois nos conhecemos a tempo suficiente para saber que eu não preciso te bajular e nem o senhor a mim e tudo que está escrito aqui é sincero. Eu somente posso dizer que todas as minhas conquistas daqui para frente vão ser suas também. Nunca poderei ser capaz de recompensar toda a confiança e fé que depositou em mim e por ter contribuído tanto para a minha formação profissional e, especialmente, pessoal.*

A Profª. Drª. **Lara Stefânia Netto de Oliveira Leão Vasconcelos**, *por ter me escutado inúmeras vezes, seja para elucidar algumas dúvidas bacteriológicas ou para conversar um pouco sobre essa, nada fácil, vida acadêmica. A senhora transmite uma paz de espírito como nenhuma outra pessoa e, com muita serenidade e doçura, conforta com uma palavra de estímulo a todos que precisam. Um modelo maravilhoso a ser seguido!*

A Profª. Drª. **Keili Maria Cardoso de Souza** *por toda supervisão na parte experimental de biologia molecular. Keili, perdão pelos instantes que você chegava ao laboratório e eu tinha me esquecido de ligar a máquina de gelo, montar e autoclavar as caixas de ponteiras novas, preparar alguma solução, ou ficar te importunando para responder minhas perguntas ou "saber se o plasmídeo deu certo". Você me mostrou a jamais ter medo de serviço e que todo minuto pode ser aproveitado no laboratório. Muito obrigado pela atenção e todos os ensinamentos. Se um dia eu tiver um terço do seu conhecimento prático em Biologia Molecular, já estarei satisfeito!*

A todos os membros juramentados a Casa LAMAB:

A Me. **Aysha Jussara Ivonilde Carrim** *("Ju"), meu anjo da guarda no laboratório. Sou extremamente grato pelos conselhos, solicitude em providenciar os materiais quando precisávamos e por me animar tanto nos instantes de dificuldade. O meu débito com você é enorme!*

A Me. **Ariana Alves Rodrigues** *("Chefa"), a doutoranda mais nobre e generosa que existe! Chefa, obrigado por todas as (milhares?!) de extrações de DNA, PCRs, eletroforeses, purificações... Nos últimos tempos, o nosso bom dia andava sendo quase "Vai fazer PCR hoje?". Sofremos e ficamos frustrados, mas todo dia era dia de tentar de novo, sempre com a esperança de uma banda bonita aparecer.*

A **Petain José Ferreira Neto** *("Neto"), pai também das nossas filhas actinobactérias "A" e que admiro muito por ser tão batalhador, além de ainda trabalhar com enzima! Definitivamente quando essa defesa acabar a nossa comemoração não vai ser fazer um ISP-2.*

Aos meus primeiros companheiros de LAMAB, os biólogos "de laboratório": **Lia Costa Pinto Wentzel**, *a menina que consegue semear uma bactéria com uma elegância indescritível. Lia, só você para tentar ensinar esse chucro aqui a falar "zwitterion" em alemão (pode ter certeza que estou pronunciando mentalmente errado);* **Marcus Vinícius Forzani de Araújo**, *o indivíduo que faz uma coloração de Gram se tornar algo hilário e atual hospedeiro da "Márcia".*

Aos componentes da alta sociedade "parisiense", com os quais é uma honra dividir um espaço (quando possível) no "020": **Renan de Souza Soares** *("Lorde Renan"), aquele que não perde a fineza nem nas situações mais desafiadoras; e* **Igor Daniel Alves Ribeiro** *("Sr. Ribeiro"), o Iniciação Científica mais eficiente que se tem conhecimento na história.*

A **Thaís Maitan Vieira**, *a primeira pessoa que me advertiu como trabalhar corretamente com o bico de Bunsen. Agradeço por ter me mostrado como manter organizado nosso espaço laboratorial lá no começo da minha trajetória no LAMAB.*

A **Anna Paula Santos Almeida Rotta**, *a desinibida que me faz rir muito com sua sinceridade.*

A **Luann Guilherme Vieira dos Reis**, **Raylane Pereira Gomes** *e* **Camila Trindade Catúlio**. *Foi um prazer acompanhar a jornada de vocês no laboratório como os primeiros alunos desse curso maravilhoso que é a Biotecnologia, e também pelos momentos vividos, incluindo esperar por uma hora e meia o pHmetro decidir qual era o pH do meio (em uma tarde de sábado, claro), ou mover geladeiras e freezers para achar um anel e evitar o fim de um relacionamento.*

A **Juliane Carvalho Moreira**, *pelo auxílio inestimável no início dos trabalhosos ensaios de citotoxicidade e* **Jonathan Milhomens dos Santos Lima**, *por ser tão prestativo quando necessário.*

Aqueles três senhores, **Lêda Maria Valadão** *("aquela senhora"),* **Vera Lúcia da Penha** *("D. Vera"),* **Aristides Barbosa** *("Seu Aristides"), que com muita simpatia e modéstia me ensinaram pequenas lições que para muitos são dispensáveis ou triviais, só que para mim foram importantíssimas.*

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Médica (IPTSP/UFG): **Mayara Regina Pereira**, **Érika Goulart Rodrigues**, **Camila Fonseca Alvarenga**, **Késia Cristina de Oliveira Batista**, **Moisés Morais Inácio**, **Paula Cristina da Mata Lopes**, **Alberto Herrero Falero**, **Vinícius Gontijo Furlan** *e* **Carolina Leão de Morais**.

A **Shirley de Morais Campos** *por zelar tão bem do laboratório.*

A **Lays Costa Marques** *("Oráculo"), que apesar da distância, ainda encontra tempo para ouvir as minhas lamúrias e proferir seus sábios conselhos. Aos meus velhos amigos de guerra, os companheiros de todas as horas:* **Marielton dos Passos Cunha** *("Tom") e* **Izadora Cristina Moreira de Oliveira** *("Iza", "Izadôura"). Quando essa patota estava junta não tinha ninguém que segurava o rumo das conversas filosóficas, as risadas incontroláveis e, claro, "a acetilcolina viajando na sinapse de uma certa pessoa...".*

Aos responsáveis técnicos pelo Laboratório Multiusuários do curso de Biotecnologia/UFG, os mestres **Elaine Jacob da Silva Carmo** *e* **Alex Wilkerson Ferreira Borges**. *Vocês me ajudaram a enfrentar um dos principais obstáculos desse trabalho: o rotaevaporador. Também gostaria de elogiá-los pelo excelente trabalho realizado em algo relativamente pioneiro no IPTSP, que é a concepção de um âmbito laboratorial multiusuário.*

A Profª. Drª. **Walquíria Arruda** *pelo preparo das amostras biológicas para a microscopia eletrônica de varredura e as responsáveis técnicas do LabMic, Drª.* **Tatiane Oliveira dos Santos** *e* **Nayara Melo Freitas**, *pela obtenção das lindas micrografias eletrônicas.*

A **Matheus Maitan Vieira** *pelo isolamento da actinobactéria GUARA 1.*

A **Coleção de Bactérias de Origem Hospitalar da Fundação Oswaldo Cruz (CCBH/FIOCRUZ)** *pela disponibilização das cepas hospitalares de MRSA.*

A **Cláudia Castelo Branco Artiaga Kobayashi** *pela cepa-padrão de Klebsiella pneumoniae.*

Ao Me. **Fernando Yano Abrão** *e* **Carolina Martins Treméa** *pela doação das amostras de fungos filamentosos de origem clínica.*

A **Francielly Pinheiro da Silva Borges** *e* **Nathânia Dábilla Alves Silva** *pela assistência na obtenção do plasmídeo pUC 18 nessa reta final.*

Aos encarregados da Secretaria da Pós-Graduação do IPTSP/UFG, **José Clementino** *e* **Karinny Soares**, *pelos esclarecimentos e serviços prestados.*

Aos membros da banca de qualificação pelas contribuições valiosas: Prof. Dr. **Éverton Kort Kamp Fernandes**, *Profª. Drª.* **Keili Maria Cardoso de Souza** *e Profª. Drª.* **Daniela de Melo e Silva**.

Ao Prof. Dr. **Cirano José Ulhoa** *e a Profª. Drª.* **Keili Maria Cardoso de Souza** *pelo aceite do convite para constituírem a banca de defesa dessa dissertação.*

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro (PPGBRPH)** *pela oportunidade.*

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)** *pela concessão da bolsa de estudos.*

E a **todos** *que, de alguma forma, torceram por mim até o fim,*

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

SUMÁRIO viii
TABELAS E FIGURAS xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS xiv
RESUMO xvii
ABSTRACT xviii
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Actinobactérias 1
1.1.1 Taxonomia: considerações básicas 1
1.1.2 Características biológicas gerais 4
1.1.3 Isolamento e identificação 7
1.2 Metabólitos secundários 11
1.3 Antibióticos antimicrobianos 15
1.3.1 Resistência aos antimicrobianos 19
1.3.1 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) 22
1.4 Antibióticos antitumorais 26
1.5 Pesquisa para a seleção e desenvolvimento de novos antibióticos 29
1.6 Habitats 35
1.6.1 Cerrado 36
1.6.2 Manguezal 38
1.6.3 *Azadirachta indica* A. JUSS (Neem) 40
2 JUSTIFICATIVA 44
3 OBJETIVOS 45
3.1 Objetivo geral 45
3.2 Objetivos específicos 45
4 MÉTODOS 46
4.1 Isolamento e seleção das actinobactérias 46
4.1.1 Coleta e pré-tratamento das amostras ambientais 46
4.1.2 Isolamento de *Actinoplanetes* 47
4.1.3 Preservação dos isolados microbianos 48
4.1.4 Seleção de outros isolados de actinobactérias 48
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de actinobactérias 49
4.3 Preparo dos extratos orgânicos brutos 52

4.3.1 Extrato derivado do crescimento em meio sólido – ECS 52
4.3.2 Extrato derivado do crescimento em meio líquido – ECL 52
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos brutos 53
4.5 Extração do DNA estafilocóccico pelos extratos orgânicos brutos 54
4.6 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos orgânicos brutos 55
4.7 Detecção da ação intercalante dos extratos orgânicos brutos sob a molécula de DNA 56
4.7.1 Obtenção e preparo do DNA alvo 56
4.7.2 Efeito de intercalação dos metabólitos bioativos sob a molécula de DNA – *Gel Shift* ... 57
4.8 Caracterização morfológica dos isolados de actinobactérias 58
4.8.1 Macromorfologia 58
4.8.2 Micromorfologia 58
4.8.2.1 Microscopia óptica 58
4.8.2.2 Microscopia eletrônica de varredura 59
4.8.2.2.1 Preparação das amostras biológicas 59
4.8.2.2.2 Análise em MEV 60
4.9 Caracterização fisiológica/bioquímica dos isolados de actinobactérias 61
4.9.1 Testes nutricionais e de tolerância 61
4.9.2 Testes enzimáticos e de degradação 63
4.10 Caracterização molecular dos isolados de actinobactérias 64
4.10.1 Extração do DNA genômico 64
4.10.2 Amplificação do segmento gênico do 16S rRNA 65
4.10.3 Purificação dos produtos de PCR 66
4.10.4 Sequenciamento da região gênica do 16S rRNA 66
4.10.5 Identificação molecular com base nas sequências do gene do 16S rDNA 66
5 RESULTADOS 68
5.1 Isolamento de *Actinoplanetes* 68
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das actinobactérias 68
5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos brutos 75
5.4 Exame da ação lítica sobre a parede celular bacteriana dos extratos orgânicos brutos 78
5.5 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos orgânicos brutos 80
5.6 Detecção da ação intercalante dos extratos orgânicos brutos sob a molécula de DNA 81
5.7 Caracterização morfológica dos isolados de actinobactérias 82
5.7.1 Macromorfologia 82
5.7.2 Micromorfologia 85

5.8 Caracterização fisiológica/bioquímica dos isolados de actinobactérias 88
5.9 Caracterização molecular dos isolados de actinobactérias 94
6 DISCUSSÃO 95
7 CONCLUSÕES 112
REFERÊNCIAS 114
ANEXOS 142
Anexo IA Meios de cultura 142
Anexo IB Soluções reagentes e tampões 148
Anexo II Ficha de solicitação das amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar da Fundação Oswaldo Cruz (CCBH/FIOCRUZ) 151

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 Local de origem da amostra de solo selecionada para isolamento microbiano 46

Tabela 2 Relação das morfoespécies de actinobactérias selecionadas para o estudo: identificação (significado da sigla), origem, responsável pela avaliação parcial da ação antibiótica 49

Tabela 3 Relação das linhagens microbianas indicadoras empregadas na triagem primária da atividade antimicrobiana dos isolados de actinobactérias 50

Tabela 4 Classificação do grau de atividade antimicrobiana em função do diâmetro dos halos de inibição obtidos nos ensaios de triagem da atividade biológica 51

Tabela 5 Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre as cepas-padrão de bactérias gram-positivas. Técnica dos *Plugs* 70

Tabela 6 Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre os isolados de MRSA (CCBH/FIOCRUZ). Técnica dos *Plugs* 71

Tabela 7 Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre as cepas-padrão de bactérias gram-negativas. Técnica dos *Plugs* 72

Tabela 8 Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre os isolados de fungos. Técnica dos *Plugs* 73

Tabela 9 Comparação do diâmetro dos halos de inibição do crescimento da cepa-padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e isolados de MRSA (CCBH/FIOCRUZ) promovidos pelos extratos brutos do crescimento dos isolados de actinobactérias em meio sólido (ECS) e líquido (ECL) nos ensaios de triagem secundária da atividade antimicrobiana. Técnica de Difusão em Poço 76

Tabela 10 Resultado do ensaio de extração do material genômico estafilocóccico após tratamento com os extratos orgânicos brutos 78

Tabela 11 Valores de Dosagem Média Letal (DL_{50}) dos extratos brutos avaliados 80

Tabela 12 Padrão de cores do micélio aéreo e reverso da placa e produção de pigmentos solúveis dos isolados de actinobactérias crescidos nos meios de cultivo específicos da descrição macromorfológica 83

Tabela 13 Produção de pigmento difusível relativo a melanina pelos isolados de actinobactérias crescidos nos meios de cultivo específicos na descrição macromorfológica 84

Tabela 14 Características micromorfológicas dos isolados de actinobactérias determinadas por microscopia óptica de luz 85

Tabela 15 Diferentes características fenotípicas (fisiológicas e bioquímicas) dos isolados de actinobactérias 89
Tabela 16 Identificação do isolado ADU 1.3 com base na comparação da sequência de 16S rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados do *GenBank* (análise BLASTn) 94
Figura 1 Esboço geral do estado atual da taxonomia do filo *Actinobacteria* proposta conforme o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 3
Figura 2 Ciclo de vida de *Streptomyces* sp. 6
Figura 3 Funções dos metabólitos microbianos bioativos 13
Figura 4 Exemplos de antibióticos antimicrobianos produzidos por actinobactérias na linha do tempo da Era dos Antibióticos 18
Figura 5 Exemplos de drogas antitumorais derivadas de actinobactérias com aplicação clínica na quimioterapia: estruturas químicas e organismos produtores 27
Figura 6 Representação esquemática das fases gerais do processo clássico de desenvolvimento de novos antibióticos de origem microbiana. 31
Figura 7 Número de antimicrobianos aprovados para uso clínico nos últimos 30 anos . 32
Figura 8 Distribuição geográfica do Cerrado brasileiro 36
Figura 9 Distribuição geográfica do manguezal brasileiro 38
Figura 10 *Azadirachta indica* A. JUSS: **(a)** folhas, galhos e sementes; **(b)** árvore 41
Figura 11 Câmara de isolamento de actinobactérias do gênero *Actinoplanes* segundo o método de Palleroni (1976a) 47
Figura 12 Representação esquemática da Microplaca™ GEN III (Biolog) 62
Figura 13 Halos de inibição do crescimento da cepa-padrão de *K. rhizophila* ATCC 9341 gerados pelos *plugs* de actinobactérias cultivados em ágar ISP-2 74
Figura 14 Halos de inibição do crescimento do isolado de MRSA CCBH 6089 produzidos pelos *plugs* de actinobactérias cultivados em ágar ISP-2 74
Figura 15 Halos de inibição do crescimento do isolado MRSA CCBH 6089 provocados pelos extratos brutos derivados do crescimento em meio sólido (ECS) das actinobactérias analisados pela técnica de difusão em poço 77
Figura 16 Halos de inibição do crescimento do isolado MRSA CCBH 8508 provocados pelos extratos brutos derivados do crescimento em meio sólido (ECL) das actinobactérias analisados pela técnica de difusão em poço 77

Figura 17 Detecção do material genômico de *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA CCBH 6089 após tratamento com os extratos orgânicos brutos em gel de agarose a 1,0% submetido a eletroforese 79

Figura 18 Perfil de migração do DNA alvo incubado com extratos brutos orgânicos com atividade antimicrobiana frente aos isolados clínicos de MRSA em eletroforese em gel de agarose a 0,7% 81

Figura 19 Características culturais – micélio aéreo (esquerda) e reverso da placa (direita) – de alguns dos isolados de actinobactérias após cultivo em ágar ISP-2 por 14 dias a 30ºC: **(a)** BC-A22; **(b)** GUARA 1 82

Figura 20 Micrografias das estruturas morfológicas dos potenciais isolados de actinobactérias cultivados em ágar ISP-2 conforme a técnica da lamínula enterrada por microscopia óptica de luz (à esquerda, aumento de 4.000x) e microscopia eletrônica de varredura (à direita, aumento informado abaixo da imagem): **(a)** BC-A22; **(b)** GUARA 1; **(c)** NIM 1; **(d)** PEG 23; **(e)** PEG 30; **(f)** ADU 1.3; **(g)** ADU 2.2 86

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Ágar Amido-Caseína
Ágar ISP	Ágar *International Streptomyces Project*
ATCC	*American Type Culture Collection*
BC	Biblioteca Central
BHI	*Brain Heart Infusion*
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BLASTn	*Nucleotide* BLAST
CA-MRSA	*Community-associated* MRSA
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
coA	Coenzima-A
CTAB	*Cetyltrimethylammonium bromide*
ºC	Graus Celsius
DAP	Ácido Diaminopimélico
dL	Decilitro
DL_{50}	Dose Letal Média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
DHISTO	Departamento de Histologia
DSMZ	*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*
DST	Doença Sexualmente Transmissível
ECS	Extrato derivado do Crescimento em Meio Sólido
ECL	Extrato derivado do Crescimento em Meio Líquido
EDTA	*Ethylene Diamine Tetracetic Acid*
EMSA	*Electrophoretic Mobility Shift Assay*
ES	Espírito Santo
ESBL	*Extended-Spectrum Beta-Lactamase*
EtOH	Etanol
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Aceleração da gravidade
G + C	Guanina + Citosina

GO	Goiás
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HA-MRSA	*Health-care associated* MRSA
HCl	Ácido Clorídrico
HDMS	*Hexamethyldisilazane*
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
HTS	*High-Throughput Screening*
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICH	*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*
IF	Instituto de Física
IMC	*Institute of Microbial Chemistry*
INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
ISP	*International Streptomyces Project*
Kb	Quilobase (10^3 bases)
KCl	Cloreto de Potássio
LabMic	Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução
LAMAB	Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia
LB	*Luria-Bertani*
LEM	Laboratório de Estudos Morfológicos
M	Molar
Mbp	Mega pares de bases (10^6 bases)
MBA	*Modified Bennet's Agar*
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
MIC	*Minimum Inhibitory Concentration*
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRSA	*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
NaCl	Cloreto de Sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NCI	*National Cancer Institute*
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
∅	Diâmetro
pb	Pares de Base
ppm	Partes Por Milhão
PBP	*Protein Binding Protein*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PHSCC	*Public Health Service Commissioned Corps*
PVL	*Panton-Valentine Leukocidin*
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico ribossomal
rpm	Rotações por Minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossomal
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*
SCC*mec*	*Staphylococcal Cassette Chromossome* mec
SDA	Ágar Sabourad-Dextrose
SDS	Sulfato Duodecil de Sódio
TAE	Tris/Acetato/EDTA
TBE	Tris/Borato/EDTA
TE	Tris-EDTA
TSB	*Tryptic Soy Broth*
UCB	Universidade Católica de Brasília
UV	Ultravioleta
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UFG	Universidade Federal de Goiás
V	Volts
VRE	*Vancomycin-resistant Enterococcus*
VISA	*Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*
VRSA	*Vancomycin-resistant Staphylocoocus aureus*
WHO	*World Health Organization*

RESUMO

As actinobactérias compõem um amplo e diverso filo de bactérias gram-positivas com elevado conteúdo de guanina e citosina em seu DNA, destacando-se pela produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica. O tratamento das infecções por patógenos multirresistentes aos antimicrobianos e do câncer representa um dos maiores desafios da medicina moderna e moléculas microbianas bioativas ainda constituem uma fonte rica de drogas antimicrobianas e antitumorais. O objetivo principal do presente estudo foi analisar as potenciais ações antimicrobiana e citotóxica de actinobactérias isoladas de vários habitats. A avaliação dessas bioatividades foi efetuada mediante aplicação de uma série de ensaios qualitativos de triagem *in vitro*. Do total de 19 morfoespécies, isoladas do solo de Cerrado goiano, 16 foram avaliadas nos testes primários de atividade antimicrobiana, das quais 5 (31,25%) antagonizaram o crescimento dos micro-organismos indicadores. O ECL da morfoespécie BC-A22 e os extratos brutos do isolado ADU 1.3 se sobressaíram quanto a sua alta ação antibiótica frente à MRSA. A maioria dos extratos brutos exibiu ação lítica sobre a parede celular estafilocóccica. Apenas os ECLs das morfoespécies GUARA 1 e PEG 23 e os extratos do isolado PEG 30 foram citotóxicos a *A. salina* em baixa concentração. Nenhum dos extratos mostrou efeito de intercalação sob a molécula de DNA. Com exceção de BC-A22, os seis isolados foram caracterizados morfologicamente como membros do gênero *Streptomyces*. A morfoespécie ADU 1.3 foi identificada molecularmente como *Streptomyces* sp., com alta probabilidade de consistir em uma espécie nova. Os resultados obtidos dessa etapa de bioprospecção inicial evidenciam que todos os sete isolados são potenciais produtores de biomoléculas antibióticas, notabilizando-se a morfoespécie BC-A22, que exibiu uma alta ação antimicrobiana frente aos MRSA hospitalares e a maior parte das bactérias gram-negativas.

Palavras-chave: actinobactérias; bioprospecção microbiana; metabólitos bioativos; antibióticos.

ABSTRACT

The actinobacteria constitute a wide and diverse phylum of gram-positive bacteria with a high content of guanine and cytosine in their DNA, standing out by the production of secondary metabolites with antibiotic activity. The treatment of multi-drug resistant pathogens infections and cancer represents a major challenge for modern medicine and bioactive microbial metabolites constitute a rich source of antimicrobial and antitumor drugs. The main aim of this study was to analyse the potential antimicrobial and cytotoxic activities of actinobactéria isolated from various habitats. The evaluation of these bioactivities was accomplished by the application of a set of qualitative screening *in vitro* assays. From a total of 19 morphospecies, isolated from the goiano Cerrado soil, 16 were evaluated in the primary antimicrobial activity tests, of which 5 (31,25%) antagonized the growth of indicator microorganisms. The ECL of the morphospecie BC-A22 and the crude extracts of the strain ADU 1.3 stood out for their strong antibiotic action against MRSA. The most of the crude extracts exhibited lytic action on the staphylococcal cell wall. Only ECLs of morphospecies GUARA 1 and PEG 23 and extracts of the strain PEG 30 were cytotoxic against *A. salina* in low concentration. None of the extracts showed an intercalation effect on the DNA molecule. With exception of BC-A22, the other six isolates were morphologically characterized as members of the *Streptomyces* genus. The morphospecie ADU 1.3 was molecularly identified as *Streptomyces* sp., highly likely to consist of a new species. The results of this initial phase of microbial bioprospecting highlight that all the isolates are potential producers of antibiotics biomolecules, excelling the morphospecie BC-A22, which exhibited a strong antimicrobial activity against the clinical isolates of MRSA and most of gram-negative bacteria.

Keywords: actinobacteria, microbial bioprospecting, bioactive metabolites, antibiotics.

1 INTRODUÇÃO

1 Actinobactérias

1.1.1 Taxonomia: considerações básicas

As actinobactérias constituem um enorme grupo filogeneticamente relacionado de bactérias gram-positivas com um elevado conteúdo de guanina – citosina (G+C) em seu DNA genômico. Esses micro-organismos, anteriormente denominados actinomicetos (do grego, "*aktis*", irradiado; "*mykes*", fungo), desde a sua primeira descrição no final do século XIX e por um longo período foram considerados exóticos por apresentarem características típicas de fungos filamentosos e de bactérias (Goodfellow & Cross 1984; Pandey et al. 2004). Contudo, estudos realizados a partir da década de 1950 possibilitaram um melhor conhecimento da estrutura genética e da composição química celular desses organismos. Estes estudos confirmaram sua natureza procariótica retirando-os completamente do Reino *Fungi* (Goodfellow et al. 1984; Wosten & Willey 2000).

A formação de estruturas filamentosas (hifas) e de esporos acarretou na classificação inicial como fungos. Apesar de partilharem uma parte do seu ciclo de vida com esses eucariotos, a verificação de sua suscetibilidade a agentes antibacterianos e a ausência de membrana nuclear, evidenciaram que os "actinomicetos" estavam mais próximos dos procariotos, o que incitou investigações mais apuradas. Foram encontradas várias características que esses micro-organismos compartilhavam com as bactérias, tais como: a presença de peptideoglicano na parede celular, que explica a vulnerabilidade aos antibióticos efetivos frente a gram-positivos; a síntese de lisina via ácido diaminopimélico (DAP); a inexistência de esteróis; quando presente, flagelo tipicamente bacteriano; o diâmetro aproximado de 1,0 µm da hifa; e a sensibilidade a fagos (Lechevalier & Lechevalier 1967; Embley & Strackebrandt 1994; Wosten & Willey 2000).

A confusão inicial de identidade refletiu intensamente na posição taxonômica das actinobactérias. Desde os pioneiros relatos como patógenos de animais até o começo da ampla exploração como produtores de substâncias antibióticas, uma vasta quantidade de denominações genéricas e de descrições com sobreposições foi gerada, tornando nebulosa e insatisfatória a sua classificação. A extraordinária variedade morfológica desses procariotos e a falta de um consenso quanto aos critérios taxonômicos que deveriam ser aplicados justificam em parte essa desordem inicial na sistemática desses micro-organismos, que eram

essencialmente agrupados considerando-se os aspectos morfológicos e certas propriedades fisiológicas (Waksman, 1961; O'Donnel, 1988; Stackebrandt & Schumann 2006).

O advento da aplicação do conhecimento dos componentes químicos celulares e o emprego dessas características em classificação e identificação de organismos, a quimiotaxonomia, contribuiu significativamente para a sistemática das actinobactérias. A associação dessa abordagem com a taxonomia numérica, isto é, a ordenação dos micro-organismos descritos em grupos homogêneos utilizando um enorme conjunto de dados fenotípicos, evidenciou a heterogeneidade fenotípica dos gêneros já conhecidos, na delimitação de taxo-espécies, e em esquemas classificatórios baseados em vários caracteres os quais constituiriam ferramentas poderosas para o processo de identificação de novos isolados (Labeda 1987; Stackebrandt & Schumann 2006; Schleifer 2009).

No entanto, alicerçar-se apenas na fenotipagem suscitaria na existência de enormes grupos supra-genéricos bastante heterogêneos (Goodfellow 1989). Além disso, ainda não era simples e seguro aprofundar a classificação a níveis menores, como espécie e subespécie, bem como esclarecer a filogenia desses procariotos. Nesse ponto, a sistemática molecular, a utilização de métodos de análises de ácidos nucleicos na ciência da classificação biológica, possibilitou a reconstrução das relações evolutivas entre os organismos nos mais diferentes graus na hierarquia taxonômica e em validar e/ou complementar o que já havia sido estruturado pelas outras estratégias (Bull 1992; Embley & Strackebrandt 1994).

Nas últimas décadas, o uso integrado dos caracteres genotípicos e fenotípicos derivados por essas abordagens, a taxonomia polifásica, é adotada difusamente na classificação de organismos procarióticos, fornecendo, por meio da escolha de critérios que auxiliem na ampliação da qualidade dos dados gerados, o estabelecimento de nomenclatura estável e identificação mais segura. Essa prática produziu melhorias consideráveis no caso de táxons complexos nos quais as tradicionais estratégias, baseadas em forma e função, provaram ser instáveis (Goodfellow & Fiedler 2010; Kim 2010). Isso é claramente evidente para as actinobactérias, em que as avaliações quimiotaxonômicas, estudos de filogenia gerados pela determinação das sequências da menor subunidade (16S) do rRNA (ácido ribonucleico) e em hibridizações de ácidos nucleicos revolucionaram a forma como novos isolados são classificados a nível de gênero e espécie (Stackebrandt et al. 1997; Stackebrandt & Schumann 2006).

Com base nas árvores filogenéticas geradas a partir das análises dos segmentos gênicos do 16S rRNA, esses procariotos pertencem ao filo *Actinobacteria*, uma das principais e mais antigas linhagens dentro do Domínio *Bacteria* (Embley &Strackebrandt 1994). O

desmembramento desse táxon de outros grupos bacterianos é também apoiado pelo estudo com outros marcadores moleculares, como inserções e deleções conservadas em proteínas e sequências do 23S rRNA, além de particulares rearranjos gênicos (Goodfellow & Fiedler 2010). De acordo com a mais recente atualização, o filo engloba seis classes, *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptorales*, *Rubrobacteria* e *Thermoleophilia*, mais de 55 famílias, 240 gêneros e milhares de espécies (Ludwig et al. 2012; Verma et al. 2013). A classe *Actinobacteria* é a mais extensivamente estudada, contando com mais de 80% de todas as famílias e gêneros de actinobactérias descritos até então (Figura 1) (Gao & Gupta 2012).

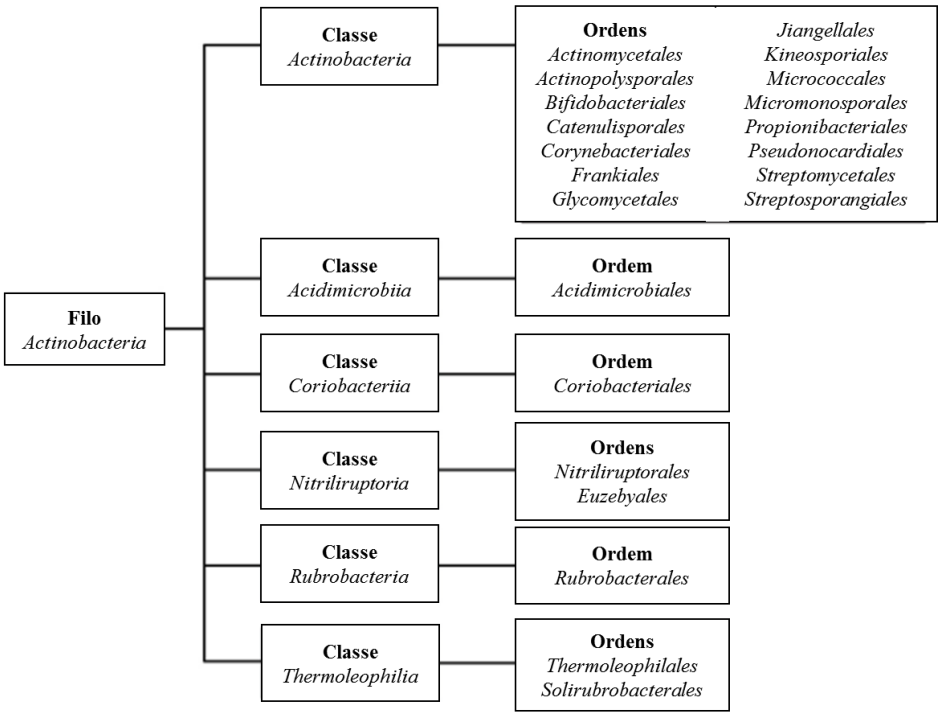


Figura 1 – Esboço geral do estado atual da taxonomia do filo *Actinobacteria* proposta conforme o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Adaptado de Gao & Gupta 2012).

A caracterização taxonômica das actinobactérias, especialmente as produtoras de metabólitos bioativos, é um aspecto muito importante para a seleção de compostos com ação farmacológica de interesse, pois guarnece informações sobre o micro-organismo produtor em estudo, sobre a natureza do metabólito gerado, e associar se o mesmo já foi isolado ou não. Dessa forma, nota-se como a sistemática tem um papel fundamental em biotecnologia, particularmente no aperfeiçoamento dos programas de triagens biológicas, desde o aproveitamento da enorme biodiversidade microbiana na fase de isolamento até a manipulação da ampla variedade química das biomoléculas microbianas (Piret & Demain 1988; Adegboye & Babalola 2012; Kurtboke 2012).

1.1.2 Características biológicas gerais

De modo abrangente, as actinobactérias apresentam organização celular procariótica típica, constituindo-se de uma região nuclear fibrilar e um citoplasma granuloso com ribossomos de até 12 nm de diâmetro, podendo ainda comportar uma multiplicidade de inclusões, dependendo do organismo, do tempo de crescimento e do meio de cultivo utilizado. A parede celular normalmente possui de 10 a 20 nm de espessura e é geralmente composta por uma rígida matriz de peptideoglicano com um ou mais polímeros associados, como ácidos teicoicos aniônicos e polissacarídeos neutros. Em alguns gêneros, como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium*, um envelope externo de ácidos micólicos estão ligados covalentemente à parede, com várias estruturas lipídicas livres relacionadas. Por sua vez, a membrana plasmática (7 a 10 nm de espessura) possui a estrutura clássica do modelo de mosaico fluido, ou seja, uma bicamada lipídica constituída de diferentes lipídios anfipáticos e proteínas específicas intercaladas. Destaca-se a presença de lipídios funcionais adjuntos ao interior hidrofóbico da membrana, como as menaquinonas, envolvidas no transporte de elétrons e respiração celular, e certos pigmentos solúveis, alguns com propriedades antibióticas (Locci & Sharples 1984; Minnikin & O'Donnel 1984).

O DNA (ácido desoxirribonucleico) está condensado, frequentemente em múltiplas cópias nas células das hifas e usualmente em uma única nos esporos. Possui alto teor de G+C, em média acima de 50%, que pode variar desde 42% (*Gardnerella vaginalis*) até 74.4% (*Kineococcus radiotolerans*). Comumente contêm uma riqueza de elementos genéticos extracromossomais (plasmídeos) com uma ampla variedade de tamanho (10 a 40 Kb) e quantidade de cópias (1 a 30). A maioria dessas unidades gênicas possui também conteúdo elevado de G+C, podendo-se ser circulares ou lineares, autônomos ou integrados. Dentre suas conhecidas funções podem-se citar os papéis essenciais na fertilidade, transferência de genes, rearranjos genômicos, produção de antibióticos e resistência a compostos químicos (Hutter & Erckhardt 1988; Piret & Demain 1988; Bentley & Parkhill 2004; Schrempf 2006; Verma et al. 2013).

Estima-se que mais de 53 genomas de actinobactérias já tenham sido sequenciados e anotados, sendo uma parte expressiva da ordem *Actinomycetales*. Os genomas podem ser tanto circulares (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*) como lineares (*Streptomyces coelicolor*) e variarem quanto ao seu tamanho total, com dimensões diminutas como 0,9 Mbp (*Tropheryma whipplei*) até aquelas maiores que 11,9 Mbp (*S. bingchenggensis*), e a soma de

genes que codificam proteínas, desde 1605 (*Mycobacterium leprae*) a 8903 (*S. scabies*). Como já foi observado um agrupamento comum dos genes relativos à geração de enzimas anabólicas, proteínas de resistência e sistemas regulatórios ativos na formação de produtos naturais microbianos, o sequenciamento e análise funcional dos genomas dessas bactérias têm emergido como uma ferramenta poderosa não somente para estudos de sistemática e evolução, contudo também para identificar grupos de segmentos gênicos biossintéticos associados com a expressão de metabólitos já conhecidos ou não (Nett et al. 2009; Alam et al. 2011; Kurtboke 2012; Verma et al. 2013).

Em relação ao requerimento de oxigênio, as actinobactérias são principalmente aeróbias, com representantes anaeróbios facultativos (*Cellulomonas*), microaerófilos e até anaeróbios obrigatórios (*Actinomyces meyeri*). No entanto, a grande parte já descrita desses organismos é quimioheterotrófica e neutrófila. Devido à produção de uma variedade de enzimas extracelulares, possuem uma grande versatilidade metabólica. Este fato permite o consumo de múltiplas fontes de carbono e de nitrogênio e sobrevivência sob um vasto número de substratos (Cochrane 1961; Holt et al. 1994; Servin et al. 2008). Essas proteínas favorecem ainda o crescimento primário, facilitação de interações estreitas com outros organismos e geração de metabólitos secundários (Chater et al. 2010).

O ciclo de vida da maior porção desses micro-organismos consiste em duas etapas de crescimento. A primeira, a fase vegetativa, inicia-se quando um propágulo (como um esporo) se estabelece em um substrato sólido, originando as primeiras hifas (tubos germinativos) que ligeiramente se ramificam em intervalos e se alastram. O micélio nascente, compostos por filamentos que penetram o substrato via enzimas extracelulares ou se propagam ao longo de sua superfície, é o “primário” ou “vegetativo”, uma característica que distingue as actinobactérias de outras eubactérias. Decorrido certo período de crescimento, inicia-se a fase reprodutiva, na qual uma rede de hifas aéreas revestidas por camadas hidrofóbicas surgem da massa micelial primária, podendo cobrir toda a superfície da colônia, conferindo a singular aparência “hirsuta” ou “pulverulenta” em certos gêneros. Esse micélio “secundário” ou “aéreo” é afetado por certos fatores, como a composição do meio de cultura, temperatura, a presença de compostos específicos, e outros elementos estimulantes. Por fim, há o aparecimento das estruturas reprodutivas, podendo constituir em esporos ou a elementos cocóides e formas semelhantes, as quais garantem a continuidade do ciclo biológico (Figura 2) (Locci & Sharples 1984; Srinivasan et al. 1991; Hopwood 1999; Flardh & Buttner 2009). Esse complexo processo de diferenciação celular, formado por uma série coordenada de alterações morfológicas, é regido por, ainda não totalmente elucidados, mecanismos

intrínsecos de regulação gênica que englobam toda a biologia do desenvolvimento do organismo, geração de complexos enzimáticos, antibióticos, bem como a morte celular (Chater 2006; Manteca & Sanchez 2010).

Os esporos de actinobactérias podem ser gerados por intermédio de subdivisão das hifas, tumefação ou endogenia (Reponen et al. 1998). Podem ser produzidos isoladamente ou em cadeias e, em algumas circunstâncias, dentro de "vesículas", como resultado da fragmentação de hifas pré-existentes. Uma bainha fibrosa recobre a superfície dos esporos, atribuindo aos mesmos o aspecto liso, espinhoso, ondulado ou filamentoso, um caractere estável e útil do ponto de vista taxonômico, assim como a sua forma, coloração, número e disposição. Todavia, em certos gêneros formadores de esporângios há a origem de esporos de superfície hidrofílica para auxílio na dispersão pela água. Comumente são resistentes à dessecação e não ao calor, com exceção dos gerados pela família *Thermoactinomycetaceae* (Locci & Sharples 1984; Piret & Demain 1988; Nomi 1992; Vobis 2006). A diversidade morfológica das actinobactérias está baseada primariamente nas suas estratégias de reprodução que levam a formação de uma variedade de estruturas de esporos, como os artrósporos (em *Streptomyces*), aleuriósporos (*Micromonospora*), endósporos (*Thermoactinomyces*) e zoósporos móveis (vários membros de *Actinoplanaceae*, *Geodermatophilus*, *Oerskovia*, *Kitasatoa*) (Ensign 1978).

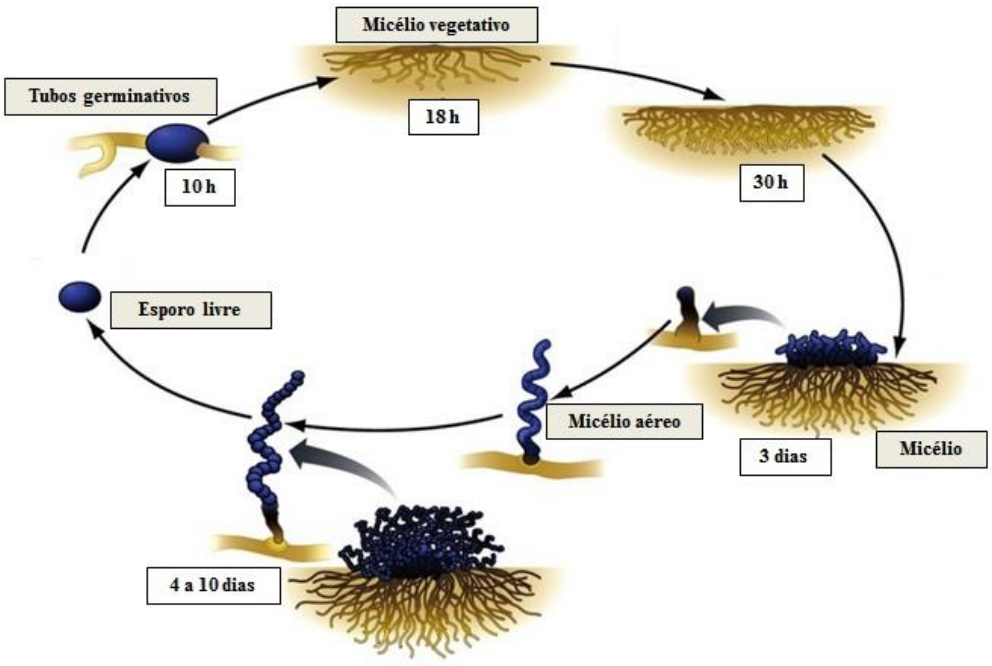


Figura 2 – Ciclo de vida de *Streptomyces* sp. (Adaptado de Slonczewski & Foster 2009).

A morfologia dos micro-organismos desse imenso filo é colossalmente variável. Podem-se notar formas como a cocóide (*Micrococcus*), cocobacilar (*Arthrobacter*), aquelas em que ocorre fragmentação da hifa (*Nocardia* spp.), e outras que podem ser altamente diferenciadas em um micélio ramificado (*Streptomyces*), contudo que podem não formar uma porção aérea (*Actinoplanes*) (Ventura et al. 2007).

As actinobactérias constituem um grupo bem-sucedido de organismos quanto ao habitat, ocorrendo em uma multiplicidade de ambientes, tanto naturais quanto nos modificados pela ação humana. Estão extensivamente distribuídas no solo e em outros ambientes terrestres. A maioria das espécies é saprofítica, contudo existem aquelas que formam associações mutualísticas e parasíticas com outros organismos (Goodfellow & Williams 1983; González et al. 2005). Assim, diferentes estilos de vida podem ser encontrados, incluindo habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), simbiontes fixadores de nitrogênio (*Frankia*), residentes do trato gastrintestinal (*Bifidobacterium* spp.) e patógenos (por exemplo, *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp.) (Ventura et al. 2007).

Exibem um importante papel na reciclagem e mineralização de compostos do solo onde desempenham uma função elementar na reciclagem de nutrientes. São comumente vistos como os micro-organismos mais ativos nos estágios tardios da decomposição de plantas e outros materiais, participando decisivamente da degradação de polímeros complexos e relativamente recalcitrantes, como lignoceluloses, hemiceluloses, pectina, queratina e quitina. Essa capacidade deve-se a produção de um repertório de complexos enzimáticos liberado em consequência a variados estímulos ambientais. Também têm sido associadas com a síntese e degradação de compostos húmicos, além de responderem a presença de poluentes e outras substâncias não naturais, como inseticidas, pesticidas e herbicidas. Adicionalmente, são fundamentais na rizosfera, não apenas por estarem inclusos na população microbiana simbiótica que ativamente cresce em associação próxima com as plantas, mas também por causa de uma supressão do crescimento de patógenos de raízes, através da antibiose (Goodfellow & Williams 1983; Williams et al. 1984; McCarthy & Williams 1992).

1.1.3 Isolamento e identificação

Desde os trabalhos pioneiros de Waksman na primeira metade do século XX até atualmente, milhares de actinobactérias já foram isoladas e identificadas. Diferentes meios de

cultivo foram desenvolvidos, apesar de muitos não serem necessariamente seletivos e de sua escolha essencialmente depender do foco das pesquisas, as quais a princípio objetivavam exclusivamente a seleção de estreptomicetos produtores de substâncias antibióticas (Nolan & Cross 1988; Watve et al. 2001).

Fundamentalmente, os principais passos do isolamento consistem em: (i) a escolha da fonte ambiental de propágulos dos micro-organismos; (ii) o pré-tratamento do material; (iii) o crescimento em meio apropriado; (iv) incubação e seleção de colônias isoladas; (v) purificação. A composição do meio de isolamento, o tipo de pré-tratamento e as condições de incubação estão entre os fatores que mais influenciam o processo, uma vez que eles determinam qual organismo irá se desenvolver (Williams et al. 1983; Okudoh & Wallis 2007).

O solo é um complexo e dinâmico sistema biológico e concentra uma significativa parte da diversidade procariótica existente em nosso planeta (Nannipieri et al. 2003, Keller & Zengler 2004). As bactérias constituem o mais numeroso grupo microbiano nesse sistema e estima-se que apenas 1% da população bacteriana presente em ambientes terrestres pode ser cultivada por métodos microbiológicos convencionais. Organismos do filo *Actinobacteria* compreendem mais de 30% do total de micro-organismos presentes no solo, sendo *Streptomyces* o gênero dominante (Kennedy 1999; Kirk et al. 2004; Thakur et al. 2007). Aproximadamente 80% das actinobactérias ocorrem na camada mais superficial, diminuindo progressivamente com a profundidade (Iwari & Takahashi 1992). O número e variedade desses procariotos podem ser influenciadas expressivamente pela localização geográfica, temperatura, pH, umidade, aeração, tipo de solo, vegetação, conteúdo de matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes, e atividades agrícolas (Arifuzzaman et al. 2010). Ocorrem preferencialmente em solos neutros ou ligeiramente alcalinos, ricos em matéria orgânica, em comparação com ambientes alagados, anaeróbicos e, especialmente, ácidos, nos quais a contagem de viáveis decresce notoriamente, com óbvia exceção das esporoactinobactérias acidófilas que toleram uma faixa de pH 3,5 a 5,5 (El-Tarabily & Sivasithampam 2006).

A faixa de temperatura aplicada durante a execução do isolamento de actinobactérias do solo é de 25-30ºC. A maior variável nesse estágio é a duração do período de incubação, o qual está em torno de 7 a 14 dias para observação do micélio aéreo maturo, considerando a necessidade de monitoramento regular do desenvolvimento das colônias para evitar que algumas possam ser negligenciadas (Nolan & Cross 1988). Assim, constata-se o quão complexo pode ser isolar esses organismos a partir de microbiotas presentes na natureza, uma vez que os mesmos possuem uma velocidade de crescimento mais lento em relação às

outras bactérias e fungos. Isso ocasionou no desenvolvimento de métodos de isolamento seletivo fundamentados sob uma ou ambas das seguintes abordagens: (i) seleção nutricional, na qual os meios são formulados com nutrientes que são preferencialmente empregados por certos gêneros; (ii) inibição seletiva, no qual compostos como antimicrobianos são incorporados ao meio para evitar o surgimento de micro-organismos que não sejam actinobactérias (Hirsch & Christensen 1983).

Boa parte dos representantes desse filo são capazes de crescerem nos meios bacteriológicos laboratoriais convencionais. Alguns gêneros claramente necessitam de formulações especiais para auxiliar na esporulação e produção de pigmentos, no entanto, conjectura-se que meios nutricionalmente "pobres" sejam os melhores para estudos de morfologia (Holt et al. 1994). Dentre esses, destacam-se o ágar amido-caseína (AC), M3 e quitina coloidal, todavia outros, como o ágar vitamina ácido-húmico apresentam-se convenientes para isolamento de outros gêneros mais incomuns, no caso, *Micromonospora, Microbispora, Streptosporangium, Dactylosporangium* (Williams et al. 1983; Hayakawa & Nonomura 1987). O emprego de técnicas de diluição seriada mostra-se mais adequado durante o procedimento de isolamento, principalmente para contagem de colônias, apesar dos obstáculos evidentes do ponto de vista técnico (Williams & Davies 1965; Wellington & Toth 1994).

Ressaltam-se as subsequentes formas de pré-tratamentos físicos e químicos utilizados no isolamento seletivo de actinobactérias, principalmente as ditas "raras" ou não-estreptomicetos: (i) dessecação ou aplicação de calor úmido ou seco para redução do número de bactérias gram-negativas; (ii) centrifugação, para eliminação de *Streptomyces* e outros *Actinomycetales* não móveis da fase líquida, facilitando o crescimento de outros gêneros; (iii) emprego de esterilizantes como micro-ondas, radiações eletromagnéticas e de alta frequência e ondas ultrassônicas; (iv) adição de agentes antibacterianos e antifúngicos de amplo espectro, para exclusão de contaminantes; (v) uso de substâncias quimioatraentes ou "iscas" (xilose, íons cloreto e brometo, γ-colidina, vanilina, pólen) para isolar actinobactérias produtoras de esporos móveis; (vi) tratamento com compostos químicos biocidas que não afetam propágulos de *Actinomycetes*, como fenol e cloramina; (vii) incorporação de macromoléculas (exemplo do carbonato de cálcio) para promover o crescimento preponderante de gêneros raros, a geração de moléculas bioativas e supressão de outros micro-organismos; e outros métodos, como co-cultura, simulação de ambiente natural *in vitro* e etc. A associação de um ou vários tipos de pré-tratamento potencializa o isolamento de tal modo que novos organismos sejam

descobertos e estudados, crucialmente aqueles oriundos de ambientes não tão explorados (Seong et al. 2001; Khanna et al. 2011; Subramani & Aalbersberg 2013).

O cultivo em ágar geralmente demonstra colônias abundantes, de firme consistência e fortemente aderidas ao substrato. Acredita-se que a extensão da parede celular como hifas ramificadas seja responsável pelo crescimento. A periferia das colônias pode acumular diferentes materiais de reserva energética, como glicogênio, lipídeos e polifosfato (Goodfellow et al. 1984; Locci & Sharples 1984). Culturas líquidas necessitam de aeração e agitação e, dependendo do objetivo da pesquisa, podem carecer de defletores no interior dos frascos, para a difusão do micélio em desenvolvimento, e altas velocidades com a incubação em *shakers* para um crescimento máximo e contínuo. Nessa forma de cultivo, o propágulo ou parte do micélio irá germinar, entrelaçar, elongar e depositar-se como pequenos grumos ou partículas vegetativas (Holt et al. 1994).

Não se pode contestar a legitimidade da morfologia para identificação de actinobactérias, dado que a mesma viabiliza um rápido e útil guia para revelar a identidade de um isolado até o seu devido gênero. Classicamente, os aspectos macroscópicos relevados incluem características das colônias, como tamanho, cor, consistência em variados meios, ausência de micélio aéreo e extensão da produção de esporos. Quanto à micro-morfologia, salienta-se a fragmentação ou não dos micélios vegetativo e aéreo, presença de escleródios, morfologia da cadeia e ornamentação da superfície de esporos. Contudo esses caracteres somente podem ser observados quando o crescimento não é muito denso e se os meios são adequados para promover diferenciação. Características de hifas e cadeias esporulantes podem ser determinadas por microscopia de luz empregando técnicas adaptadas de microcultivo em lâmina, assim, como lançar mão de microscopia eletrônica para aprofundar investigações em nível de estrutura dos esporos (Higgins & Silvey 1966; Holt et al. 1994; Khanna et al. 2011).

É imprescindível também efetuar a caracterização fisiológica, através de provas utilizando-se variadas fontes de carbono e nitrogênio, e inúmeros testes, como os de sensibilidade/resistência a antibióticos, de degradação de biomoléculas, além de outros classicamente empregados em microbiologia, como a avaliação da produção de catalase e da ocorrência de proteólise (Goodfellow & Alderson 1979; Williams et al. 1983). Esses dados fenotípicos são amplamente considerados em procedimentos de taxonomia numérica e foram inicialmente fundamentais. O *International Streptomyces Project* (ISP), a primeira iniciativa que tentou uniformizar um conjunto padrão de características morfofisiológicas para categorização de actinobactérias, apresenta uma diversidade de métodos padronizados até

hoje empregado para análises morfofisiológicas desses procariotos (Shirling & Gottlieb 1966; Goodfellow 1989).

Entretanto, foram os dados quimiotaxonômicos que propiciaram uma arrojada reavaliação da sistemática das actinobactérias (Goodfellow& Cross 1984). O padrão de distribuição de diferentes constituintes macromoleculares celulares clarificou a identificação de membros dentro do mesmo ou de um diferente táxon nas categorias de gênero e espécie. Uma porção vultosa dessas bactérias foi agrupada em práticos sistemas classificatórios de acordo com a determinação de aminoácidos dibásicos (especialmente o DAP), açúcares totais e ácidos graxos presentes na parede ou hidrolisados celulares e que poderiam ser detectados por simples técnicas cromatográficas. Essa variação química celular é extensivamente aplicada para completar e esclarecer a identificação de isolados recém-descobertos, dado que existe uma satisfatória congruência entre esses biomarcadores e a posição relativa dos táxons em árvores filogenéticas (Lechevalier & Lechevalier 1970; O'Donnel 1988; Kim 1999).

O sequenciamento e análises filogenéticas do 16S rDNA atualmente exercem o mais importante papel na identificação de actinobactérias, especialmente em níveis de classificação mais elevados, circunscrição de gêneros e evidenciação de novas espécies. Contudo, algumas desvantagens já foram verificadas no emprego extensivo desse marcador molecular, especialmente quanto ao desgaste em reajustes contínuos das relações supragenéricas com a adição concomitante de novos táxons. Por seguinte, nota-se com a irrefreável explosão da genômica nos últimos anos que em um futuro próximo o sequenciamento completo de genomas desses procariotos irá reger o processo de reconhecimento dos isolados. Preconiza-se também o acoplamento de outros métodos de tipagem molecular microbiana com a consolidada estratégia de taxonomia polifásica, além da gradativa ascensão de metodologias avançadas, como espectrometria de massas de pirolisados celulares, as quais podem transformar e tornar extraordinariamente rápida a seleção de profícuos isolados desses organismos (Schleifer & Stackebrandt 1983; Sanglier et al. 1992; Goodfellow & Fiedler 2010; Khanna et al. 2011).

1.2 Metabólitos secundários

As actinobactérias constituem um dos mais prolíficos quanto à produção de metabólitos secundários, compostos gerados no decorrer do desenvolvimento dessas bactérias e que, tornam esses organismos especialmente aplicáveis do ponto de vista biotecnológico. Na maior parte das vezes, essas biomoléculas exibem interessantes atividades biológicas, sendo a

antibiótica a mais explorada e conhecida, proporcionando um versátil emprego das mesmas na medicina, indústria e agricultura (Groth et al. 1999; Wohlleben et al. 2012).

Os metabólitos primários (nucleotídeos, aminoácidos, monossacarídeos, ácidos graxos e vitaminas) constituem os produtos do metabolismo celular normal (primário), os quais, em uma série de reações enzimáticas, são convertidos em macromoléculas essenciais (ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, lipídeos) encarregadas pelas funções estruturais e biológicas básicas, ou seja, associados à manutenção do crescimento e reprodução dos organismos. São amplamente distribuídos na natureza e, assim, o processo responsável pela sua formação é essencialmente idêntico entre todos os seres vivos. As reações da trofofase ("fase de crescimento") são finamente balanceadas, e os intermediários formados raramente se acumulam (Drew & Demain 1977; Martin & Demain 1980; Betina 1995).

O metabolismo secundário ou idiofase ("fase de produção") engloba processos biossintéticos que originam os denominados metabólitos secundários, ou "idiólitos", substâncias que aparentemente não são cruciais para o desenvolvimento e reprodução dos organismos produtores. Comumente, possuem elevada variedade estrutural e baixo peso molecular, são frequentemente formados como misturas de compostos de membros relacionados de uma classe química, e são encontrados em organismos não filogeneticamente relacionados, sendo assim produzidos por bactérias, fungos, algas, corais, esponjas, plantas e alguns animais inferiores (Martin & Demain 1980; Maplestone et al. 1992; Demain & Fang 2000).

É ampla a gama de possíveis atividades biológicas que os metabólitos secundários, especialmente os microbianos, podem apresentar: antibióticos (ações antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiprotozoárica e antihelmíntica), pigmentos, toxinas, efetores na competição ecológica e na simbiose, feromônios, inibidores de enzimas, agentes imunomoduladores e quimioterápicos, antagonistas ou agonistas de receptores, pesticidas, herbicidas, aditivos alimentares, surfactantes, ou promotores do crescimento de animais e plantas (Figura 3). Não se acredita mais que esses compostos não exerçam nenhuma função no produtor, já tendo sido comprovado que os mesmos exercem papéis fisiológicos fundamentais, como reservas energéticas, quelantes de íons, sinais de diferenciação celular, e ações regulatórias no metabolismo central. A crença de "função exclusiva" de um metabólito secundário também já foi derrubada, uma vez que um determinado idiólito pode exibir diferentes atividades bioativas e o conhecimento das mesmas depende muito do objetivo dos estudos (Vinning 1990; Demain 1998; Bérdy 2005; Davies 2013).

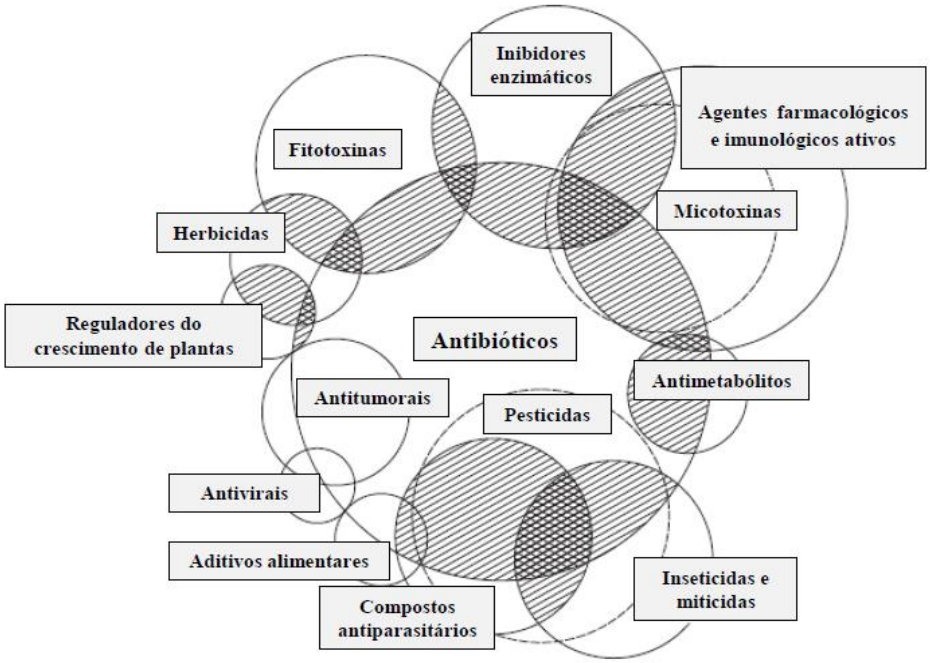


Figura 3 – Funções dos metabólitos microbianos bioativos (Adaptado de Bérdy 2012).

A diversidade química e as estruturas incomuns dos idiólitos são representadas pelas muitas classes de compostos orgânicos a que eles podem pertencer, incluindo: aminoaçúcares, quinonas, cumarinas, epóxidos, alcalóides, glutarimidas, glicosídeos, derivados do indol, lactonas, macrolídeos, naftelanos, nucleosídeos, peptídeos, fenazinas, poliacetilenos, polienos, pirróis, quinolinas, terpenóides e tetraciclinas (Martin & Demain 1980; Edreva et al. 2008). Drogas derivadas naturalmente, especialmente as produzidas por micro-organismos, possuem elevada complexidade estérica com muitos centros quirais presentes. Usualmente, são mais polares e têm características estruturais únicas, não encontradas em compostos sintéticos. As estruturas dos metabólitos produzidos por actinobactérias destacam-se como as mais multiformes e singulares, o que reflete uma peculiar maquinaria biossintética (Bérdy 2012). Estima-se que mais de 90% dos metabólitos microbianos bioativos já tiveram suas estruturas químicas elucidadas (Bérdy 2005).

Elaboradas e diversas estruturas requerem vias anabólicas com as mesmas características. A geração desses idiólitos aparenta ser dispendiosa energeticamente. Tendo como base o exemplo dos antibióticos, a formação dos mesmos tipicamente envolve 10 a 30 passos catalisados por maquinarias proteicas multienzimáticas. Comumente, os precursores dos idiólitos são intermediários das rotas centrais ou metabólitos primários, como acetil-coA e malonil-coA, fosfoenolpiruvato e piruvato, e alfa-aminoácidos hidrofóbicos. A complexidade genética associada ao anabolismo dessas pequenas biomoléculas ultrapassa a existente para os

metabólitos primários e, frequentemente, os produtores têm uma significativa porcentagem do genoma cromossômico dedicada à codificação da informação necessária à biossíntese desses metabólitos (Malik 1980; Maplestone et al. 1992; Haslam 1995). A capacidade anabólica dos micro-organismos, especialmente actinobactérias, parece ser inesgotável. Esses seres podem gerar novas moléculas por extensiva ramificação, e uma sucessão de reações promovidas por diferentes enzimas, como condensações, alquilações, oxidações, isomerizações em simples "decorações estruturais" (Bérdy 2012).

O metabolismo secundário é geralmente acarretado por exaustão de nutrientes, biossíntese ou adição de um indutor e/ou decréscimo na taxa de crescimento. Esses eventos geram sinais que incitam uma série de cascatas regulatórias as quais resultam nas diferenciações químicas (idiofase) e morfológicas (morfogênese) (Demain 1998). Os mecanismos de regulação do anabolismo dessas biomoléculas são complexos e ainda pouco elucidados, porém percebe-se que uma influência direta do metabolismo primário sobre o secundário e vice-versa, não podendo se admitir que ambos os processos são mutualmente exclusivos e ocorram isoladamente nos produtores. A retroalimentação inibitória, repressão catabólica, indução ou inibição enzimática e o compartilhamento de intermediários e co-fatores são alguns desses importantes meios que governam a regulação metabólica ainda não absolutamente compreendidos (Drew & 1977; Malik 1980; Martin & Demain 1980). Já foi confirmado que vias específicas que regem esse controle são codificadas por genes incorporados nos *clusters* gênicos biossintéticos desses compostos e estariam agindo pleiotropicamente (Craney et al. 2013).

A produção dos idiólitos comumente coincide ou, sutilmente, antecede o desenvolvimento das hifas aéreas e a fase estacionária nos cultivos microbianos em meios sólidos e líquidos, respectivamente (Bibb 2005). Esse fenômeno certamente foi estabelecido como fruto de pressões evolutivas e, desse modo, sua função primária seria uma defesa química pela qual o organismo se protegeria de outros competidores presentes no ambiente. Isso é coerente com a observação da diversidade química dessas substâncias, as peculiaridades em sua síntese e a ausência dos mesmos em situações favoráveis e em seres com sistema imune desenvolvido (Maplestone et al. 1992).

O solo é notoriamente um ambiente complexo e suscetível a estresses, que podem ocorrer espacial e temporalmente. Dessa maneira, actinobactérias de ambientes terrestres, com exemplo claro crucialmente as do gênero *Streptomyces*, estão vulneráveis a essas situações e, logo, necessitam combatê-las, com a expressão de um extenso número de genes que irão codificar proteínas reguladoras, transportadoras e enzimas. Caso os metabólitos gerados,

como resultado dessas mudanças, sejam úteis aos organismos, os genes biossintéticos serão conservados e modificações a nível gênico favorecerão ainda mais a múltipla produção desses compostos. Entidades químicas variáveis no aspecto estrutural poderiam agir sinergicamente ou contingentemente contra o adversário para garantir a sobrevivência. Essa diversidade estrutural é inclusive gerada pela inespecificidade das enzimas do metabolismo secundário, que foi preservada por ser vantajosa aos micro-organismos produtores, reduzindo os custos adaptativos para os mesmos à medida que sua história evolutiva transcorre (Firn & Jones 2000; Challis & Hopwood 2003).

Por isso, a sobreposição da etapa de crescimento reprodutivo e esporulação com o estímulo do anabolismo desses compostos não é apenas coincidente, contudo uma relação com o objetivo de preservar a continuidade do ciclo de vida desses micro-organismos. Os metabólitos secundários seriam secretados em baixas concentrações efetivas simultaneamente nessa fase em que o micélio aéreo está se formando e os organismos estão vulneráveis, não somente por essas substâncias serem possíveis efetores na regulação da esporogênese, como um modo de proteção contra os competidores. Essa estratégia seria também uma "emboscada", na qual os próprios adversários no meio seriam consumidos nutricionalmente, graças ao fantástico conjunto de enzimas extracelulares das actinobactérias (Stone & Willians 1992; Chater 2006). Assim, pode-se afirmar que esses metabólitos são moléculas de adaptação que evoluíram independentemente da trofofase e estão intimamente relacionadas com a ecologia desses procariotos (O'Brien & Wright 2011). Davies & Ryan (2011) assinalam que essas pequenas moléculas compõem um elo perdido no dogma central da biologia molecular, o "parvoma", e que enquanto suas funções naturais e propriedades bioquímicas continuarem sendo ignoradas e não plenamente conhecidas, a gama de atividades farmacológicas das mesmas vão demorar a serem totalmente usufruídas na medicina moderna.

1.3 Antibióticos antimicrobianos

Os princípios da antibioticoterapia remontam a Paul Erlich, o pai da "quimioterapia moderna", em uma sistemática tática de exame de compostos químicos que levou a confecção das "balas mágicas" ou Salvarsan 606, um derivado do arsênico e o primeiro medicamento voltado para o tratamento da sífilis, uma doença sexualmente transmissível (DST) endêmica e praticamente incurável no início do século XX. O "acidental" descobrimento da penicilina por Fleming em 1929 e da estreptomicina em 1943 por Schatz e Waksman inaugurou a investigação dos produtos naturais como potenciais drogas no

tratamento de infecções. Essas moléculas constituíram as primeiras formas terapêuticas para as enfermidades ocasionadas pelos temidos micro-organismos, vistas até então como uma das maiores pragas da história da humanidade (Davies 2006a; Sepkowitz 2011).

As décadas de 1950 e 1960 foram conhecidas como a "Era Dourada da Antibioticoterapia", na qual a maioria das estruturas funcionais dos antimicrobianos existentes atualmente foram descobertas e que a indústria farmacêutica contemporânea foi fundada. Uma das maiores contribuições do emprego terapêutico dos antibióticos, em associação com as melhorias na saúde pública e a difusão do saneamento básico, foi o impactante aumento da expectativa de vida da população na geração pós-guerra (Aminov 2010; Davies 2013). A capacidade de curar infecções fundou campos pioneiros na medicina, como a medicina intensiva (por exemplo, uso de ventiladores e cateteres venosos), cirurgias de maior complexidade, o cuidado de neonatos prematuros, transplantes de órgãos e a quimioterapia do câncer (Spellberg 2014).

O termo "antibiótico" sofreu excessivas interpretações no decorrer dos anos, o que ocasiona certa confusão até hoje. Selman Waksman, o responsável pela descoberta da estreptomicina e pioneiro na seleção de solos como fonte de antimicrobianos, primeiramente atribuiu um conceito a esses compostos sob um olhar de que os mesmos desempenhavam funções na natureza. Assim, os antibióticos seriam "substâncias químicas produzidas por micro-organismos que possuíam a propriedade de inibir o crescimento e até mesmo destruir outros organismos". Contudo essa conceituação é simplesmente uma definição do uso, efeito laboratorial ou simplesmente a atividade biológica, e foi criada para facilitar a comunicação sob uma perspectiva exclusivamente antropogênica, sem considerar os papéis reais desses compostos para a ecologia e evolução dos organismos produtores (Waksman 1953; Yim et al. 2006b; Davies & Davies 2010).

Tem sido comprovado que esses denominados "antibióticos" são na verdade pequenas moléculas microbianas bioativas que sob uma determinada concentração exibem antibiose, ou seja, a capacidade de um organismo e seus metabólitos de prejudicar ou inibir o crescimento de outro. Contudo, essa relação ecológica foi adotada de tal forma que acabou se tornando um método insensível e impreciso de identificar ou descrever a bioatividade de um determinado composto, sem ao menos detectar sua presença. Em outras palavras, "antibiótico" é "um composto terapêutico produzido por uma companhia farmacêutica, uma definição útil apenas no âmbito das propriedades desses compostos fora de seu ambiente normal" (Davies 2006; Davies 2010).

O trabalho pioneiro do grupo de Waksman não somente demonstrou que as actinobactérias eram capazes de produzir antibióticos úteis para aplicação na prática médica, contudo também estimulou a intensiva busca por isolados novos com atividade biológica. As etapas graduais desses primitivos programas de triagem restringiam-se ao isolamento e cultivo dos organismos, ensaios de atividade antibiótica e a caracterização química e identificação das substâncias almejadas. Esse primeiro período de investigação foi relativamente "pouco científico" (maquinal) e extremamente laborioso, todavia milhares de amostras microbianas foram recuperadas, a maioria rematadamente pertencente ao gênero *Streptomyces*. Foi coletivamente verificado entre os grupos de pesquisa que espécies particulares não eram universalmente distribuídas entre os variados tipos de solo e que diversos e novos gêneros surgiam constantemente. Os meios de isolamento, até hoje vistos como os de referência, foram desenvolvidos nessa época e as originais formas de identificação de actinobactérias, fundamentada somente em caracteres morfológicos, foram definidas. A cooperação entre microbiologistas e químicos foi importante, uma vez que os métodos de análises instrumentais sempre eram empregados após a extração *in vitro* via cultivo microbiano em larga escala para apurar e determinar os compostos de interesse (Nolan & Cross 1988; Okami & Hotta 1988).

O tempo compreendido entre o final da década de 1940 até meados dos anos 1960 foi considerado o auge dessa "Era de Ouro". Inicialmente, as companhias farmacêuticas colaboravam em um esforço conjunto para proveitosa obtenção dessas primeiras drogas antimicrobianas, como a penicilina e estreptomicina. No entanto após o sucesso comercial de ambos os fármacos, as mesmas iniciaram uma acirrada disputa para descoberta dessas "drogas miraculosas", uma vez que essas eram virtualmente as únicas disponíveis para a quimioterapia de infecções. Cerca de 100.000 actinobactérias eram isoladas em sistemas de triagens, sem nenhuma automatização. Sucessivamente, antibióticos eram isolados de modo ostensivo de inéditas espécies de estreptomicetos, como o cloranfenicol, neomicina, tetraciclinas, eritromicina, vancomicina, rifampicina, gentamicina, rifampicina e inúmeros outros (Figura 4). Dos 15.000 metabólitos secundários encontrados, 12.000 eram antibióticos, com 70% deles produzidos por actinobactérias. Cada nova classe promoveu a produção de formas semi-sintéticas e de múltiplas gerações dos compostos primários, com um aumentado espectro de ação, o que fornecia uma significativa melhora na terapia (Barrett & Barrett 2003; Demain 2010; Procópio et al. 2012; White 2012).

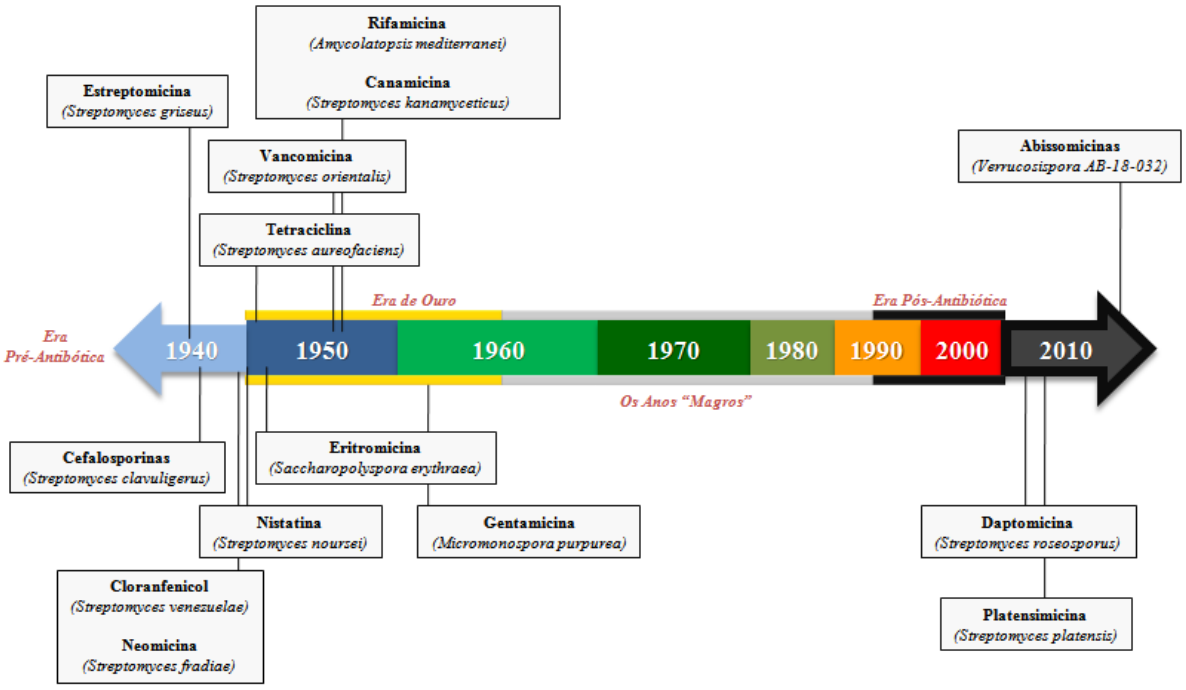


Figura 4 – Exemplos de antibióticos antimicrobianos produzidos por actinobactérias na linha do tempo da Era dos Antibióticos (Adaptado de Davies & Davies 2010; Mahajan & Balachandran 2012; Procópio et al. 2012).

Os antibióticos com atividade antimicrobiana bloqueiam o crescimento dos organismos sensíveis por meio da inibição de uma ação ou macromolécula essencial para a função celular, como uma enzima ou ácido nucleico. Isso significa que esses compostos se associam com um determinado sítio específico na macromolécula alvo, compondo um complexo molecular que não é mais funcional. Assim, para determinar o mecanismo de ação de um antibiótico é necessário identificar essa macromolécula alvo e sua devida função, e isso é mais simples do que identificar o próprio antibiótico. Por essa razão, são classificados de acordo com seus sítios específicos de ação na célula microbiana: (i) interferência na produção da parede celular (β-lactâmicos e glicopeptídeos); (ii) inibição da síntese de proteínas (aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrolídeos); (iii) interferência no anabolismo de ácidos nucléicos (quinolonas, rifampicina, nitrofurantoínas); (iv) alteração em vias metabólicas (sulfonamidas, trimetoprim, ácido fólico); (v) rompimento da membrana plasmática (polimixinas, e também antifúngicos poliênicos) (Lancini & Parenti 1982; Neu 1992; Tenover 2006).

Antimicrobianos podem também ser categorizados na capacidade dos mesmos em simplesmente inibir o crescimento microbiano (microbiostáticos) ou de induzir a morte celular (microbiocidas). De fato, podem exibir ambos os efeitos, o que dependerá de alguns fatores, como a dose administrada, as condições de cultivo dos micro-organismos indicadores,

e a duração do teste empregado (Pankey & Sabath 2004; Kohanski et al. 2010). Pesquisas recentes apontam que os antibióticos partilham um mecanismo comum para acarretar a morte celular, o que estaria relacionado à elevação da concentração de radicais hidroxilas reativos resultantes de alterações no metabolismo central e de ferro, de modo bem similar à apoptose eucariótica (Kohanski et al. 2007; Dwyer et al. 2012).

1.3.1 Resistência aos antimicrobianos

Em 1967, o médico William H. Stewart, o Chefe do PHSCC (*Public Health Service Commissioned Corps*) dos Estados Unidos da América (EUA), anunciou para todo o corpo oficial de representantes de saúde pública do país que era o momento de "fechar o livro" das doenças infecciosas e alternar toda a atenção e subsídios financeiros disponíveis em pesquisas nas chamadas doenças crônicas. Mal imaginava o porta-voz que o declínio efetivo da "Era Dourada da Antibioticoterapia" estava se principiando concludentemente. O acesso a esses fármacos foi facilitado e seu emprego difundido a um patamar que eles eram verdadeiramente vistos como uma "panacéia", aplicados até para curar infecções triviais, muitas delas de origem não bacteriana (Bax et al. 2000; Alanis 2005).

Micro-organismos coexistem com a espécie humana por milhares de anos e têm aperfeiçoado uma série de mecanismos para enfrentamento que os capacitam a sobreviver às condições de adversidade e na presença de tóxicos. Qualquer agente terapêutico que alcance sucesso é passível de sofrer o potencial surgimento de tolerância ou resistência a partir do instante em que começa a ser utilizado. Hoje, é universalmente aceito que a diminuição contínua da sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos possui como causa basilar o uso indiscriminado dessas drogas (Clardy & Walsh 2004; Woo et al. 2006; Davies & Davies 2010).

A resistência aos antimicrobianos consiste unicamente em uma resposta evolutiva a intensa pressão seletiva resultante da exposição incessante a esses compostos, isto é, em uma população de células microbianas a maioria é suscetível à droga, porém sempre haverá um subconjunto de indivíduos resistentes que irá se proliferar e predominar (Mulvey & Simor 2009; Wright 2010a). É uma insensatez proclamar vitória sobre organismos que ultrapassam em número os seres humanos por um fator de 10^{22}, originam 500.000 gerações no mesmo período em que precisamos para advir uma, e que tiveram 3,5 bilhões de anos para se adaptarem aos mais variados ambientes da Terra (Spellberg et al. 2008).

Genes de resistência a antibióticos estão amplamente dispersos nos micro-organismos ambientais e não necessariamente nocivos, o que se denomina resistência intrínseca, isto é, o organismo não é suscetível ao composto em vista de uma inerente característica estrutural ou funcional. Os próprios produtores dessas substâncias carregam esses segmentos gênicos inseridos em frações genômicas relacionadas à biossíntese dessas moléculas, como uma forma de evitar autointoxicação e a própria morte. A totalidade dessas unidades gênicas engloba o "resistoma" e com base nas semelhanças bioquímicas e genéticas, os principais modos de subsistir a esses compostos detectados hoje nos patógenos teriam como origem essas comunidades microbianas naturais. Essa provável transferência gênica horizontal teria sido favorecida e acelerada pelo emprego sem controle dos antibióticos não somente na prática médica. Esses compostos também são aplicados na veterinária e, notoriamente, em doses subterapêuticas na agricultura para estímulo do crescimento animal e vegetal (Wright 2010b; Kozhevin et al. 2013; Blair et al. 2014).

Hoje, está sendo finalmente reconhecido o papel dos intestinos de animais e cultivares como reservatórios de bactérias multirresistentes. A rota básica de dispersão desses organismos seria pela liberação inadequada de resíduos agrícolas no ambiente ou seu uso como fertilizantes e via alimentação, o que somente potencializaria a proliferação dos genes de resistência entre os grupos microbianos (Ghosh & LaPara 2007; Hawkey & Jones 2009; Martinez 2009). Um recente estudo de Dantas et al. (2008) corrobora a seriedade dessa dispersão ambiental da resistência pelo surpreendente isolamento de bactérias de diversos solos com capacidade de consumir antimicrobianos de origem natural ou sintética como fonte única de carbono.

Em sua forma adquirida, populações microbianas se tornam invulneráveis aos antibióticos por mutações genômicas herdáveis pelas próximas gerações (transferência vertical) ou por obtenção de material genético exógeno (transferência horizontal ou lateral). Essa aquisição pode acontecer entre organismos da mesma espécie ou de diferentes gêneros e espécies, por conjugação, transdução ou transformação, com a participação de elementos genéticos móveis, como transposons, bacteriófagos, DNA livre e plasmídeos que medeiam e facilitam a propagação da resistência. Os mecanismos bioquímicos essenciais que sofisticadamente resultam na resistência em si, por sua vez, são: (i) modificação a nível genético do alvo biomolecular do fármaco; (ii) estímulo da síntese de enzimas que degradam ou mudam o agente antimicrobiano, inativando-o; (iii) inibição ou alteração direta dos canais proteicos de membrana precisos para entrada da droga na célula; (iv) elevação da expressão

de bombas de efluxo, que expelem esses compostos para o meio extracelular (Courvalin 1996; Levy & Marshall 2004; Nikaido 2009; Andersson & Hughes 2010).

Ao longo dos anos e continuando no presente, praticamente todos os conhecidos micro-organismos patogênicos e numerosos comensais humanos desenvolveram resistência a um ou mais antimicrobianos de uso terapêutico (Cantas et al. 2013). Patógenos multirresistentes são tradicionalmente isolados em instituições de assistência a saúde, já que foram esses ambientes possuem todas as condições propícias para atuação da pressão seletiva (Cloutier 1995). Em um brevíssimo período de tempo após o antibiótico ser introduzido clinicamente, os micro-organismos já não são mais sensíveis (Hogberg 2010).

Mesmo que as amostras microbianas resistentes tenham dominado primeiramente os ambientes de serviço de assistência em saúde, têm se elevado em uma espantosa frequência os relatos de infecção de várias espécies e não suscetíveis a vários antimicrobianos em pacientes sem nenhum contanto com o âmbito hospitalar, como os *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, os MRSA (*methicillin-resistant S. aureus*), e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina e eritromicina. Os antigos patógenos hospitalares, que se acreditavam estar parcialmente controlados e compreendidos, retornaram ainda mais perigosos, exemplo dos *Enterococcus faecium* e *faecalis* resistentes a vancomicina, os VRE (*vancomycin-resistant Enterococcus*), *S. aureus* resistentes aos glicopeptídeos, as enterobactérias produtoras de β-lactamases de amplo espectro (ESBL) e carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e o pan-resistente *Acinetobacter* spp. (Walsh & Amyes 2004; Levy 2005; Nordmann et al. 2007; Gisk 2008).

Aumento da morbidade e mortalidade por infecções microbianas são as consequências mais dramáticas da resistência a esses fármacos, e são decorrentes da demora da terapêutica efetiva das infecções. Outro efeito crítico é o aumento da incidência da infecção, visto que o tratamento de doentes e carreadores é uma estratégia determinante na interrupção da cadeia de transmissão (Cohen 1992; Livermore 2003). Além disso, a resistência microbiana custa muito caro aos serviços de saúde, especialmente pelo fato da rápida perda de efetividade das drogas (Smith & Coast 2013).

A orientação correta tanto dos profissionais de saúde quanto da população em relação ao emprego apropriado dessas drogas, a instauração e manutenção de sistemas de vigilância epidemiológica, o uso combinado de antimicrobianos de diferentes classes para prolongamento da vida útil dos mesmos, e a introdução de eficazes abordagens terapêuticas consistem nos meios cruciais para a contenção desse preocupante e impactante problema de saúde pública (Finch 2002; Read et al. 2011). E a ação mais imprescindível é a busca contínua

por compostos antimicrobianos. A evolução microbiana causadora da resistência a esses antibióticos é constante e, logo, os esforços coletivos para a pesquisa por essas drogas também devem ser incessantes (IDSA 2010).

1.3.2 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)

O gênero *Staphylococcus* (do grego, "*staphyle*", "cacho de uvas"; "*coccus*", coco) pertence à família Micrococcaceae e inclui cocos gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e podem ocorrer de forma isolada, aos pares, em cadeias curtas, ou predominantemente em grupos de cachos irregulares. São tipicamente imóveis, não formadores de esporos, geradores de catalase e, em sua grande maioria, anaeróbios facultativos. Constituem um dos principais grupos microbianos habitantes do epitélio da pele e membranas mucosas de mamíferos e são clássicos causadores de doenças em humanos. *S. aureus* (do latim, "*aureum*", ouro) é a espécie mais virulenta do gênero, distinguindo-se basicamente dos demais estafilococos pela pigmentação dourada das colônias e resultados positivos para a fermentação anaeróbia do manitol e produção de coagulase. É o responsável por uma extensa série de infecções de pele e de tecidos moles, respiratórias, ósseas e endovasculares, além de outras síndromes clínicas estritamente relacionadas com seu arsenal heterogêneo de fatores de virulência, o que posicionou esse micro-organismo como um dos mais versáteis e perigosos patógenos descritos até então (Lowy 1998; Brown et al. 2005; Gotz et al. 2006; Boucher et al. 2010).

Anteriormente ao advento da antibioticoterapia, as infecções por *S. aureus* consistiam em significante causa de mortalidade, atingindo taxas de até 70% em casos de bacteremia. Esses níveis declinaram consideravelmente após a introdução da penicilina para uso clínico no início da década de 1940. Entretanto, em um período inferior a dois anos, as primeiras cepas resistentes ao antibiótico foram detectadas, e no final dos anos 1950, a espécie já havia adquirido resistência a todos os antimicrobianos de uso parenteral em uso, incluindo a eritromicina e tetraciclina (Souza et al. 2005; Gould 2006; Deurenberg & Stobberingh 2008).

A produção de uma enzima capaz de clivar o anel β-lactâmico, primitivamente nomeada como penicilinase, foi constatada como o modo pelo qual a bactéria era hábil em evadir ao tratamento. Esse mecanismo de resistência já havia sido constatado mesmo anteriormente ao emprego da penicilina. Justamente para superar as problemáticas infecções pelas cepas produtoras de penicilinase, desenvolveu-se no final da década de 1950 a primeira

geração de penicilinas semi-sintéticas, as quais incluíram primeiramente a meticilina, seguida da oxacilina e cloxacilina, as quais foram estruturalmente sintetizadas para serem resistentes à inativação pelas β-lactamases. Contudo, em 1961, cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, os primeiros MRSA, emergiram em hospitais no Reino Unido e, diferentemente da não suscetibilidade à penicilina, o meio subjacente de resistência a meticilina também protegia esses cocos gram-positivos a toda classe dos β-lactâmicos (Otto 2012; Yamamoto et al. 2013).

A resistência a essa penicilina semi-sintética é diretamente conferida pela aquisição de um gene denominado *mecA*, o qual codifica uma modificada proteína ligante à penicilina (*penicilin binding protein* – PBP), a PBP2a. As PBPs são proteínas associadas à membrana que catalisam reações de carboxi- e transpeptidase nas etapas finais da biossíntese da parede celular bacteriana, processo em que são basicamente encarregadas da formação das reações cruzadas na cadeia de peptideoglicano nascente. Esse grupo proteico essencial para o crescimento celular bacteriano é o alvo dos β-lactâmicos, pois tais antibióticos exercem a função de substratos análogos que se associam covalentemente ao sítio ativo das PBPs, inviabilizando a continuação da reação anabólica. Uma vez que a PBP2a é funcional e possui uma afinidade reduzida aos antimicrobianos dessa classe, as cepas bacterianas podem sobreviver em concentrações anteriormente letais dos antibióticos (Chambers & Miick 1992; Chambers 1997).

O gene *mecA* e seus respectivos segmentos genéticos regulatórios, *mec*R1 e *mec*I, constituem o operon *mec*, o qual é carreado por um complexo elemento gênico móvel, o cassete cromossômico estafilocóccico *mec* ou SCC*mec* (*staphylococcal cassete chromossome*). Essa ilha genômica de resistência aos antimicrobianos ainda transporta duas recombinases, *ccr*A e *ccr*B, as quais possibilitam a integração do elemento no cromossomo bacteriano. Genes originados de plasmídeos relacionados à resistência a antibióticos não-β-lactâmicos, desinfetantes e metais pesados têm se agregado a algumas variantes desse fragmento de DNA, contribuindo para a sua heterogeneidade. Onze diferentes formas principais de SCC*mec* já foram descritas na literatura. Sugere-se que estafilococos coagulase-negativos foram os prováveis reservatórios inicias desse elemento gênico e, assim, compreenderiam os responsáveis pela propagação inicial do mesmo entre os *S. aureus* suscetíveis a meticilina (Hiramatsu et al. 2001; Enright 2003; Turlej et al. 2011).

Logo após os relatos dos primeiros casos de infecção por MRSA em hospitais no Reino Unido, o micro-organismo se disseminou para o restante da Europa e o mundo. As infecções nosocomiais por esse patógeno eram essencialmente relacionadas a elevados níveis de mortalidade, internação e enfermidades prolongadas e excessivamente onerosas. As

unidades de terapia intensiva (UTIs), de tratamento de queimaduras, de internamento, e sítios cirúrgicos de operação eram as mais afetadas, evidenciando os aspectos de oportunismo do MRSA. Os recorrentes surtos são precisamente relacionados às vias de transmissão do micro-organismo, o contato pessoa-pessoa e os fômites, ressaltando o papel da colonização assintomática de pacientes e, especialmente, de profissionais das instituições de assistência à saúde, o que colaborou veementemente para a dinâmica difusão mundial e estabelecimento dos vários clones dessa estirpe multirresistente, nomeada HA-MRSA (*health-care associated* MRSA), em hospitais e entidades relacionadas nas décadas de 1970 e 1980 (Gould 2006; Gordon & Lowy 2008; Morell & Balkin 2010; Shaffer 2013).

Enquanto o tratamento das afecções por HA-MRSA culminou com uma frequência cada vez maior da escolha do último antibiótico disponível para o tratamento até então, o glicopeptídeo vancomicina, eclodiram na primeira metade dos anos 1990 casos de fasciítes necrotizantes, osteomielites, púrpuras fulminantes e outras manifestações clínicas graves atribuídas à MRSA em populações sem os fatores de risco e histórico de exposição aos ambientes hospitalares. Esse novo grupo de *S. aureus* isolado de pacientes saudáveis na comunidade foi designado CA-MRSA (*community-associated* MRSA). Essa linhagem exibe algumas características peculiares que permite discriminá-la da variante hospitalar: (i) SCC*mec* dos tipos IV e V; (ii) a presença quase sempre dos genes codificantes da leucocidina de Panton-Valentine (PVL) e de outros fatores de virulência, como peptídeos solubilizadores de fenol e a citolisina α-toxina; (iii) e a sensibilidade a certos agentes antimicrobianos não-β-lactâmicos aos quais o HA-MRSA já é conhecidamente resistente. No entanto, esses critérios não são estão mais sendo relevados de forma tão rigorosa para classificação do CA-MRSA, sobretudo em vista de sua singular capacidade de colonizar e sobreviver no hospedeiro humano. Essa aptidão única que torna o MRSA originado da comunidade um patógeno tão bem-sucedido está diretamente fundamentada na sua flexibilidade genômica e, consequentemente, em sua maior virulência (David et al. 2008; Gelatti et al. 2009; Boucher et al. 2010; David & Dawn 2010; Otto 2013). O CA-MRSA está sendo continuamente isolado como agente causador de infecções nosocomiais e modelos matemáticos projetam que o mesmo substituirá definitivamente o HA-MRSA já na próxima década (Mediavilla et al. 2012).

Recentemente, o surgimento de cepas totalmente resistentes à vancomicina, chamadas VRSA (*vancomycin-resistant S. aureus*), alarma as comunidades médica e científica pela derradeira comprovação de escassez terapêutica. Sutilmente diferentes das amostras de VISA (*vancomycin-intermediate S. aureus*) já isoladas desde o fim dos anos 90,

as quais possuem sua origem em uma série acumulativa de mutações espontâneas, a resistência plena a esse glicopeptídeo é atribuída a uma transferência horizontal do operon *van*A a partir do *Enterococcus* spp., que resulta na formação de uma parede celular não suscetível ao antimicrobiano, por meio da diminuição na produção do arcabouço do peptideoglicano, do emprego metabólico do dipeptídeo D-alanina-D-alanina, os sítios de ação dos glicopeptídeos. Com uma parede celular mais espessa e desarranjada estruturalmente, o antibiótico fica aprisionado no polímero e não atinge a membrana citoplasmática, na qual se ligaria aos precursores do polissacarídeo, interrompendo sua geração (Srinivasan et al. 2002; Foucault et al. 2009; Périchon & Dourvalin 2009; Hiramatsu et al. 2014).

Dentre as mais recentes e úteis drogas restantes para o combate de infecções provocadas por MRSA, destacam-se a linezolida, a associação das estreptograminas (quinupristina-dalfopristina), o lipopeptídeo daptomicina, a tigeciclina, certas cefalosporinas de gerações mais recentes (ceftarolina e ceftobiprole) e novas oxazolidinonas (tedizolida). Necessita-se salientar que: a antibioticoterapia combinada é vital, uma vez que a linhagem de origem comunitária exibe, em um grau variável, sensibilidade a alguns antimicrobianos de classes mais antigas; e que esses outros fármacos são recomendados para diferentes situações, principalmente quando a resistência à vancomicina for confirmada laboratorialmente (Drew 2007; Edwards et al. 2014; Rodvold & McConeghy 2014). É crucial ressaltar também que as medidas eficientes de controle da cadeia de transmissão microbiana, como a descolonização de carreadores, e a detecção laboratorial rápida da resistência têm um papel primário indispensável para interromper o alastramento desses isolados (Marshall et al. 2004; Gould 2006).

Diversos compostos com atividade anti-MRSA estão atualmente em fase de ensaios pré-clínicos. Desde produtos naturais microbianos até estruturas geradas por síntese química, essas futuras drogas prometem constituir uma nova esperança na terapêutica das infecções estafilocóccicas. Alguns exemplos notórios são os inibidores de alguma etapa da formação da parede celular e compostos com ação desestabilizante sobre a membrana, como o lipoglicopeptídeo telavacina e relacionados; cerageninas, esteróides catiônicos; e a ramoplanina, um produto de fermentação de uma cepa de *Actinoplanes* ATCC 33076. Além de compostos que atuem sobre alvos enzimáticos até então não visados, como inibidores de deformilase e da biossíntese de ácidos teicoicos e ácidos graxos, bem como os polímeros catiônicos Akacid e Akacid Plus e peptídeos antimicrobianos com múltiplos e novos mecanismos de ação, anticorpos monoclonais e terapia com fagos, a qual especialmente tem ressurgido como uma alternativa para potencializar a antibioticoterapia conjunta (Van

Bambeke et al. 2008; Koyama et al. 2013; Kumar & Chopra 2013; Kurosu et al. 2013; Pasberg-Gauhl 2014).

Todavia mesmo sob esse panorama, ainda é lento o ritmo com que esses fármacos alcançam a etapa de ensaios clínicos frente à dispersão global veloz do MRSA, que se deve especialmente pelo custo para a adaptabilidade do micro-organismo de albergar o *mec* e outros elementos gênicos relacionados. É vital prosseguir com o árduo rastreio por moléculas com ação específica em alvos moleculares únicos desse patógeno plurifacetado, o qual pode evolutivamente ascender, em um futuro não muito distante, a um nível de invulnerabilidade que possibilitará que ele se torne um habitante natural de nossa microbiota (Hiramatsu et al. 2001; Foucault et al. 2009).

1.4 Antibióticos antitumorais

O câncer é um termo genérico atribuído a um abrangente conjunto de doenças basicamente caracterizadas pelo crescimento celular anormal e descontrolado o qual pode ter a capacidade de ultrapassar as barreiras teciduais e se espalhar pelo organismo (WHO 2015; NCI 2015). Possui um caráter etiológico multifatorial e mesmo com a predisposição genética e a microevolução clonal compondo os elementos básicos para o seu surgimento, estima-se que 95% de todos os neoplasmas são causados pelo estilo de vida e podem demorar de 20 a 30 anos para se manifestar (Merlo et al. 2006; Bhanot et al. 2011). Constitui a segunda maior causa de morte em nações desenvolvidas e a terceira em países em desenvolvimento e espera-se que, até 2050, 27 milhões de relatos e 17,5 milhões de óbitos vão ocorrer por ano (Saraswathy & Gong 2013). No Brasil, um total de 580 mil novos casos foi calculado para o biênio 2014/2015 (INCA 2014).

Juntamente com a radioterapia, intervenção cirúrgica e imunoterapia, a quimioterapia é ainda a opção mais amplamente aplicada para o tratamento do câncer. Todas essas alternativas são eficientes para situações particulares e, quando conciliadas, oferecem uma maior eficácia. Uma significativa porção das drogas quimioterápicas presentemente comercializadas é derivada de metabólitos secundários microbianos, em sua forma natural, quimicamente modificada, ou ainda como molde para a síntese de compostos relacionados. As actinobactérias se sobressaem entre os micro-organismos que proveram historicamente uma vasta série de antitumorais em uso clínico, desde a descoberta da actinomicina por Waksman e Woodruff nos anos 1940. Como principais exemplos têm-se as antraciclinas (daunorrubicina, doxorrubicina), glicopeptídeos (bleomicina e actinomicina D), ácidos

aureólicos (mitramicina), enedinas (neocarzinostatina), antimetabólitos (pentostatina), carzinofilina, mitomicinas e outros (Figura 5) (Salas & Méndez 1998; Olano et al. 2009a; Olano et al. 2009b; Gordaliza 2007; Demain & Sanchez 2009).

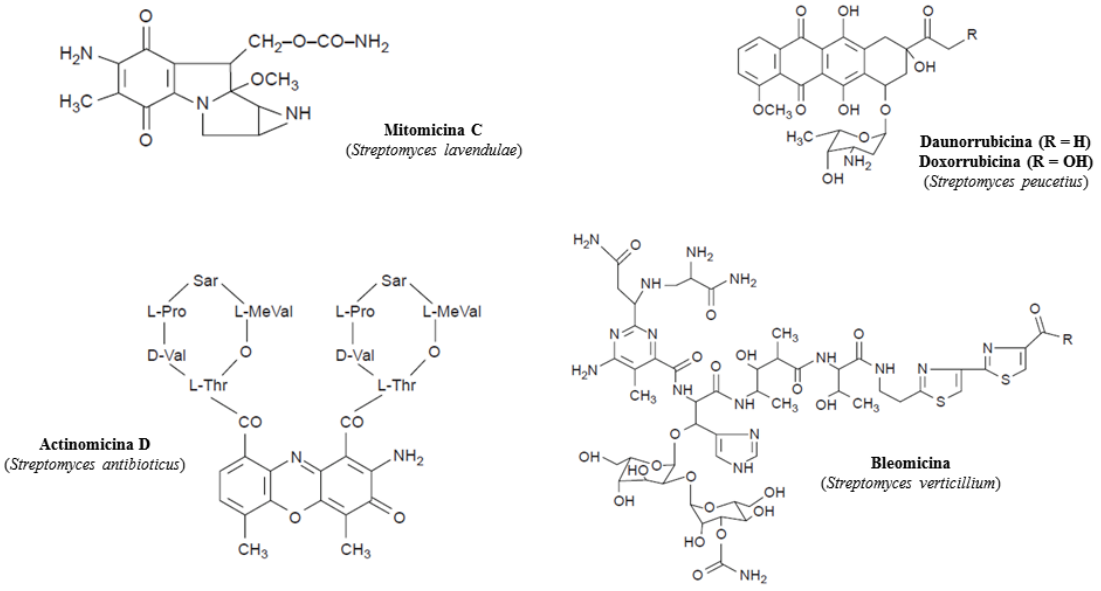


Figura 5 – Exemplos de drogas antitumorais derivados de actinobactérias com aplicação clínica na quimioterapia: estruturas químicas e organismos produtores (Adaptado de Salas & Méndez 1998).

Os antibióticos com atividade antitumoral ou citotóxica foram basicamente descobertos através de avaliação da capacidade inibitória do crescimento de diferentes linhagens de células tumorais por porções aquosas de culturas em fermentação. A maioria dessas frações de cultivo intervinha ora sobre a síntese macromolecular ora sobre a membrana celular. Alguns desses produtos microbianos exibindo essa peculiar ação foram descobertos em ensaios específicos de inibição de certas enzimas, tais como a transcriptase reversa, glioxalase, adenina deaminase e tirosina quinase, isto é, moléculas com outras atividades farmacológicas de interesse, como imunossupressores, antivirais e reguladores do crescimento. O termo “antibióticos antitumorais” se justifica precisamente por esse fato: a maior parte dessas drogas por muitos anos foram inicialmente isoladas com base na sua atividade antibacteriana e apenas, subsequentemente, foram avaliadas quanto aos seus efeitos citostáticos ou citocida (Umezawa 1988; Takeuchi 1995; Lancini & Lorenzetti 1993).

Todavia, mesmo considerando os diferentes níveis celulares sob os quais as drogas quimioterápicas podem atuar, é explícita a predominância da atuação desses antitumorais provenientes de actinobactérias sobre a estrutura e regulação bioquímica dos ácidos nucleicos. Assim, esses produtos podem exercer sua citotoxicidade por: (i) intercalação

direta sobre a molécula de DNA, exemplos da actinomicina D e da classe das antraciclinas; (ii) promoção da formação de ligações cruzadas, como a mitomicina D; (iii) clivagem induzida das fitas de DNA, tal como as bleomicinas e estreptonigrina; (iv) interposição de modo não-intercalante, como a mitramicina, chromomicina e olivomicina (Salas & Méndes 1998; Espinosa et al. 2003).

É fundamental frisar que na série de métodos primordialmente adotados para a caracterização e identificação de possíveis antineoplásicos de *Actinomycetes*, o primeiro passo consistia na determinação do espectro de ação antimicrobiana das biomoléculas nas misturas oriundas dos filtrados dessas culturas. A razão para a existência dessa etapa inicial é simples: inicialmente os compostos altamente tóxicos nos programas de seleção de antimicrobianos que eram negligenciados foram posteriormente averiguados quanto ao seu potencial citotóxico, o que alavancou a busca pioneira desses antitumorais. O reconhecimento dessa versátil bioatividade desses metabólitos secundários prova claramente que os mesmos ocasionam uma série de efeitos fisiológicos em animais pela interação com alvos bioquímicos altamente conservados entre as espécies (como cascatas de transdução de sinais), os quais podem representam focos na descoberta de antineoplásicos. Correntemente, as técnicas analíticas de isolamento desses produtos naturais avançaram formidavelmente, contudo ainda é proveitoso aplicar essa etapa de avaliação da citotoxicidade em estudos básicos de triagem por moléculas bioativas de actinobactérias (Bunge et al 1978; Rocha et al. 2001).

Dentre os mecanismos de ação desses agentes, a intercalação do DNA se sobressai. Esse modo de ligação droga-DNA envolve a inserção de uma molécula planar entre as bases nitrogenadas, o que resulta em uma torção e alongamento do ácido nucleico. Entretanto, a essência da citotoxicidade dos intercalantes jaz em sua capacidade de impossibilitar ação enzimática das topoisomerases, enzimas responsáveis pela regulação da topologia do DNA. A geração de complexos DNA-intercalante-topoisomerase, os quais são reconhecidos pela célula como uma região danificada estruturalmente, acionariam uma série de reações que resultam na apoptose. Vários estudos evidenciam que esse seria o modo primário de ação das antraciclinas, uma das principais classes de antibióticos antitumorais aplicadas em quimioterapia. Esses antibióticos foram submetidos à alteração bioquímica, gerando uma variedade de análogos semi-sintéticos que exibem um aprimorado grau de intercalação. Deve-se remarcar que antes mesmo de sua propriedade intercalante, esses compostos já causam uma distorção estérica na estrutura da molécula de ácido nucleico. Mesmo sendo recordados por serem tóxicos, inespecíficos e, muitas vezes, dispendiosos, os intercalantes ainda perduram como umas das drogas mais importantes na quimioterapia

antineoplásica (Furlan et al 2002; Martínez & Chacón-Gárcia 2005; Palchaudhuri & Hergenrother 2007; Neto & Lapis 2009).

Apesar de uma descontinuação lenta e não prioritária do desenvolvimento de antibióticos antitumorais, não se pode negligenciar o quanto esses agentes foram fundamentais na terapêutica do câncer, principalmente nos anos 1960, quando a comercialização das doxorrubicina e bleomicina começou. Frente a outros antineoplásicos, esses produtos microbianos tendem a serem mais específicos em suas interações com a molécula de DNA, e mais frequentemente, associados com modesta seletividade para células cancerosas e alvejando complexos de proteína-DNA. Particularmente os agentes que se associam ao DNA com múltiplos modos secundários de ação se destacam como futuros protótipos para retomar a pesquisa por esses antibióticos (Hurley 2002). A recente descoberta da salinosporida A a partir de um novo gênero de actinobactérias marinha, *Salinispora*, incentiva a procura desses metabólitos em um contexto no qual a associação da manipulação fisiológica dos micro-organismos produtores, química medicinal moderna e ferramentas genômicas mais desenvolvidas, renovará o perfil dos testes de varredura por novos fármacos antitumorais nas próximas décadas (Galm et al. 2005; Fenical et al. 2009).

1.5 Pesquisa para a seleção e desenvolvimento de novos antibióticos

Tradicionalmente, a biodiversidade no nosso planeta tem sido a maior fonte de agentes terapêuticos originais e bem-sucedidos. Dentre as muitas vantagens que tornam essas pequenas moléculas em potenciais compostos farmacêuticos, ressaltam-se a enorme variedade estrutural, as elevadas potência e especificidade bioquímica, múltiplos modos de ação, e outras propriedades moleculares essenciais que se aproximam do perfil necessário para uma ação farmacológica satisfatória (Tan et al. 2006; Koehn & Carter 2005; Bérdy 2012).

A descoberta de drogas é um processo pelo que substâncias com a atividade frente a um alvo ou função são identificadas, verificadas e otimizadas para aplicações clínicas. As primeiras etapas envolvem o encontro e a validação de um bom alvo, isto é, aquele que é eficaz, não danoso e que atenda as necessidades clínicas e comerciais. A partir de então, os "candidatos à droga" passam por ensaios biológicos automatizados, os HTSs (*high-throughput screening*) os quais compreendem a determinação da ação de enormes bibliotecas químicas dos compostos contra o respectivo sítio de ação já determinado. Uma fase secundária de avaliação geralmente consiste na seleção de uma única molécula, retestar sua seletividade em testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Finalmente, o protótipo tem sua

farmacologia desvendada em modelos animais adequados. A substância então pode ser modificada quimicamente e novamente testada, para então ser submetida às pesquisas clínicas (Verkam 2004; Hughes et al. 2011). Esses ensaios objetivam a averiguação da eficiência e segurança do futuro fármaco quanto a sua administração em humanos. São constituídos de três a quatro estágios, que se diferenciam pelas classes de indivíduos que receberão a droga e objetivos globais, ou seja: no primeiro (Fase I) apenas voluntários saudáveis para estabelecimento da amplitude da dose a ser empregada e análise dos primeiros efeitos colaterais; em seguida, expande-se o conjunto de pessoas, geralmente composto de pacientes, e os testes (Fase II, III e IV) provarão ou não se o composto é efetivo na dose delimitada e o comparará com outras formas de tratamento disponíveis (ICH 2010).

Com a revolução tecnológica no final do século passado, o processo inicial de encontro de novas drogas se transformou por completo. Anteriormente, tudo era bem artesenal, uma molécula biologicamente ativa avaliada por vez e, depois de exaustivos passos de isolamento, purificação e caracterização, que se realizavam as varreduras pelas atividades farmacológicas. Essa forma primordial era e ainda é amplamente realizada em laboratórios de pesquisa de instituições acadêmicas e algumas empresas farmacêuticas, todavia apresenta como desvantagens o fato de ser lento e de gerar reduzido número de derivados diferentes. Vivencia-se contemporaneamente a era do planejamento racional de fármacos fundamentada na estrutura molecular dos receptores, o que possibilita elaborar substâncias com perfis farmacológicos mais definidos (Amaral et al. 2003).

No passado, muitos dos antibióticos foram descobertos por meio de triagem dos extratos dos caldos de cultivo de actinobactérias e, em menor extensão, de fungos (Baltz 2006). Basicamente, os micro-organismos eram inoculados em meio líquido pertinente e, assim que iniciado o cultivo, a taxa de respiração aumenta, há o decréscimo do nível de oxigênio dissolvido e, consequentemente, dos nutrientes. Imediatamente, inicia-se o metabolismo secundário (Zenaitis 1993).

A associação e escolha dos vários métodos de separação subsequentes vão depender da solubilidade, volatilidade e estabilidade dessas moléculas. Assim, a próxima etapa consiste na extração dessas substâncias com solventes orgânicos polares ou apolares ou até mesmo por sublimação. Posteriormente, procede-se com o fracionamento dos extratos crus, por extração líquido-líquido ou métodos cromatográficos, dado que os mesmos consistem de uma complexa mistura, com substâncias não desejadas associadas. Alíquotas são então testadas em testes direcionados e o fracionamento continua na porção que demonstrar bioatividade. Finalmente, há a purificação, identificação e caracterização química

do composto, o que envolve várias técnicas instrumentais de maior complexidade. O isolamento de produtos naturais microbianos é contínuo e cada etapa fornece informações essenciais sobre as características químicas dos mesmos (Sticher 2007; Sarker & Nahar 2012).

O sucesso em obter novas substâncias bioativas derivadas de micro-organismos depende de efetivos sistemas de triagem de atividade biológica. Os mesmos requerem assim: (i) uso de material biológico adequado, como bactérias, células animais, enzimas e outros; (ii) habilidade para avaliar uma razoável quantidade material rapidamente; (iii) disponibilidade de condições para seleção e cultivo microbiano. Métodos de cultivo não convencional para isolamento de outros gêneros de actinobactérias, com exceção de *Streptomyces*, ensaios extremamente sensíveis para detecção de baixas concentrações dos metabólitos e baseados no mecanismo de ação do tipo de antibiótico que está sendo procurado, são alguns dos exemplos de modos de potencializar esses sistemas e alcançar êxito nas pesquisas (Omura 1986; Piret & Demain 1988). Ainda há dois tópicos que não devem ser avaliados isoladamente no processo de seleção de antibióticos. Um é a produção dos metabólitos de interesse, que abrange a escolha de novos organismos produtores e como eles podem gerar novos compostos. A outra questão é como detectar com sensibilidade e de modo efetivo as atividades dessas biomoléculas (Õiwa 1992). A Figura 6 sumariza o que foi descrito até agora sobre o sistema tradicional de desenvolvimento de antibióticos, fundamentalmente a partir de micro-organismos.

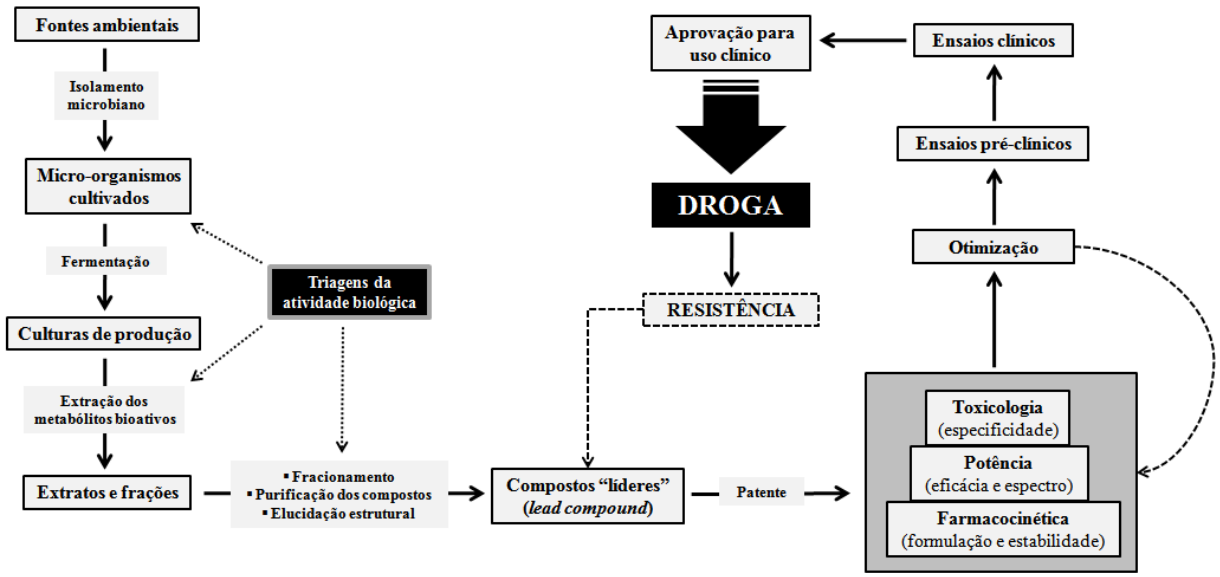


Figura 6 – Representação esquemática das fases gerais do processo clássico de desenvolvimento de novos antibióticos de origem microbiana (Adaptado de Black & Hare 2000 e Peláez 2006).

No final dos anos 1990, muitas das maiores companhias farmacêuticas diminuíram ou então eliminaram por completo seus núcleos de pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Na verdade, os esforços pela busca dessas drogas já vinham decrescendo continuamente desde o começo da década. O que é paradoxal é que a principal razão que acarretou nesse abandono é a justificativa que teoricamente deveria alavancar os estudos na direção por esses fármacos. O aparecimento quase simultâneo de resistência pelos micro-organismos após a introdução da droga para uso clínico encurta sua vida comercial. Entre 1962, quando o ácido nalidíxico, o precursor das quinolonas, começou a ser empregado, e 2000, quando a primeira oxazolidinona, a linezolida, foi aprovada para uso, nenhum arcabouço químico estrutural (como o anel β-lactâmico) foi descoberto e todos que eram aplicados clinicamente eram derivados das classes já existentes (Figura 7) (Shlaes 2003; Davies 2011; Bassetti et al. 2013).

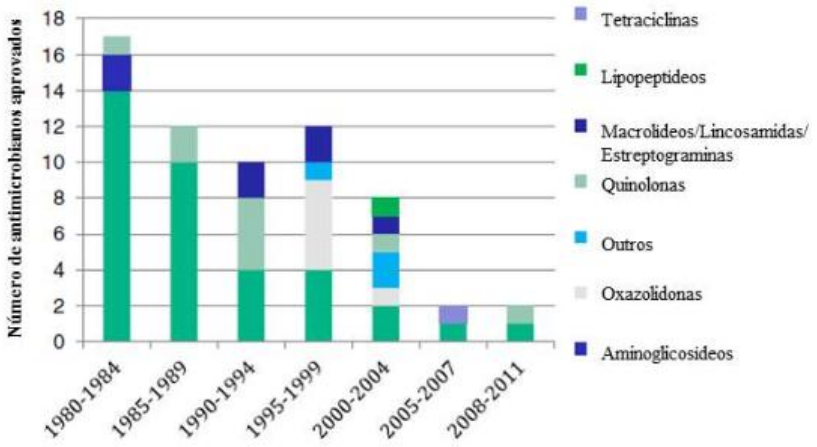


Figura 7 – Número de antimicrobianos aprovados para uso clínico nos últimos 30 anos (Adaptado de Bassetti et al. 2013).

Outros motivos explicam a perda de entusiasmo dessas corporações em investir financeiramente na produção de antimicrobianos. Primeiro, a antibioticoterapia é breve e assim que o paciente está curado o tratamento é disponível. Isso é totalmente o oposto do lucrativo campo das doenças crônicas e fundamenta o elevado preço comercial dos antimicrobianos, de modo geral, já que deve haver uma compensação para o tempo de aproximadamente uma década e meia e os vários bilhões de dólares gastos para inserção desses fármacos no mercado (Spellberg et al. 2004; Projan 2003; Bérdy 2012). Há ainda o problema dos altos níveis plasmáticos necessários para a ação de certos antimicrobianos, o que promove efeitos colaterais indesejados, e que dificulta ainda mais a condução do

tratamento (Marra 2011). Em segundo lugar, as exigências cada vez mais restritivas, a burocracia, a ausência de claridade e uniformidade nas circunstâncias necessárias para licenciamento e aprovação de medicamentos pelas agências e órgãos encarregados paralisam todo o processo de desenvolvimento dessas drogas, especialmente nos ensaios clínicos, encarecidos em demasia pela imposição da necessidade de um grande número de pacientes (Piddock 2012).

As alterações estruturais em classes pré-existentes, a geração de um vasto número de análogos e a explosão de bibliotecas de compostos gerados por química combinatória não trouxeram significativos avanços na procura por antimicrobianos nos últimos anos. Mais desapontador ainda foi o fracasso da "promessa da genômica". Com um número crescente de genomas bacterianos sendo sequenciados, idealizou-se que milhares de inéditos alvos para ação dessas drogas seriam elucidados o que promoveu ostensiva dedicação na caça pelos mesmos desde meados da década de 1990. Várias companhias farmacêuticas investiram pesadamente em amplos programas de sequenciamento de genomas microbianos, reestruturando seus programas de seleção de antimicrobianos para maximizar o uso da até então inédita tecnologia. Entretanto, até hoje, nenhum resultado com o impacto imaginado foi adquirido exclusivamente por essa estratégia (Cassel & Mekalanos 2001; Coates et al. 2002; Freiberg & Brotz-Oesterhelt 2005; Overbye & Barrett 2005).

A demanda por novos antitumorais é um dos objetivos prioritários na quimioterapia, devido a várias razões, sendo a primária também o desenvolvimento de resistência intrínseca ou adquirida dos tumores a múltiplos desses medicamentos. A alta toxicidade relacionada com esses fármacos, seus indesejáveis efeitos colaterais, e a urgência por antineoplásicos eficazes para tumores até então intratáveis são alguns desses outros motivos (Olano et al. 2009a). Braña & Sánchez-Migallón (2006) estabelecem que os principais desafios para o desenvolvimento de drogas voltadas para o câncer: (i) a existência de mais de 200 diferentes tipos da doença; (ii) a etiologia da afecção muitas vezes é desconhecida; (iii) é laborioso obter padrões de seletividade para o novo medicamento; (iv) o aparecimento prematuro de resistência é um fenômeno comum; e (v) normalmente modelos pré-clínicos não são comparáveis com os reais.

O NCI (*National Cancer Institute*) dos EUA tem sido a maior organização encarregada pela descoberta e desenvolvimento de potenciais fármacos para o tratamento do câncer, especialmente a partir de produtos naturais. Desde a década de 1960 em uma iniciativa com o Departamento de Agricultura do governo americano, coleções de organismos marinhos e plantas terrestres de todo o mundo têm sido avaliados em uma tática de triagem

que parte de testes em modelos murinos de tumores *in vivo* até etapas que englobam um painel de diferentes linhagens tumorais humanas, com a ulterior averiguação da toxicidade em animais. Esse método rendeu agentes citotóxicos com excelentes atividades frente a uma variedade de leucemias, linfomas e neoplasias pediátricas (Schwartsmann et al. 1988; Schwartsmann 2002). Durante as décadas de 1970 e 1980, o NCI dominou a pesquisa na área, principalmente porque havia a colaboração de poucos participantes da indústria e da reputação do alto risco e baixa eficácia da empreitada. Apenas 10% dos novos fármacos que foram para os ensaios clínicos entre 1970 e 1990 receberam aprovação do FDA (*Food Drug Administration*) para comercialização (Chabner & Roberts Jr. 2005)

A estratégia em vigor para a seleção de drogas anticâncer recentemente evoluiu das triagens baseadas na análise de efeitos antiproliferativos celulares para uma abordagem mais mecânica na qual se almeja sítios ou reações bioquímicas responsáveis pelo nascimento e sustento do fenótipo maligno das diversas formas de câncer, isto é, encontrar drogas que inibissem alvos moleculares únicos. A indústria farmacêutica e instituições com amplos bancos de compostos semi-sintéticos foram os que primordialmente alternaram para essa classe de ensaios bioquímicos direcionados. Essa tática que teve sua ascensão no fim da última década do século passado obteve certo sucesso para alguns neoplasmas de difícil tratamento, como o melanoma e o câncer de pulmão. Contudo, possui suas desvantagens, e somente a compreensão biológica global da patogênese dessas doenças possibilitarão que essa abordagem seja mais proveitosa (Balis 2002; DeVita & Rosenberg 2012; Burger & Fiebig 2014).

A proporção de novos quimioterápicos antineoplásicos tem decrescido regularmente na última década. Somente um composto foi aprovado para aplicação clínica em 2008 e os agentes liberados nos últimos anos eram anticorpos ou não representavam nenhuma direção promissora no desenvolvimento de antitumorais. Drogas citotóxicas podem ser encaradas como obsoletas, de uso limitado e com baixa eficácia em vista de sua toxicidade. No entanto, é urgente uma reavaliação da esmagadora ênfase baseada em conhecimentos moleculares e genômicos e encontrar melhores caminhos para proceder com o mais adequado emprego dos novos e existentes fármacos citotóxicos. Uma associação das clássicas, alternativas e correntes abordagens acarretará em avanços apreciáveis no tratamento do câncer (Hambley 2009). Aproximadamente 50% de todos os atuais compostos antitumorais desde 1940 são produtos naturais ou derivados dos mesmos e essa constatação demonstra que é seguro prosseguir investindo nesses metabólitos secundários para a seleção dessa classe de medicamentos (Kinghorn et al. 2009).

Com o processo industrial de seleção de novos antimicrobianos e antitumorais estagnado, a academia, pequenas instituições de biotecnologia e outras sem fins lucrativos têm se sobressaído no campo, com uma coleção vasta de antibióticos em desenvolvimento, especialmente de origem microbiana. O problema é a falta de capital suficiente para prosseguir as pesquisas para outros patamares, que permitam que o propósito da droga ser aplicada terapeuticamente ganhe consistência. Diante disso, é totalmente justificável a indispensabilidade de uma associação entre essas organizações e as influentes companhias farmacêuticas. Enquanto, a academia e esses institutos se concentrariam em adequar as modernas tecnologias e identificar alvos moleculares, a indústria se encarregaria no aprimoramento e avaliação dos candidatos a fármacos. Não há um local mais fértil do que os laboratórios de pesquisa nas universidades para o surgimento de ideias inovadoras que podem no futuro suscitar no salvamento de milhares de vidas (Norrby et al. 2005; Barrett 2005; Frearson & Wyatt 2010). Recentemente, antibióticos voltados para tratamento de infecções por bactérias gram-positivas, especialmente MRSA, têm provado ser comercialmente atrativos e encorajado o retorno da indústria farmacêutica para o campo, o que foi demonstrado com o êxito financeiro da linezolida da Pfizer seguido da daptomicina da Cubster (Theuretzbacher 2009).

Atualmente, esse potencial de descoberta de novas moléculas bioativas microbianas pode ser investigado principalmente pela combinação de inúmeras e estabelecidas ferramentas e modernas e analíticas tecnologias das "-ômicas" em combinação com os processos tradicionais de *screening*, os quais não podem ser abandonados por completo. Sob esse referencial, as actinobactérias constituem o grupo mais prolífico de micro-organismos na geração de antibióticos, sendo as responsáveis por uma significativa porção das drogas antimicrobianas e citotóxicas já comercializadas. A constatação de que uma parcela ínfima de micro-organismos presentes no ambiente foi isolada e caracterizada quanto à produção de compostos bioativos e as projeções de que o número de antibióticos a serem ainda detectados está na ordem de 10^5 apenas evidenciam que esses procariotos constituem a chave futura para uma renascença na descoberta de novos produtos naturais microbianos, que nos possibilite continuar lutando contra as infecções e o câncer (Peláez 2006; Baltz 2008; Muller & Wink 2014).

1.6 Habitats

1.6.1 Cerrado

O Cerrado é o segundo maior domínio fitogeográfico do Brasil, abrangendo uma área de aproximadamente dois milhões de km^2 do Planalto Central, equivalente a aproximadamente 24% do território nacional. Estende-se regionalmente desde as margens da Floresta Amazônica até os estados de São Paulo e Paraná (Figura 8) além de abrigar as três maiores bacias hidrográficas da América do Sul, Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata, resultando em um elevado potencial aquífero o que favorece a sua biodiversidade (Bustamante et al. 2012; Ratter et al. 1997; MMA 2015).

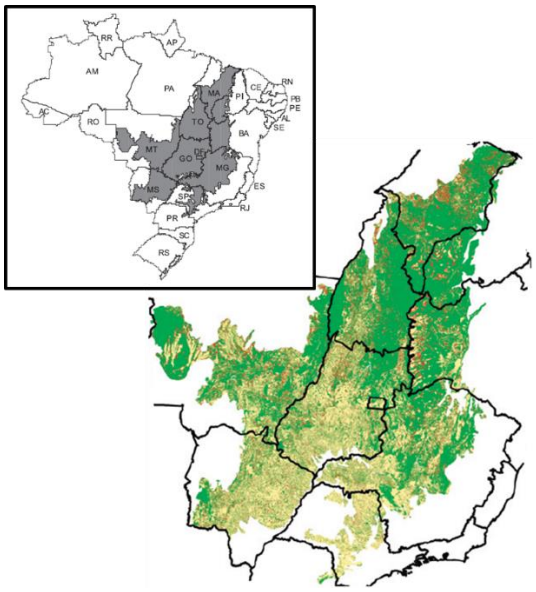


Figura 8 – Distribuição geográfica do Cerrado brasileiro (Adaptado de Sano et al. 2008 e Loarie et al. 2011).

Considerado um complexo de diversos biomas, o Cerrado apresenta um mosaico de fisionomias, um aspecto comum a todas as savanas tropicais do mundo. Assim, conforme a classificação de Coutinho (1978), esse domínio possui três diferentes fitofisionomias, que variam em termos de estrutura, composição e deciduidade: a campestre (campo limpo), a savânica (campo sujo, campo cerrado e cerrado *sensu stricto*) e a florestal (cerradão), constituída por florestas tropicais estacionais escleromorfas e semidecíduas mais abertas, arvoredos ou "*woodlands*" (savana florestada) (Batalha 2011; Coutinho 2006). A origem de tamanha heterogeneidade pode ter sido resultante tanto da ação antropogênica, caracterizada pelo desenvolvimento de florestas secas em vista da influência gradativa de queimadas,

quanto em uma formação natural, explicada por uma adaptação climática continuada através dos tempos, evidenciada por certos estudos paleontológicos (Oliveira & Marquis 2002; Pinheiro & Monteiro 2010).

O clima predominante no Cerrado exibe uma estação seca, com três a sete meses de duração (geralmente entre abril e setembro), e outra de chuvas constantes (entre outubro e abril), com uma pluviosidade média anual na faixa de 800-1.800 mm, temperatura média anual entre 20°C e 27°C e médias anuais de umidade relativa do ar de, aproximadamente, 60%. O relevo é marcado por intercalações de planaltos (as chapadas), depressões e planícies (Pereira et al. 2011).

De modo amplo, o solo é distrófico, com baixos níveis de pH e teores extremamente baixos de cálcio e magnésio e uma alta saturação por alumínio e elevado potencial de fixação de fósforo. A maioria dos solos constitui-se de latossolos significativamente intemperizados e podzólicos, com sérias limitações na produção de alimentos, no que diz respeito à baixa fertilidade natural do solo. A inferior capacidade de retenção de água ainda é outro fator limitante e é importante ressaltar que a vegetação é intolerável a alagamentos (Lopes & Guilherme 1994; Ratter et al. 1997).

O Cerrado concentra um terço da biodiversidade nacional e aproximadamente 5% da flora e fauna mundiais. Em vista da expansão agrícola que moldou a economia da região ocupada por esse domínio, em conjunto com a tomada tardia de estratégias adequadas de conservação, o Cerrado acabou sendo considerado um dos centros prioritários para a preservação da biodiversidade mundial (Myers et al. 2000; Klink & Machado 2005; Moysés & Silva 2008). Dentre as principais ameaças, pode-se citar o desflorestamento, queimadas e gramíneas invasoras, todos relacionados à desenfreada ocupação da terra nas margens de áreas naturais (Durigan et al. 2007).

É relativamente escassa a literatura científica em torno da caracterização da pluralidade microbiana do Cerrado. Atualmente, os primeiros estudos com o emprego de métodos independentes de cultivo estão sendo conduzidos para conhecimento estrutural das comunidades bacterianas associadas a esse domínio fitogeográfico (Quirino et al. 2009). Estudos prévios já tentavam estimar a porcentagem de membros do táxon *Actinobacteria* em solos desse complexo fitofisionômico. Em solos de Cerrado com vegetação nativa, a ocorrência de populações de actinobactérias pode ser superior a 75%, com predominância do gênero *Streptomyces* (Pereira et al. 1999). Araújo et al. (2012), em um trabalho pioneiro de caracterização de comunidades bacterianas no solo das quatro representativas fitofisionomias, comprovaram que *Actinobacteria* era o quarto filo em predominância. Recentemente, Silva et

al. (2013) isolaram um total de 2512 actinobactérias de três diferentes locais no interior de Minas Gerais, com a identificação de nove gêneros e 92 espécies distintas nas estações de seca e chuva, incluindo muitas cujo relato da presença nesse tipo de ambiente não havia sido descrito.

1.6.2 Manguezal

Os manguezais (“mangue”, “mangal”) são ecossistemas costeiros típicos de áreas estuarinas, de transição entre os ambientes terrestres e marinhos, em regiões costeiras tropicais e subtropicais (Schaeffer-Novelli 2002). O manguezal brasileiro é um dos ecossistemas formadores do bioma Mata Atlântica e encobre desde a foz do rio Oiapoque no Amapá até a cidade de Laguna em Santa Catarina (Figura 9), abrangendo assim aproximadamente 1.225.444 hectares em quase todo o litoral do Brasil (SEMADS 2001; MMA 2015).

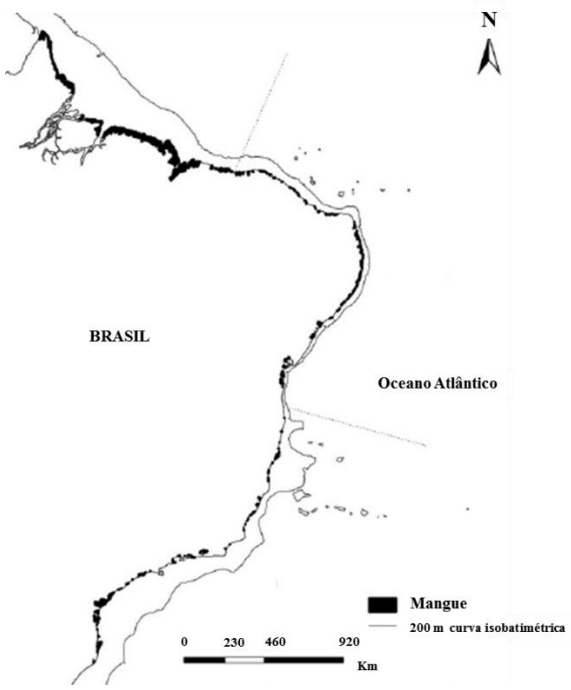


Figura 9 – Distribuição geográfica do manguezal brasileiro (Adaptado de Magris & Barreto 2010).

O manguezal pode ser considerado um ambiente naturalmente estressado, devido às condições ambientais no qual se desenvolve, tais como salinidade do sedimento que impede a obtenção de água doce, fluxo das marés que removem energia potencial armazenada na forma de detritos orgânicos, processos geomorfológicos costeiros que podem causar erosão

e/ou deposição de sedimentos e tempestades que podem promover a perda de componentes estruturais do sistema. A temperatura ideal para a existência desses ecossistemas em meses mais quentes é acima de 25ºC. Os sedimentos lodosos constituem o principal substrato para o desenvolvimento do mangue, com a possibilidade do estabelecimento de florestas com até 45 m de altura. Basicamente, as marés ditam às amplas variações nos níveis de salinidade e disponibilidade de nutrientes, tornando a vida nesse ecossistema se organizar de modo tão único e peculiar (Lugo 1980; Blasco et al. 1996; Dias et al. 2009).

As fitofisionomias do mangue brasileiro podem ser resumidas em duas categorias básicas: águas ribeiras, que ocupam a região do litoral e ocorrem em estuários, baías e formam as ilhas costeiras; e as florestas de bacia, não tão expostas às marés e, assim, desenvolvem-se em dependência exclusiva de chuvas e escoamento de água da costa. Esses padrões encontrados explicam os mecanismos de adaptação diferentes dos organismos característicos de cada área, e são diretamente relacionados com a frequência e duração dos regimes de marés (Ball 1988; Schaeffer-Novelli et al. 2000).

Os solos são singularmente salinos, anóxicos, ácidos e comumente encontram-se alagados. No geral, a matéria orgânica tem sua origem na queda de material vegetal e no elevado nível de alocação de carbono nas raízes das plantas, propiciando as condições necessárias para a colonização dos micro-organismos residentes, que ativamente decompõem esses restos de plantas e proporcionam detritos que servem depois como uma das principais fontes de nutrientes no ecossistema. Ademais, divergências quanto à capacidade de absorção desses nutrientes pelos sistemas radiculares das diferentes espécies vegetais nativas que torna variável os níveis de enxofre, matéria orgânica, metais-traços e o estado redox do solo e, consequentemente, altera a disponibilidade nutricional que torna esse ecossistema tão produtivo (Lacerda et al. 1995; Holguin et al. 2001; Reef et al. 2010).

Uma das mais importantes características dos manguezais é a de fornecer um mecanismo de aprisionamento de sedimento, o qual é introduzido principalmente por processos hidrodinâmicos, como despejo de material degradado, vazão dos rios, e ressuspensão do sedimento do fundo do mar por ondas e embarcações. As árvores capturam o sedimento por meio de sua complexa estrutura radicular e esse não retorna para os oceanos, em vista das correntes marítimas serem muito lentas por causa da elevada densidade vegetal (Furukawa & Wolanski 1996; Kathiresan & Bingham 2001). Diferentemente da maior parte dos solos, o sedimento do mangue são predominantemente e persistentemente anaeróbios (Ghizelini et al. 2012). E sob essas condições, que uma microbiota extremamente dinâmica se estabelece, sendo responsável pelos ciclos biogeoquímicos e fornecimento primário de

nutrientes para plantas e animais, ou seja, a diversidade microbiana associada a esses sedimentos são fundamentais para a produtividade, conservação e recuperação dos mangues (Andreote et al. 2012).

Com uma fauna e flora extremamente diversa e um microbioma ainda não plenamente investigado e tão crucial para sua manutenção, os manguezais têm constituído alvos cruciais para a conservação ambiental. As razões centrais para a perda nas áreas costeiras são a pressão urbana e industrial, extração de árvores nativas, agricultura e produção de sal, mineração e instalação da aquicultura. O desmatamento e a poluição por derramamento de óleo comprometem assim a capacidade dual desses ecossistemas de constituírem em um filtro do CO_2 atmosférico e fonte essencial de carbono oceânico, provocando uma desestruturação das cadeias alimentares tanto marítimas quanto terrestres, bem como afeta a produtividade primária, o que se evidencia duplamente em impactos ambiental e socioeconômico (Lee 1999; Macintosh et al. 2002; Duke et al. 2007).

Pouco ainda é conhecido sobre a diversidade estrutural de comunidades microbianas em mangues. Já foi determinado que a densidade populacional de actinobactérias é bem menor em sedimentos marinhos em relação aos solos terrestres. A geração de enzimas extracelulares de bactérias desse filo associadas a sedimentos e moluscos tem sido pesquisada, principalmente por elas desempenharem funções vitais no ambiente marinho. As mudanças constantes no fluxo de marés e salinidade desses ecossistemas são a força motriz evolutiva para as adaptações metabólicas que poderiam levar a produção de biomacromoléculas microbianos incomuns. Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm descoberto novas e amplas populações de actinobactérias nesses ecossistemas e a bioprospecção de compostos bioativos desses procariotos tem revelado uma pluralidade que converte os manguezais em locais prósperos para a procura por esses produtos naturais (Hong et al. 2009; Sahoo & Dhal 2009; Lee et al. 2014).

1.6.3 *Azadirachta indica* A. JUSS (Neem)

Azadirachta indica (do persa antigo, “*azad*”, livre; “*darakhat*”, árvore; “*hind*”, Índia) A. JUSS, popularmente denominada como “Neem”, “Nim” ou como “margosa”, é uma planta nativa do subcontinente indiano e amplamente cultivada em países tropicais e subtropicais, conhecida a mais de 2.000 anos por suas numerosas propriedades medicinais. Taxonomicamente está situada na ordem Rutales, subordem Rutinae, família Meliaceae, subfamília Melioideae, tribo Melieae. Em sua fase madura, caracteriza-se como uma árvore

que pode atingir até 12 a 15 metros de altura e uma circunferência de 2,5 metros, com troncos retos e longos ramos que se espalham em uma coroa ampla (Figura 10). A frutificação começa após 3 a 5 anos e a planta se torna altamente produtiva em aproximadamente 10 anos. O Neem é extremamente adaptável, podendo ser cultivado em solos rasos e pedregosos e até mesmo com um alto conteúdo de calcário e elevada acidez. É capaz de florescer em condições de pluviosidade mínima, em climas desde relativamente secos até aqueles com temperaturas próximas a 0ºC e em altitudes de até 1.500 m. A árvore pode viver cerca de dois séculos (Biswas et al. 2002; Puri 2003; Girish & Shankara Bhat 2008; Hashmat et al. 2012).

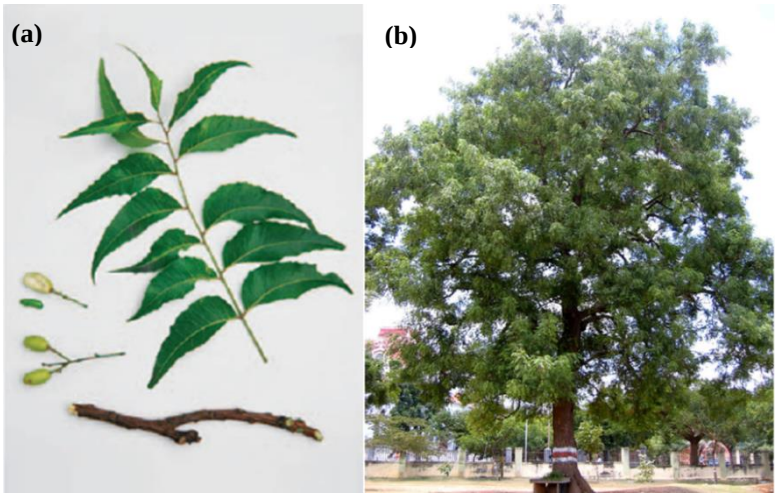


Figura 10 – *Azadirachta indica* A. JUSS: **(a)** folhas, galhos e sementes; **(b)** árvore (Adaptado de Girish & Shankara Bhat 2008 e Veitch et al. 2008).

Praticamente todas as partes da planta têm sido empregadas na medicina tradicional e para a confecção de medicamentos caseiros. O óleo de Neem é correntemente utilizado para tratamento e controle de hanseaníase e helmintíases, os extratos das folhas são aplicados na recuperação de quadros de malária, anorexia, desordens biliares, úlceras de pele e problemas visuais e as propriedades analgésicas e antipiréticas da casca da árvore são reconhecidas há séculos (Brahmachari 2004; Veitch et al. 2008). O efeito praguicida de extratos oriundos de sementes e folhas também é bem conhecido, devido à presença de compostos com atividade de inibição nutritiva e de interferência em certos hormônios dos insetos. Biopesticidas originados de Neem são inclusive recomendados por vários programas de controle de pragas agrícolas em vista de não serem ecologicamente danosos e da possibilidade de combiná-los com outros agentes biológicos dessa classe (Schmutterer 1990; Boeke et al. 2004; Senthil-Nathan 2013). A casca da angiosperma também possui potencialidade para biorremediação como, por exemplo, na remoção de resíduos corantes

têxteis sintéticos, ação bioabsorvente de metais pesados tóxicos, como Cd^{2+}, Hg^{2+} e Cr^{3+} em baixas concentrações e até mesmo na remoção de amônia de água salobra (Mossini & Kemmelmeier 2005).

O isolamento e caracterização química dos constituintes bioativos de *A. indica* se iniciaram na década de 1940, com a identificação da nimbina, nimbidina e nimbinina do óleo bruto da planta. Com o advento do HPLC (*high performance liquid chromatography*), ressonância magnética nuclear e análise de raio-X, uma gama ampla de novas entidades químicas e suas respectivas atividades biológicas foram elucidadas, essencialmente compostos da classe dos terpenóides oxigenados, tipicamente encontrados em plantas da família Meliaceae. O exemplo mais famoso é a azadiractina, um esteróide limonóide presente nas folhas, frutas e sementes que apresenta um efeito antialimentar impressionante, com duração de até duas semanas, além de agir como desinfetante, pesticida e antimalárico. Mais de 300 compostos bioativos já foram isolados de todas as partes da planta e a lista dessas substâncias apenas aumenta a cada ano (Koul et al. 1990; Akhila & Rani 1999; Neves et al. 2005; Hummel et al. 2012).

Uma parcela considerável dos trabalhos voltados para a avaliação da atividade antimicrobiana do Neem tem focado especificamente em patógenos de interesse veterinário e agrícola. Extratos das folhas e o óleo de diversas partes da planta são efetivos *in vitro* frente a alguns fungos de importância clínica humana, como algumas espécies de dermatófitos e *Candida*; bactérias gram-positivas, gram-negativas, *M. tuberculosis* e cepas resistentes a estreptomicina; e ação antiviral contra o vírus Vaccinia, Chikungunya e do sarampo (Conventry & Allan 2001; Biswas et al. 2002). As propriedades antineoplásicas do Neem também vêem sendo investigadas na última década, principalmente pelo reconhecimento de que o uso regular da planta e seus preparados previnem o desencadeamento do câncer via modulação de múltiplos processos celulares, como a inibição da proliferação, redução do estresse oxidativo, detoxificação de enzimas carcinogênicas e indução da apoptose e outras formas de morte celular, atenuação da angiogênese e estímulo da resposta imune aos tumores (Paul et al. 2011; Hao et al. 2014).

A exploração sistemática de micro-organismos endofíticos de Neem tem sido reportada nos últimos anos. Todavia, a maioria desses estudos está concentrada no isolamento e o padrão de ocorrência de fungos (preponderantemente anamorfos) ao longo do vegetal, com ausência de uma abordagem de varredura do potencial biotecnológico dos mesmos. Presentemente, micro-organismos endofíticos são estimados como uma das fontes mais valiosas de novos metabólitos secundários, uma vez que ocupam milhares de únicos nichos

ecológicos presentes nos mais incomuns ambientes: as plantas superiores. Além disso, vários produtos naturais anteriormente acreditados como tendo sua origem no vegetal são na realidade microbianos, e esses originalmente exercem papel essencial de proteção na relação mutualística procarioto-eucarioto. Sob esse contexto, é pertinente a pesquisa continuada para obtenção de um panorama completo da composição endofítica de *A. indica* e, a partir daí, articular uma investigação de moléculas bioativas desses micro-organismos e saber se as mesmas sinalizam serem tão promissoras quanto as substâncias da planta que eles habitam (Rajagopal & Suryanarayanan 2000; Strobel & Daisy 2003; Mahesh et al. 2005; Verma et al. 2007; Verma et al. 2011).

2 JUSTIFICATIVA

As infecções por patógenos microbianos multirresistentes constituem um dos maiores problemas de saúde pública contemporaneamente. Esses micro-organismos se dispersaram de todas as formas possíveis e gradativamente evadiram e subsistiram às principais opções empregadas para combatê-los: os antimicrobianos. Enquanto, novas drogas hábeis a nos tornar páreos frente a esses organismos não serem desenvolvidas, vivenciaremos o auge do retorno a uma obscura "era pré-antibiótica".

Milhares de vidas são vitimadas pelo câncer, um conjunto de doenças que ainda permanece um enorme desafio para a medicina moderna. Sofisticados e eficientes modos de tratamento existem e são úteis, contudo as neoplasias malignas ainda se mantêm como um dos grandes temores da sociedade. Compostos farmacêuticos originais são necessários à medida que a biologia dessas doenças permaneça em investigação para que assim possamos plenamente compreendê-las.

Historicamente, o filo *Actinobacteria* é o maior provedor de metabólitos com uma ampla gama de atividades farmacológicas. Essas biomoléculas operam na manutenção do ciclo de vida desses procariotos nos ambientes naturais em que vivem, tanto ecológica quanto fisiologicamente, bem como moldaram a evolução dos seres que as produzem. Tradicionalmente, o isolamento desses micro-organismos e sistemas de triagens biológicas quanto à geração de compostos ativos veem sendo executados em laboratórios de pesquisa na academia, consistindo em uma elementar, imprescindível e rica etapa para a detecção de potenciais candidatos a novos fármacos.

A proposta do presente estudo é adotar a abordagem clássica de exploração desses micro-organismos derivados de diversos habitats para prospectar profícuos produtores de antibióticos. Dessa maneira, por meio de ensaios *in vitro* fenotípicos simples e objetivos, será avaliado o potencial antimicrobiano e citotóxico dos produtos metabólicos dessas bactérias, a fim de evidenciar o seu importante papel na descoberta de promissoras alternativas terapêuticas para duas das principais causas de morte no planeta: as doenças infecciosas e as neoplasias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Analisar as potenciais atividades antimicrobiana e citotóxica de biomoléculas produzidas por actinobactérias isoladas de diferentes habitats.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar actinobactérias do solo do Cerrado goiano;

- Selecionar as actinobactérias com potencial de produção de biomoléculas com atividade antimicrobiana por meio de ensaios primários de triagem frente a diferentes micro-organismos indicadores;

- Produzir e extrair os metabólitos bioativos dos isolados;

- Efetuar testes para verificação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos frente *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA);

- Determinar a ação lítica das biomoléculas presentes nos extratos brutos sobre a parede celular bacteriana;

- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos brutos por meio do emprego de *Artemia salina* como organismo-teste;

- Examinar o potencial antitumoral dos extratos por meio da constatação da capacidade de intercalação dos metabólitos sobre a molécula de DNA;

- Caracterizar os isolados de actinobactérias nos níveis taxonômicos: morfológico, fisiológico/bioquímico e molecular.

4 MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB), do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG). As composições químicas e orientações quanto ao preparo dos meios de cultura e as demais soluções empregadas no trabalho estão detalhadas nos Anexos IA e IB, respectivamente.

4.1 Isolamento e seleção das actinobactérias

4.1.1 Coleta e pré-tratamento das amostras ambientais

Um total de dez amostras de solo foi coletado em diferentes locais do Cerrado goiano entre os meses de março e abril de 2013. As amostras foram coletadas a uma profundidade de 0 a 10 cm com auxílio de pás para jardinagem (superficialmente desinfestadas com uma solução de etanol a 70%) transferidas para bolsas plásticas, e encaminhadas imediatamente ao LAMAB. O solo da mata do Bosque Auguste Saint-Hilaire do Campus Samambaia da UFG foi selecionado, aleatoriamente, dentre as outras amostras para o isolamento de actinobactérias. As coordenadas geográficas desse local de origem estão expostas abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 – Local de origem da amostra de solo selecionada para isolamento microbiano.

Procedência da amostra	**Coordenadas geográficas**	
	Latitude	**Longitude**
Bosque Auguste Saint-Hilaire	16°36’20’’S	49°15’48’’O

A amostra foi submetida a um pré-tratamento que consistiu na dessecação em estufa a 80ºC durante 48 h, seguida da separação manual de detritos e fragmentos vegetais. O solo já seco foi peneirado e novamente transferido para o interior de uma nova bolsa plástica a qual foi armazenada em freezer a –20ºC até proceder-se com o isolamento microbiano. Esse procedimento de pré-tratamento foi utilizado também nas demais amostras para uso futuro.

4.1.2 Isolamento de *Actinoplanetes*

O método quimiotático de Palleroni (1980) foi adotado para isolamento seletivo das actinobactérias do grupo *Actinoplanetes*. Foi utilizado o ágar AC (Kuster & Williams 1964) para isolamento e nas etapas de purificação das colônias crescidas. Já na finalização da purificação, esporulação e manutenção dos isolados, foi empregado o ágar extrato de levedura-extrato de malte (ISP-2), segundo Shirling & Gottlieb (1966).

O isolamento foi realizado nas seguintes etapas: primeiramente, uma câmara específica (Palleroni 1976a), composta por dois compartimentos cilíndricos interligados por um canal (Figura 11), foi exposta à radiação ultravioleta (UV) no interior de uma minicâmara durante 30 minutos para esterilização. Em seguida, o solo pré-tratado (0,5 g) foi depositado em cada um desses compartimentos. Água destilada esterilizada foi então adicionada até o nível de 2,0 mm acima do canal de conexão. A câmara foi posta no interior de uma placa de Petri esterilizada e incubada a 28-30ºC por 1 h. Essa etapa foi necessária para a indução da motilidade e liberação dos esporos de *Actinoplanetes* a partir de esporângios maduros.

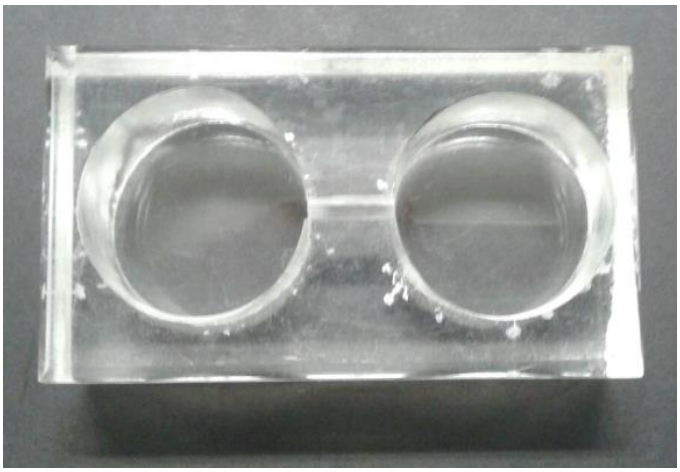


Figura 11 – Câmara de isolamento de actinobactérias do gênero *Actinoplanes* segundo o método de Palleroni (1976a).

Após o período de incubação, um tubo capilar do tipo micro-hematócrito esterilizado contendo uma solução xilose em tampão fosfato (0,56 g/dL:0,6 g/dL) a 10 mM (pH 7,0) foi inserido, por meio de uma pinça esterilizada, no canal de conexão de modo a cobrir toda sua extensão. A câmara foi novamente incubada a 28-30ºC por 1 h.

Foram adotadas duas formas de inoculação no meio de cultivo sólido. Na primeira, o capilar foi removido e lavado externamente com água destilada esterilizada, conforme proposto por Palleroni (1976a), e o conteúdo presente no mesmo foi vertido no

interior de microtubos de tipo Eppendorf previamente preenchidos com um 1,0 mL de água esterilizada. 200 µL dessa solução foram transferidos para a superfície do ágar AC. Da segunda forma, o tubo capilar foi aplicado diretamente no meio de cultura, de modo que o concentrado presente em seu interior escoasse para o ágar. A semeadura em ambas as formas foi completada por espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski.

As placas foram incubadas a 30ºC, por 7 a 14 dias, para o crescimento microbiano, em contínuo monitoramento do cultivo. As colônias características de actinobactérias foram selecionadas e semeadas em novo ágar AC, com mais uma etapa de incubação. Esse processo foi repetido por mais duas vezes até se ter certeza da ausência de contaminação e começo da esporulação dos prováveis isolados, utilizando-se a partir de então o ágar ISP-2 e o modo de semeadura "em tapete". Subsequentemente a mais três rodadas de repique nesse meio, a pureza dos micro-organismos foi assegurada através da análise de caracteres macroscópicos típicos de morfoespécies de actinobactérias, detectáveis principalmente depois de completa esporulação.

4.1.3 Preservação dos isolados microbianos

Para a preservação, os isolados de actinobactérias, já purificados, foram crescidos em ágar ISP-2 a 30ºC durante 14 dias, com o repique efetuado na forma de "tapete". Após esse período, as colônias foram lavadas com 10 mL de uma solução esterilizada de glicerol a 20% para desprendimento dos esporos. Com o auxílio de ponteiras de 1000 µL cortadas em sua extremidade, o conteúdo da suspensão formada foi fracionado em alíquotas de 2,0 mL em microtubos criogênicos esterilizados. O material foi então armazenado a –20ºC.

4.1.4 Seleção de outros isolados de actinobactérias

Um conjunto de nove morfoespécies de actinobactérias pertencentes à bacterioteca do LAMAB foi selecionado e adicionado ao estudo. Quatro desses isolados não haviam sido caracterizados quanto a sua possível atividade antibiótica e os demais somente foram parcialmente avaliados quanto a esse potencial em estudos prévios realizados no LAMAB (Vieira 1999; Lima 2007; Rodrigues 2009). É importante salientar que essas morfoespécies não foram plenamente caracterizadas taxonomicamente. Na Tabela 2 estão listados esses isolados, com seu local de origem, significado de sua denominação (identificação da sigla), além da divisão daqueles que anteriormente não haviam sido

submetidos a um processo de bioprospecção direcionada para a produção de biomoléculas com ação antibiótica e os que já foram testados em parte com esse objetivo.

Tabela 2 – Relação das morfoespécies de actinobactérias selecionadas para o estudo: identificação (significado da sigla), origem, responsável pela avaliação parcial da ação antibiótica.

Morfoespécie	Identificação	Origem	Avaliação anterior parcial
NÃO AVALIADAS			
ADU 2.4	Associação dos Docentes da UFG	Solo/Cerrado	–
GUARA 1	Relativo à Guarapari (ES)	Sedimento/Mangue	–
VAL 1	Relativo à "Valéria"	Solo/Cerrado	–
VIA 1	Relativo à Vianópolis	Solo/Cerrado	–
AVALIADAS PARCIALMENTE			
ADU 1.3	Associação dos Docentes da UFG	Solo/Cerrado	Vieira 1999; Rodrigues 2009
ADU 2.2	Associação dos Docentes da UFG	Solo/Cerrado	Vieira 1999; Rodrigues 2009
PEG 23	Parque Ecológico de Goiânia	Solo/Cerrado	Vieira 1999; Rodrigues 2009
PEG 30	Parque Ecológico de Goiânia	Solo/Cerrado	Vieira 1999; Lima 2007
NIM 1	Relativo à planta "Neem" (*Azadirachta indica*)	Planta/Cerrado	Rodrigues 2009

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de actinobactérias

Uma triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias foi executada com o objetivo de verificar diretamente o espectro de ação antibiótica desses micro-organismos frente a: bactérias gram-positivas e gram-negativas; e fungos leveduriformes e filamentosos (Tabela 3). As cepas bacterianas e leveduriforme pertencem a bacterioteca do LAMAB e todas se encontram preservadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a 20% de glicerol a –20ºC. Os fungos filamentosos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Micologia do IPTSP/UFG e foram armazenados em tubos com ágar Sabourad-Dextrose (SDA) inclinado sob refrigeração (4ºC).

Tabela 3 – Relação dos micro-organismos indicadores empregados na triagem primária da atividade antimicrobiana dos isolados de actinobactérias.

BACTÉRIAS	
Gram-positivas	**Gram-negativas**
Staphylococcus aureus ATCC 25923	*Escherichia coli* ATCC 25922
Kocuria rhizophila ATCC 9341	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063
Enterococcus faecalis ATCC 29212	*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032	*Serratia marcescens* ATCC 14576
Bacillus cereus ATCC 14579	*Salmonella typhi* sorovar.Typhimurium ATCC 14028
Bacillus subtilis ATCC 6633	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
FUNGOS	
Leveduriforme	**Filamentosos**
Candida albicans ATCC 10231	*Aspergillus niger* 1218
	Aspergillus flavus 1218
	Penicillium sp. 1218

A avaliação da atividade antibiótica direta das morfoespécies de actinobactérias frente aos micro-organismos indicadores foi realizada por meio de uma adaptação do método de disco-difusão ou técnica de Kirby-Bauer para determinação da suscetibilidade microbiana a compostos antimicrobianos (CLSI 2014). Assim, inicialmente, as cepas bacterianas e a amostra leveduriforme foram inoculadas em caldo BHI e incubadas à 30ºC por 24 h. Em seguida, os micro-organismos foram semeados por esgotamento em ágar nutriente e novamente incubados nas mesmas condições anteriores. Colônias foram selecionadas após essa última etapa de incubação, as quais foram transferidas para tubos com solução salina a 0,85% esterilizada. Os inóculos foram ressuspensos e ajustados até atingirem a turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Para os fungos filamentosos, os mesmos foram crescidos em SDA por 15-30 dias. Após o crescimento, as placas foram raspadas e o material transferido para tubos com solução salina a 0,85% esterilizada. Essa suspensão foi padronizada a uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

O conteúdo das soluções foi semeado com *swabs* esterilizados em toda a superfície do ágar Mueller-Hinton. Em vista do número de morfoespécies a serem analisadas, cada micro-organismo indicador foi semeado em duas placas de Petri de tamanho adequado (90 x 15 mm) com ágar Mueller-Hinton já vertido.

A adequação do método clássico do antibiograma consistiu na utilização da técnica de *plugs* ou "método do bloco de gelose" (Ichikawa et al. 1971). A mesma consiste no corte, com o auxílio de um perfurador metálico esterilizado, da superfície do ágar ISP-2 (volume mínimo de 30 mL de meio por placa de tamanho médio) com o cultivo das actinobactérias já em fase de esporulação (aproximadamente 14 dias de cultivo). Pequenos cilindros de ágar (*plugs*) com 7 a 8 milímetros de diâmetro são gerados, e os mesmos substituem os discos de papel filtro impregnados com concentrações conhecidas dos antimicrobianos no ensaio. Os *plugs* foram dispostos em posições pré-determinadas e equidistantes na superfície do ágar Mueller-Hinton durante todos os testes. Após uma etapa de pré-incubação a temperatura ambiente por 1 h, as placas foram transferidas para estufas microbiológicas a 30ºC por um período de 18-24 h.

A leitura da atividade antimicrobiana consistiu na mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento dos micro-organismos indicadores expostos às actinobactérias. Adotaram-se os parâmetros convencionados por Matsuura (2004) para classificação do grau de ação antagonista, descrita na Tabela 4.

Tabela 4 – Classificação do grau de atividade antimicrobiana em função do diâmetro dos halos de inibição obtidos nos ensaios de triagem da atividade biológica (Adaptado de Matsuura 2004).

Grau de atividade antimicrobiana	Diâmetro dos halos de inibição (em mm)
Ausente	0
Baixa	7 - 10
Moderada	11 -14
Alta	>14

Os isolados com ação inibitória de moderada a alta para a cepa padrão de *S. aureus* e outros micro-organismos indicadores, especialmente as demais bactérias gram-positivas, foram avaliados pela mesma técnica contra MRSA. Foi empregado um total de quatro isolados, identificados pela numeração 6087, 6089, 7903 e 8508. Essas cepas foram gentilmente doadas pela Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar da Fundação Oswaldo Cruz (CCBH/FIOCRUZ). A ficha de solicitação dessas cepas do micro-organismo patogênico está disponível no Anexo II. Os resultados foram lidos como previamente citado e os isolados de actinobactérias com atividade antimicrobiana considerada, no mínimo, moderada (Tabela 4) foram selecionados para os testes de triagem secundária da atividade antimicrobiana e os ensaios para verificação de seu potencial citotóxico.

4.3 Preparo dos extratos orgânicos brutos

Para os isolados selecionados na triagem primária, procedeu-se com a produção e extração dos metabólitos bioativos do cultivo das actinobactérias em meios sólido e líquido.

4.3.1 Extrato derivado do crescimento em meio sólido – ECS

Inicialmente, as actinobactérias foram semeadas em ágar ISP-2 e cultivadas a 30ºC durante 14 dias até a esporulação. Posteriormente, o meio sólido foi fracionado e os fragmentos resultantes foram transferidos para o interior de tubos do tipo Falcon (50 mL) esterilizados. Adicionou-se 15 mL de etanol aos tubos para extração dos metabólitos de interesse.

Os tubos foram agitados manualmente e mantidos sob refrigeração, em repouso, por um período de 24 horas. O conteúdo da solução etanólica derivada foi transferida para outro tubo Falcon e adicionou-se novamente um volume de 15 mL de etanol às frações de ágar. Esse procedimento foi reiterado por mais uma vez e os conteúdos etanólicos obtidos da extração foram reunidos em tubos Falcon. As soluções foram centrifugadas por 10 minutos, a 3.000 rpm sob uma temperatura de 4ºC e o sobrenadante armazenado em freezer a –20ºC.

No Laboratório Multiusuário do curso de Biotecnologia da UFG, a fase líquida das soluções foi concentrada em rota-evaporador sob temperatura de 45-50ºC. Os extratos etanólicos resultantes foram acrescidos de 1,0 mL de etanol e distribuídos em tubos de polipropileno de 2,0 mL, constituindo os extratos brutos oriundos do crescimento em meio sólido (ECS). O material foi armazenado em freezer a –20ºC até a realização dos demais ensaios biológicos.

4.3.2 Extrato derivado do crescimento em meio líquido – ECL

As actinobactérias foram pré-inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 15 mL de caldo ISP-2. Os frascos foram mantidos em *shaker* sob agitação de 130 rpm, a 30ºC por 48 horas. Após esse tempo, um volume 50 mL de caldo ISP-2 novo foi transferido para Erlenmeyers, os quais foram incubados sob as mesmas condições anteriores por 14 dias.

Ao término desse tempo, a fração líquida foi separada da micelial por filtração a vácuo. A massa micelial, retida em papel de filtro (Whatman nº2), foi retirada com o auxílio de uma espátula esterilizada e transferida para tubos tipo Falcon de 15 mL. Um volume de 10

mL de etanol foi adicionado e os tubos foram então submetidos a um banho de ultrassom por 5 minutos. O material obtido foi submetido a uma trituração em gral de vidro com pistilo para rompimento da massa micelial. As amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante transferido para um novo tubo do tipo Falcon de 15 mL, mantido em freezer a –20ºC. Esse processo foi repetido em plicatas.

A porção aquosa (filtrado) foi transferida para funis de separação e submetida à extração por partição líquida-líquida utilizando como extrator o solvente orgânico acetato de etila na proporção 1:1 (v/v). A ampola de extração foi agitada constantemente para promoção da extração das biomoléculas para a fase orgânica. O material foi deixado em repouso até evidente partição e a porção orgânica foi separada em tubos Falcon. Essa fase foi repetida, no mínimo, por três vezes para uma extração completa. As frações foram reunidas, formando os extratos de acetato de etila. Os tubos foram preservados em freezer a –20ºC até a etapa de concentração.

Os extratos de acetato de etila foram concentrados como no processo realizado para o ECS (item 4.3.1). Aos extratos de acetato de etila evaporados foram adicionados os respectivos extratos etanólicos do micélio e ambos foram novamente submetidos ao rota-evaporador. O volume final obtido (5,0 mL) foi ressuspenso em 1,0 mL de etanol absoluto, formando o extrato bruto derivado do crescimento em meio líquido (ECL) que, subsequentemente, foi transferido para microtubos de polipropileno, e armazenados em freezer a –20ºC para utilização nos testes posteriores.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos brutos

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos (ECS e ECL), a qual constitui a etapa principal de triagem secundária da ação antibiótica antimicrobiana dos metabólitos gerados pelas actinobactérias, foi executada através da técnica de difusão em poço (CLSI 2014). As cepas de MRSA (n = 4) foram reativadas como no item 4.2. Com o auxílio de *swabs* esterilizados, os inóculos foram semeados na superfície do ágar Mueller-Hinton. Orifícios com 7,0 mm de diâmetro foram então confeccionados, com o perfurador metálico autoclavado, em pontos equidistantes no meio de cultura. Foram acrescidas alíquotas de 25 µL tanto dos extratos brutos quanto dos controles em cada um dos poços. Para os ECSs, o etanol consistiu no controle negativo e para os ECLs, o acetato de etila e o etanol constituíram os controles, a fim de se verificar uma possível atividade antimicrobiana dos solventes extratores.

As placas foram pré-incubadas a temperatura ambiente por 1 h e, em seguida, transferidas para estufas microbiológicas e incubadas a 30ºC por 18-24 h. Após a incubação, foi executada a leitura, com as zonas de inibição do crescimento dos MRSA sendo mensuradas. Conforme a classificação descrita na Tabela 4, uma região de inibição superior a 14 mm significa um grau elevado de ação antimicrobiana e, assim, confirma a presença de biomoléculas ativas frente ao patógeno gram-positivo. O experimento foi executado em triplicata.

4.5 Extração do DNA estafilocóccico pelos extratos orgânicos brutos

Um ensaio de extração de DNA com os extratos orgânicos dos potenciais isolados de actinobactérias foi efetuado para averiguar a ação lítica dos metabólitos secundários sobre a parede celular bacteriana. Esse teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Maataoui e colaboradores (2014). A cepa-padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e um dos isolados clínicos de MRSA (CCBH 6089) foram utilizados como micro-organismos indicadores, com um objetivo de comparar a capacidade das biomoléculas presentes nesses extratos em atuar a esse nível de estrutura celular frente às variantes controle e patogênica do coco gram-positivo.

Previamente, as bactérias indicadoras foram cultivadas em caldo LB. Seguida à incubação a 35ºC por 24 h, alíquotas de 3,0 mL das culturas foram centrifugadas a 12.000 g a 4ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os precipitados (*pellets*) foram ressuspensos em 360 µL dos extratos brutos selecionados, e o volume total de reação foi completado para 1,0 mL com água ultrapura (640 µL). Essas suspensões foram incubadas a 37ºC por 45 minutos e então centrifugadas a 12.000 g a 4ºC por 10 minutos. Logo depois, um volume de 400 µL da fração superior da mistura de reação foi removido para novos microtubos.

O DNA foi então precipitado com dois volumes (2X) de álcool etílico gelado a 95% e 40 µL de cloreto de sódio (NaCl) a 5 M. Após uma etapa de incubação a –20ºC por 30 minutos, centrifugação a 12.000 g por 20 minutos a 4ºC e secagem a temperatura ambiente, alíquotas de 20 µL de água ultrapura foram acrescentadas aos microtubos. Água, etanol (95%), acetato de etila e NaCl 5 M consistiram nos controles negativos do teste e ambas as substâncias foram aplicadas com volume idêntico ao dos extratos brutos (360 µL). Uma extração de DNA convencional (Van Soolingen et al. 1994, adaptado) com as bactérias indicadoras foi realizada para compor o controle positivo.

A certificação da potencial ação dos metabólitos microbianos sobre a parede celular foi efetuada mediante detecção de material genômico dos micro-organismos indicadores por eletroforese em gel de agarose a 1,0 % (m/v). A corrida em cuba adequada preenchida com tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X foi conduzida a 100 V por 20 minutos e a 80 V por 45 minutos, com o uso do corante EZVision® III (AMRESCO). Assim, em cada poço do gel, aplicou-se uma mistura de 5,0 µL da amostra e 2,0 µL do corante. A leitura do teste foi feita por visualização do gel sob exposição à luz UV em transiluminador.

4.6 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos orgânicos brutos

Os extratos brutos que se destacaram quanto à atividade antimicrobiana contra as cepas de MRSA foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico. A metodologia relatada por Blizzard e colaboradores (1989) e adaptada por Lima (2007) constituiu a base para o delineamento do ensaio, com o emprego de *Artemia salina* como organismo-teste.

Ovos de *A. salina* foram eclodidos em solução de água mineral com 3,5% de sal marinho. A incubação ocorreu em câmara de germinação, com condições de iluminação e aeração constante, a temperatura de 30º C durante 48 horas. Os extratos brutos foram acrescentados em alíquotas de 200 µL cada em tubos de ensaio contendo 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 9,7 mL de solução aquosa com 3,5% de sal marinho. Esses tubos representaram as soluções-estoque, equivalente a 20.000 ppm (2,0%), a partir das quais foram preparadas as demais diluições dos extratos nas concentrações de 20.000 ppm até 1.250 ppm (0,125%). As soluções foram agitadas em vórtex em seguida para assegurar a homogeneização dos compostos bioativos dos extratos. Diluições extras foram posteriormente realizadas quando necessárias.

Foram acrescentados 10 náupilos de *A. salina* aos tubos contendo 1,0 mL das diluições, procedimento feito em triplicata. Tubos com 1,0 mL cada de etanol absoluto e DMSO a 1,0% (v/v) nas mesmas condições do experimento consistiram nos controles, para averiguar uma possível ação tóxica do álcool e do solvente sobre as larvas. Após um período de incubação sob iluminação a 30ºC por 24 h, o número de náupilos mortos ou imóveis foi contabilizado para a determinação da porcentagem de mortalidade das larvas em cada concentração analisada, segundo a equação:

% Mortalidade = (nº de mortos ou imóveis/ nº total de *A. salina*) x 100

Com os dados obtidos, realizou-se o cálculo da dose letal média (DL_{50}), isto é, aquela que é mortal para 50% dos animais experimentais. Essa dose foi determinada por análise de regressão linear dos resultados obtidos. A citotoxicidade foi considerada significante caso o valor da DL_{50} fosse inferior a 1.000 ppm (Meyers et al. 1982).

4.7 Detecção da ação intercalante dos extratos orgânicos brutos sob a molécula de DNA

4.7.1 Obtenção e preparo do DNA alvo

O plasmídeo pUC18 (2,7 Kb) foi empregado como a molécula de ácido nucléico alvo para o ensaio biológico. As células de *E. coli* XL1-*Blue* transformadas, por eletroporação, com o vetor foram doadas pela Dra. Keili Maria Cardoso de Souza, responsável técnica do Laboratório de Virologia Humana e Molecular do IPTSP/UFG.

O isolamento de DNA plasmidial foi executado segundo Sambrook & Russel (2001), com adaptações. Assim, após cultivo sob agitação a 35ºC, o conteúdo da cultura em caldo LB da linhagem de *E. coli* com o vetor pUC18 foi transferido para tubos Eppendorf. Após duas etapas de centrifugação a 5.000 g, a 4ºC por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado.

Alíquotas de 100 µL da solução de lise I (GTE: glicose/Tris/EDTA) com 1,0 µL de RNase foram adicionadas ao precipitado, o qual foi agitado vigorosamente em vórtex para total dissolução. A seguir, um volume de 210 µL da solução de lise II (NaOH/SDS) foi transferido para os tubos, os quais foram homogeneizados rapidamente por inversão. Depois de uma incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, alíquotas de 280 µL da solução de lise III (acetato de potássio/ácido acético glacial) foram inseridas e os microtubos foram agitados por inversão por 10 vezes para dispersão do lisado bacteriano.

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e um volume de 560 µL de isopropanol foi adicionada aos mesmos. Seguidamente às etapas de homogeneização por inversão e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4ºC, o sobrenadante foi descartado com cuidado.

Para recuperação do DNA plasmidial, o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol gelado a 70%. O material foi então centrifugado a 12.000 g por 3 minutos a 4ºC e o sobrenadante desprezado. Consecutiva à secagem a temperatura ambiente, o DNA precipitado

foi ressuspenso em 30 µL de água mili-Q esterilizada. O DNA isolado foi preservado em freezer a –20ºC.

Para o teste, o vetor pUC18 foi linearizado com a enzima de restrição *Eco*RI (Life Technologies). A digestão enzimática foi conduzida em tubos Eppendorfs para um volume final de reação de 25 µL, consistindo de: 15,5 µL de água ultrapura esterelizada, 2,5 µL de tampão da enzima 10X, 2,0 µL da enzima *Eco*RI e 5,0 µL de DNA plasmidial. Logo depois da incubação a 37ºC por 2 h e outra a 65ºC por 20 minutos, o material foi armazenado em freezer a –20ºC. A confirmação da linearização foi efetuada mediante corrida eletroforética em tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE) 0,5X durante 40 minutos a 100 V, com aplicação de uma mistura de 3,0 µL da amostra e 2,0 µL de EZVision® III em gel de agarose a 1,0% (m/v).

4.7.2 Efeito de intercalação dos metabólitos bioativos sob a molécula de DNA – *Gel Shift*

A mistura do DNA plasmidial previamente preparada com os extratos do crescimento em meio de cultura sólido e líquido (ECS e ECL) fundamentou o teste de determinação da capacidade intercalante em ácido nucleico das substâncias bioativas microbianas e, assim, de seu possível mecanismo de ação antitumoral. Esse ensaio é baseado com a metodologia descrita por Furlan e colaboradores (2002) e modificado por Lima (2007), o método de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) ou, simplesmente, *gel shift* (Buratowski & Chodosh 1996).

Alíquotas de 100 µL dos extratos brutos acrescidos de 25 µL de clorofórmio (para retirada das impurezas dos extratos) foram transferidas para microtubos de polipropileno de 1,5 mL e sofreram secagem por aquecimento para completa retirada do etanol e acetato de etila, com o propósito de evitar qualquer interferência posterior desses solventes. Em seguida, acrescentou-se 8,0 µL de água ultrapura e 2,0 µL do DNA alvo, com devida homogeneização. Executou-se a incubação do material em banho-maria a 37ºC durante 15 minutos.

As amostras foram aplicadas em seu volume total de reação (10 µL) adicionado de 2,0 µL de tampão de amostra em gel de eletroforese a 0,7%. A corrida eletroforética foi realizada em cuba adequada com tampão TBE 0,5X a 100 V por 45 minutos. Em um dos poços do gel foi acrescido o padrão de massa molecular (*ladder*) de 1Kb (Invitrogen), e em outro o controle negativo consistindo em 2,0 µL do plasmídeo linearizado e 2,0 µL de tampão de amostra. Uma alíquota de 2,0 µL de solução de DNA plasmidial acrescido de 1,0 µL

brometo de etídeo diluído em água ultrapura (1:75 µL) constituiu o controle positivo. O brometo de etídeo é um análogo de bases nitrogenadas que se intercala na molécula do ácido nucleico e emite fluorescência após exposição à luz UV, promovendo um retardo da motilidade do DNA, o que se deve ao aumento do tamanho e rigidez da molécula nas formas linear e circular relaxada (De-Souza 2003).

Encerrada a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5,0 µg/mL). A leitura do teste baseou-se na diferença na migração da banda do DNA em comparação com os controles, evidenciando a intercalação das biomoléculas presentes nos extratos.

4.8 Caracterização morfológica dos isolados de actinobactérias

4.8.1 Macromorfologia

Os isolados de actinobactérias foram submetidos ao exame macroscópico de acordo com o descrito por Shirling & Gottlieb (1966) e Wink (2012). Dessa forma, as morfoespécies, anteriormente crescidas em caldo ISP-2 em *shaker* (140 rpm) a 30ºC por 48-72 h, foram cultivadas nos meios no estado sólido ISP-2, ISP-3 – em placas de Petri convencionais –, e ISP-4, ISP-5, ISP-6, ISP-7, Suter com e sem tirosina – em placas de cultura de células com seis poços. As colorações detectadas após o cultivo foram distinguidas de acordo com o sistema de identificação de cores RAL K-7 (RAL Farben).

Após incubação a 30ºC por 7-14 dias, as seguintes características culturais foram avaliadas em todos os meios, com exceção do ágar Suter: crescimento, colorações dos micélios vegetativo (reverso da placa) e aéreo e presença de pigmentos solúveis. A cromogenicidade foi averiguada mediante análise do cultivo nos meios ISP-6, ISP-7 e Suter suplementado ou não com tirosina (Korn-Wendisch & Kutzner 1992).

4.8.2 Micromorfologia

4.8.2.1 Microscopia óptica

A determinação de caracteres micromorfológicos das actinobactérias foi realizada por meio da aplicação da técnica da lamínula enterrada, segundo Holt e colaboradores (1994). Assim, as morfoespécies, previamente cultivadas por 14 dias a 30ºC em ágar ISP-2, foram

semeadas em estrias bem delimitadas na superfície e novo meio ISP-2. Em seguida, lamínulas esterilizadas foram inseridas em um ângulo de aproximadamente 45ºC em pontos equidistantes no local em que as estrias foram feitas no meio.

Decorrida a esporulação das colônias (incubação a 30ºC por 14 dias), as lamínulas foram delicadamente retiradas com auxílio de pinça e depositadas na superfície de lâminas de microscopia. O material foi levado ao microscópio óptico para observação das características morfológicas: presença de cadeia de esporos e sua morfologia, esporângio, esporos únicos e sua superfície e fragmentação de micélio aéreo ou vegetativo (Wink 2012).

A coloração de Gram e a técnica de Ryu também foram executadas para verificação das características morfo-tintoriais das células microbianas, bem como complementar o que foi conferido por microscopia óptica.

4.8.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

4.8.2.2.1 Preparação das amostras biológicas

As amostras bacterianas foram processadas para a microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Estudos Morfológicos (LABEM) do Departamento de Histologia (DHISTO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG sob orientação da Profa. Dra. Walquíria Arruda. Para essa etapa de preparo do material, as morfoespécies foram inicialmente cultivadas de acordo com a técnica da lamínula enterrada, explicada anteriormente (item 4.8.2.1). Em vista dos solventes orgânicos usados no processo, toda essa etapa experimental foi efetuada no interior de capela de exaustão.

Inicialmente, câmaras úmidas para a deposição do material biológico a ser submetido ao tratamento foram montadas. As mesmas consistiam de placas de Petri descartáveis de tamanho médio preenchidas com papel filtro comum, umedecido com a solução fixadora específica, e lâminas simples de microscopia na superfície. O principal objetivo da confecção dessas câmaras foi evitar a secagem do material durante o processamento.

Logo a seguir, as lamínulas inseridas no meio de cultivo foram transferidas para as lâminas nas câmaras úmidas. A mesma solução fixadora com a qual se umedeceu o papel filtro das câmaras foi depositada na superfície da lamínula. Consecutivamente à incubação durante 30 minutos a temperatura ambiente, executou-se três lavagens (5 minutos cada) com

tampão cacodilato de sódio a 0,1 M para total remoção da solução de fixação. O excesso da mistura foi devidamente descartado.

Novas câmaras úmidas foram organizadas e identificadas, com exceção da aplicação da solução fixadora no papel filtro. As lamínulas já parcialmente processadas foram então transferidas para as câmaras recém-montadas para a etapa de desidratação. Dessa forma, as amostras foram tratadas sucessivamente com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%), com a duração de aproximadamente 5 minutos para cada etapa de lavagem e desprezo do excedente do álcool entre os passos de aplicação do mesmo.

As lamínulas foram então depostas na superfície de novas lâminas na tampa das placas de Petri das câmaras úmidas. O agente secante hexa-metil-disilano (HDMS) foi adicionado às lamínulas pré-tratadas para atingir o ponto crítico. Seguida à incubação por 6 minutos, o excesso do reagente foi descartado e as amostras foram postas para repouso a temperatura ambiente até total secagem.

Finalmente, as lamínulas tratadas foram removidas para novas placas de Petri descartáveis de tamanho pequeno, as quais foram armazenadas no interior de recipientes de acrílico preenchidos com partículas de sílica gel, a fim de garantir que as amostras estivessem plenamente secas para a análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV). O material foi conservado a temperatura ambiente.

Eventualmente, lamínulas enterradas do crescimento dos isolados de actinobactérias também foram retiradas do ágar ISP-2, expostas a secagem em estufa a 80ºC e transferidas para os recipientes com partículas de sílica gel. Esse material foi também levado para o MEV a fim de confirmar se é possível observar estruturas morfológicas microbianas mesmo com a ausência do preparo acima explicado.

4.8.2.2.2 Análise em MEV

O exame morfológico dos isolados microbianos por microscopia eletrônica de varredura foi efetuado no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), alocado no Instituto de Física (IF) da UFG, pelas responsáveis técnicas Nayara Melo Freitas e Dra. Tatiane Oliveira dos Santos. Inicialmente, as lamínulas processadas foram depositadas com auxílio de pinça em um suporte metálico apropriado. O material foi fixado nessa estrutura com tinta à base de carbono, a qual foi acrescida por meio de um pincel adequado apenas nas extremidades das lamínulas.

Confirmada a fixação das lamínulas no suporte, o mesmo foi transferido para o interior do aparelho Denton Vaccum Desk V para metalização das amostras. Concluída a cobertura com partículas de ouro metálico, todo o material foi encaminhado para o MEV JEOL JSM 6610. As micrografias foram retiradas em diferentes aumentos e campos para melhor visualização das estruturas morfológicas dos isolados. As imagens foram comparadas conforme Miyadoh e colaboradores (1997) para comparação com as espécies já caracterizadas e, dessa forma, possibilitar a conclusão dessa etapa de identificação taxonômica das actinobactérias.

4.9 Caracterização fisiológica/bioquímica dos isolados de actinobactérias

Os potenciais isolados de actinobactérias também foram caracterizados fenotipicamente por uma variedade de testes nutricionais, de degradação, de atividade enzimática e de tolerância a múltiplos fatores, conforme por Shirling & Gottlieb (1966), Williams e colaboradores (1983) e Wink (2012).

4.9.1 Testes nutricionais e de tolerância

O crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio; sensibilidade a variados compostos químicos e antimicrobianos; e a diversos graus de pH e salinidade foram averiguados por meio do emprego de Microplacas^{TM} GEN III (Biolog). O painel consiste em 94 testes fenotípicos (Figura 12) e é classicamente utilizado para obtenção do perfil metabólico e caracterização bioquímica de um amplo conjunto de bactérias gram-positivas e gram-negativas, auxiliando na identificação taxonômica microbiana até o nível de espécie.

A1 Controle negativo	A2 Dextrina	A3 D-maltose	A4 D-trealose	A5 D-celobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sacarose	A8 D-turanose	A9 Estaquiose	A10 Controle positivo	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-rafinose	B2 α-D-lactose	B3 D-melibiose	B4 β-metil-D-glicosídeo	B5 D-salicina	B6 N-acetil-D-glicosamina	B7 N-acetil-D-manosamina	B8 N-acetil-D-galactosamina	B9 Ácido N-acetil neuramínico	B10 NaCl 1%	B11 NaCl 4%	B12 NaCl 8%
C1 α-D-glucose	C2 D-manose	C3 D-frutose	C4 D-galactose	C5 3-metilglucose	C6 D-fucose	C7 L-fucose	C8 L-ramnose	C9 Inosina	C10 Lactato de sódio 1%	C11 Ácido fusídico	C12 D-serina
D1 D-sorbitol	D2 D-manitol	D3 D-arabitol	D4 Mio-inositol	D5 Glicerol	D6 Glicose-6-PO4	D7 D-Frutose-6-PO4	D8 Ácido D-aspártico	D9 D-serina	D10 Troleandomicina	D11 Rifamicina	D12 Minociclina
E1 Gelatina	E2 Glicil-L-prolina	E3 L-alanina	E4 L-arginina	E5 Ácido L-aspártico	E6 Ácido L-glutâmico	E7 L-histidina	E8 Ácido L-piroglutâmico	E9 L-serina	E10 Lincomicina	E11 Hidrocloreto de guanidina	E12 Niaproof 4
F1 Pectina	F2 Ácido D-galacturônico	F3 Ácido L-galactônico lactona	F4 Ácido D-glucônico	F5 Ácido D-glucorônico	F6 Glucoronamida	F7 Ácido múcico	F8 Ácido quínico	F9 Ácido D-sacárico	F10 Vancomicina	F11 Violeta de tetrazólio	F12 Azul de tetrazólio
G1 p-hidroxil-ácido fenilacético	G2 Metil piruvato	G3 Ácido D-láctico metil éster	G4 Ácido L-láctico	G5 Ácido cítrico	G7 Ácido α-cetoglutárico	G7 Ácido D-málico	G8 Ácido L-málico	G9 Ácido bromo-succínico	G10 Ácido nalidíxico	G11 Cloreto de lítio	G12 Telurito de potássio
H1 Tween 40	H2 Ácido gama-aminobutírico	H3 Ácido α-hidroxibutírico	H4 Ácido D,L-β-hidroxibutírico	H5 Ácido α-cetobutírico	H6 Ácido acetoacético	H7 Ácido propiônico	H8 Ácido acético	H9 Ácido fórmico	H10 Aztreonam	H11 Butirato de sódio	H12 Bromato de sódio

Figura 12 – Representação esquemática da Microplaca^{TM} GEN III (Biolog).

O preparo dos isolados de actinobactérias para a execução dessa etapa de fenotipagem foi realizado mediante cultivo inicial em caldo 5006 modificado (Wink 2012) sob incubação em *shaker* a 130 rpm a 30ºC durante 48-72 h. Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das culturas foram diluídas em tubos de cultura com 9,0 mL de água destilada esterilizada. O conteúdo dessas suspensões foi vertido em reservatórios (“coxinhos”) esterilizados e, com auxílio de pipeta multicanal, um volume de 100 µL foi transferido para cada um dos poços das microplacas. As mesmas foram incubadas a 30ºC por 10 a 14 dias, com monitoramento diário. A leitura dos testes foi efetuada mediante observação de crescimento micelial e turvação no interior dos poços, indicativo de resultado positivo.

Com o propósito de complementar a caracterização proveniente do uso das microplacas, testes de tolerância a crescentes níveis de pH e concentração de NaCl foram executados separadamente. Para o parâmetro pH, as morfoespécies bacterianas foram semeadas em ágar ISP-2, com os seguintes valores de pH: 4,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0. Quanto à salinidade do meio, os isolados foram cultivados em meio basal específico em placas de cultura para as sequentes concentrações de NaCl: 0%; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10,0%.

4.9.2 Testes enzimáticos e de degradação

A hidrólise de amido foi verificada mediante cultivo das actinobactérias em ágar de Bennet′s modificado (MBA) (Jones 1949). Decorrido o período de uma semana de incubação, uma solução de lugol foi aplicada na superfície do meio de cultura e a visualização de zonas claras em torno das colônias bacterianas confirmou qualitativamente a ação amilolítica.

A atividade proteolítica foi detectada após cultivo dos isolados em meio basal (Vieira 1999) adicionado de 1,5% (v/v) de leite desnatado (caseína). Após a incubação por uma semana, a leitura foi realizada após exposição à solução de ácido acético a 5,0% (v/v), sendo resultado positivo pela presença de halos claros ao redor das colônias.

A degradação de gelatina foi observada em caldo de Bennet′s com 0,4% de gelatina. A semeadura foi realizada em tubos de cultura com 3,0 mL de meio basal, cada incubados por 7 dias. Após esse período de incubação os tubos foram novamente incubados sob refrigeração (4ºC) por 15 minutos. A positividade foi determinada pela não solidificação do meio.

A produção de lipase e esterase foi examinada por meio do inóculo das amostras no meio de Sierra (1957) suplementado com Tween 80 e Tween 20, respectivamente. Regiões opacas na periferia das colônias, efeito da precipitação de cristais de cálcio a partir dos ácidos graxos liberados na lipólise, indicaram resultado positivo depois de 7 dias de incubação.

A degradação de DNA e RNA foi averiguada após crescimento dos micro-organismos em ágar Bacto DNase (Himedia) e ágar triptona acrescido de 0,3% de RNA (Goodfellow & Alderson 1979), respectivamente. Seguidamente a incubação por 7 dias, a atividade das nucleases foi revelada pela transferência para a superfície do meio de uma solução de HCl 1,0 M. A formação de áreas claras envolvendo as colônias bacterianas atestaram a digestão enzimática dos ácidos nucleicos.

O ágar ureia (Korn-Wendisch & Kutzner 1992) foi adotado para analisar a hidrólise desse composto orgânico. O inóculo ocorreu em placas de Petri contendo o meio apropriado com 1,0% (m/v) de ureia, anteriormente esterilizada por filtração. Após 5 dias de cultivo, a ação ureolítica foi certificada pela alcalinização do meio, provocada pela liberação de amônia como produto de hidrólise, a qual é notada pela mudança da coloração de avermelhado para róseo, em vista da viragem do indicador de pH (vermelho de fenol).

A hidrólise de ácido úrico (0,5%, m/v) foi determinada em meio basal adequado (Vieira 1999). Após 7 a 9 dias de incubação, o desenvolvimento de zonas transparentes ao redor das colônias foi indicativo da produção de uricases e, logo, positividade.

A degradação de esculina (0,1%, m/v) foi confirmada após semeio microbiano em placas contendo o meio sólido basal conveniente, segundo Williams e colaboradores (1983). O resultado positivo consiste no escurecimento do meio na periferia das colônias, consequência da formação de complexos dos derivados metabólicos do glicosídeo com o citrato férrico. O período de incubação se prolongou de 5 a 10 dias.

A redução de nitrato foi analisada em tubos de cultura com 5,0 mL cada de ágar nitrato modificado (Atlas 2005). O inóculo foi "em picada" e a incubação por 7-14 dias. A revelação foi feita com o acréscimo de 0,2 mL dos reagentes de Griess-Ilosvay (I e II) em cada tubo. O aparecimento de coloração avermelhada na superfície do meio comprovou a redução do composto inorgânico em nitrito.

A produção de catalase foi determinada após o cultivo dos isolados por 7 dias em MBA. Colônias isoladas foram suspensas em gotas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), previamente depositadas sobre lâminas de microscopia. A formação de bolhas de oxigênio (efervescência) atestou a geração da enzima.

Todos os testes fenotípicos foram executados em triplicata. Os isolados microbianos foram semeados diretamente a partir da suspensão de esporos em glicerol a 20%. A incubação ocorreu em estufa microbiológica a 30ºC.

4.10 Caracterização molecular dos isolados de actinobactérias

A caracterização taxonômica ao nível molecular dos potencias isolados foi executada pela amplificação, sequenciamento e identificação por comparação do segmento gênico que codifica a porção do 16S rRNA.

4.10.1 Extração do DNA genômico

O isolamento do DNA total das actinobactérias selecionadas foi realizado de acordo com o protocolo sugerido por Van Soolingen e colaboradores (1994), com adaptações. Os isolados microbianos foram inicialmente cultivados em Erlenmeyers com 50 mL de caldo ISP-2 acrescido de 0,5% de glicina (Hopwood et al. 1985) sob agitação em *shaker* (140 rpm) a 30ºC por 48-72 h. Alíquotas de 1,5 mL da cultura foram transferidas para microtubos do

tipo Eppendorf, os quais foram centrifugados a 6.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, novamente, um volume de 1,5 mL de cultura líquida foi adicionado aos tubos, os quais foram submetidos à centrifugação sob as mesmas condições anteriores.

Em seguida ao descarte do sobrenadante, cada uma das amostras foram ressuspensas em 400 µL de tampão Tris/EDTA (TE) e 40 µL de lisozima (20 µg/mL) e incubadas em banho-maria a 37ºC por 1 h e 30 minutos. Posteriormente, alíquotas de 70 µL de SDS a 10% e 6,0 µL de proteinase K (Sigma-Aldrich) a 10 mg/ml foram transferidas para os microtubos, os quais foram novamente incubados a 56ºC por 10 minutos. Logo após, adicionou-se às amostras 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de solução de CTAB/NaCl 0,73 M, as quais foram agitadas em vórtex até a solução apresentar um aspecto leitoso.

Logo a seguir, um volume de 650 µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, v/v) foi acrescido a cada um dos microtubos que foram agitados manualmente por 30 segundos. Depois de mais uma fase de centrifugação por 15 minutos a 12.000 g, a fração superior da solução foi removida para novos tubos e precipitado com 0,6 volumes (0,6X) de isopropanol. As amostras foram armazenadas em freezer a –20ºC por 18-24 h.

O material foi finalmente centrifugado por 20 minutos a 12.000 g, o sobrenadante foi desprezado e 1,0 mL de etanol a 70% gelado foi transferido aos microtubos. Encerrada mais uma nova fase de centrifugação a 12.000 g por 5 minutos a 4ºC, o material permaneceu em repouso a temperatura ambiente para secagem. O DNA extraído foi finalmente redissolvido em 40 µL de água ultrapura esterilizada. A confirmação da extração de DNA foi efetuada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, como descrito no item 4.5. As amostras foram preservadas em freezer a –20ºC.

4.10.2 Amplificação do segmento gênico do 16S rRNA

A região gênica codificante do 16S rRNA foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico extraído. Foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores universais para o domínio *Eubacteria* 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al. 1991). A mistura de reação foi preparada para um volume final de 50 µL, incluindo: 5,0 µL de tampão 1X da *Taq* polimerase (Invitrogen), 1,5 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 1,5 µL de cada *primer* (10 µM), 4,0 µL de solução de dNTPs (10 mM) (Invitrogen), 1,0 µl de *Taq* polimerase (5U) (Invitrogen), 1,0 µL de DNA (50-100 ng) e 35,5 µL de água ultrapura esterilizada.

A PCR consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 95ºC por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação, cada um consistindo de: desnaturação a 95ºC por 1 minuto, anelamento a 55ºC por 1 minuto, extensão a 72ºC por 2 minutos, e um passo de extensão final a 72ºC por 10 minutos. Os produtos de amplificação (aproximadamente 1.500 pb) foram detectados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, utilizando-se o padrão de massa molecular (*ladder*) (1 Kb) (Invitrogen), a 100 V por 20 minutos e 80 V por 45 minutos, assim como exposto no item 4.5.

4.10.3 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi executada de acordo com a metodologia padronizada por Silva e colaboradores (2008), com alterações. Assim, as amostras foram precipitadas com dois volumes (2X) de isopropanol gelado a 65% e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. Prosseguiu-se com uma lavagem com o mesmo volume de etanol a 70% gelado, e os microtubos foram novamente centrifugados e invertidos sobre papel toalha a temperatura ambiente depois do descarte do sobrenadante. Finalizada a secagem, o DNA purificado foi ressuspenso em 20 µL de água ultrapura esterilizada. O material foi conservado em freezer a –20ºC.

4.10.4 Sequenciamento da região gênica do 16S rRNA

Os produtos de PCR purificados foram enviados ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (UCB) para sequenciamento. O processo foi realizado em um sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems) e os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR foram aplicados na reação de sequenciamento separadamente. Os dados derivados do sequenciamento foram enviados em arquivos no formato .ab1, os quais foram acessados mediante o programa *Sequence Scanner* (Applied Biosystems).

4.10.5 Identificação molecular com base nas sequências gênicas de 16S rRNA

As sequências nucleotídicas geradas foram editadas no *software* CodonCode Aligner versão 5.01, o qual já inclui os programas Phred/Phrap/Consed, principalmente para a retirada de bases de baixa qualidade (phred < 20). As sequências resultantes do gene do 16S

rRNA foram comparadas quanto a sua similaridade com outras depositadas no *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), via a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), BLASTn (*nucleotide* BLAST), especificamente (Altschul et al. 1990). Os primeiros resultados (*hits*) com maiores valores de identidade foram listados como a provável identificação dos isolados de actinobactérias.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento de *Actinoplanetes*

No presente trabalho, um total de 19 diferentes morfoespécies de actinobactérias foi isolado da amostra de solo de Cerrado selecionada. Os isolados bacterianos apresentaram colônias ressecadas, bem aderidas e com crescimento longitudinal para o interior do ágar (sugestivo da produção de agarases), tamanho variado, desenvolvimento micelial típico, e possível esporulação em até duas semanas de cultivo. Esses caracteres são considerados como particulares de actinobactérias em processos de isolamento de micro-organismos do solo. Os isolados foram identificados como "BC-A", em referência ao ponto de proximidade (Biblioteca Central) da origem do solo coletado, seguido de numeração.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das actinobactérias

Apenas 16 isolados oriundos do processo de isolamento foram submetidos aos ensaios de triagem da atividade antimicrobiana das actinobactérias frente ao conjunto de micro-organismos indicadores. Três morfoespécies, BC-A7, BC-A17 e BC-A19, perderam sua viabilidade durante o processo de estocagem e preservação. Assim, essas amostras não puderam ser avaliadas nos testes.

Um total de 5 (31,25%) das 16 morfoespécies avaliadas exibiram algum grau de atividade antimicrobiana das actinobana fase de triagem primária. Avaliando a ação desses isolados frente a gram-positivos (Tabela 5), observa-se uma variação do espectro de bioatividade, o qual oscilou de baixo a alto, segundo os critérios de Matsuura (2004) (Tabela 4). Entre os isolados, BC-A3 não exibiu ação antimicrobiana frente a *E. faecalis* ATCC 29212 e *C. glutamicum* ATCC 13032. Já a cepa BC-A10 apresentou atividade somente contra *S. aureus* ATCC 25923 (19 mm) e *K. rhizophila* ATCC 9341 (20 mm) e BC-A21 apenas inibiu *B. cereus* ATCC 14579 (10 mm). A morfoespécie BC-A22 destaca-se em relação as demais, possuindo um espectro alto de ação antimicrobiana para todos as bactérias gram-positivas indicadoras, exceto *E. faecalis* ATCC 29212 (12 mm). O isolado BC-A1 também exibiu moderada ação antimicrobiana frente a todas as cepas-padrão gram-positivas.

Na triagem primária contra MRSA, observou-se a atividade desses 5 isolados, exceto BC-A3 frente a MRSA CCBH 8508 e BC-A10 frente a todas as cepas indicadoras

(Tabela 6). Novamente o isolado BC-A22 demostrou uma alta ação antagonista quando comparada aos demais.

A morfoespécie BC-A22 exibiu capacidade também de inibir o crescimento de todas as cepas-padrão de bactérias gram-negativas, com exceção de *K. pneumoniae* ATCC 70063 (Tabela 7). Foi observado um aparente halo de ação bacteriostática frente a cepa-padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (11 mm), o que também foi notado em torno dos *plugs* das morfoespécies NIM 1, ADU 2.4, PEG 23 e PEG 30 quando testadas contra esse bacilo gram-negativo não fermentador (Tabela 7).

Quanto a atividade antifúngica das actinobactérias isoladas nesse trabalho, BC-A22 também apresentou, em média, um grau moderado de inibição, tanto frente à *C. albicans* ATCC 10231 (16 mm), quanto aos fungos filamentosos de origem clínica, *A. flavus* (10 mm) e *A. flavus* (16 mm). Os isolados BC-A1 e BC-A21 também exibiram atividade contra a levedura. A morfoespécie BC-A3 antagonizou somente o desenvolvimento de *A. niger* (10 mm) (Tabela 8).

O isolado de mangue, GUARA 1, inibiu as bactérias gram-positivas, com exceção de *E. faecalis* ATCC 29212. Esse isolado também apresentou moderada atividade inibitória frente a cepa leveduriforme e às amostras de MRSA. Não foi observada ação antagonista contra as bactérias gram-negativas e fungos filamentosos.

As demais morfoespécies selecionadas da bacterioteca, ADU 1.3, ADU 2.2, PEG 23, PEG 30 e NIM 1, exibiram graus semelhantes de antagonismo na etapa primária em relação aos trabalhos em que as mesmas foram parcialmente analisadas quanto à sua ação antibiótica contra bactérias (Lima 2007; Rodrigues 2009). Um dado inédito do presente estudo com relação a esses isolados é a presença de atividade antifúngica, exclusivamente à *C. albicans* ATCC 1031 (Tabela 8).

Em vista de sua ação antibiótica superior frente a *S. aureus* ATCC 25923 e as amostras de MRSA indicadoras quando comparados às demais morfoespécies avaliadas, os isolados BC-A1, BC-A22, GUARA 1, NIM 1, PEG 23, PEG 30, ADU 1.3 e ADU 2.2 foram selecionados para a produção dos extratos orgânicos brutos, os quais foram submetidos aos demais ensaios biológicos do trabalho. Os resultados da leitura desses testes da triagem primária estão expostos nas Figuras 13 e 14.

Tabela 5 – Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre as cepas-padrão de bactérias gram-positivas. Técnica dos *Plugs*.

Isolados	Diâmetros dos halos de inibição (∅ em mm) do crescimento dos micro-organismos indicadores					
	S. aureus ATCC 25923	*K. rhizophila* ATCC 9341	*E. faecalis* ATCC 29212	*C. glutamicum* ATCC 13032	*B. cereus* ATCC 14579	*B. subtilis* ATCC 6633
BC-A1	13	12	12	11	12	9
BC-A3	11	10	–	–	11	9
BC-A10	**19**	**20**	–	–	–	–
BC-A21	–	–	–	–	10	–
BC-A22	**22**	**30**	12	**20**	**16**	**20**
GUARA 1	11	14	**–**	8	9	10
NIM 1	14	**20**	10	14	10	12
VAL 1	12	**16**	8	10	9	9
PEG 23	12	**17**	–	11	8	9
PEG 30	12	**17**	–	11	8	9
ADU 1.3	11	**22**	12	15	12	12
ADU 2.2	13	14	–	12	7	14

– = ausência de atividade antimicrobiana.

Tabela 6 – Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre os isolados de MRSA (CCBH/FIOCRUZ). Técnica dos *Plugs*.

Isolados	Diâmetros dos halos de inibição (∅ em mm) do crescimento dos micro-organismos indicadores			
	6087	6089	7903	8508
BC-A1	9	11	10	9
BC-A3	9	11	**15**	–
BC-A21	9	12	10	9
BC-A22	**23**	**25**	**19**	**17**
GUARA 1	12	13	13	14
NIM 1	13	**16**	13	14
PEG 23	11	11	10	14
PEG 30	**15**	**15**	13	12
ADU 1.3	**15**	**17**	11	14
ADU 2.2	**15**	12	11	12

– = ausência de atividade antimicrobiana.

Tabela 7 – Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre as cepas-padrão de bactérias gram-negativas. Técnica dos *Plugs*.

Isolados	Diâmetros dos halos de inibição (∅ em mm) do crescimento dos micro-organismos indicadores					
	E. coli ATCC 25922	*E. aerogenes* ATCC 13048	*K. pneumoniae* ATCC 70063	*S. marcescens* ATCC 14756	*S. typhimurium* ATCC 14028	*P. aeruginosa* ATCC 27853
BC-A22	10	12	–	12	**14**	**11***
NIM 1	–	–	–	–	–	*
PEG 23	–	–	–	–	–	*
PEG 30	–	–	–	–	–	*
ADU 2.4	–	–	–	–	–	*

– = ausência de atividade antimicrobiana; * = zona bacteriostática aparente.

Tabela 8 – Triagem primária da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre os isolados de fungos. Técnica dos *Plugs*.

Isolados	Diâmetros dos halos de inibição (∅ em mm) do crescimento dos micro-organismos indicadores			
	C. albicans ATCC 10231	*Penicillium* sp. 1218	*A. flavus* 1218	*A. niger* 1218
BC-A1	10	–	–	–
BC-A3	–	–	–	10
BC-A21	10	–	–	–
BC-A22	**16**	–	10	**16**
NIM 1	13	–	–	–
GUARA 1	12	–	–	–
PEG 23	10	–	–	–
PEG 30	11	–	–	–
ADU 1.3	10	–	–	–
ADU 2.4	11	–	–	–

– = ausência de atividade antimicrobiana.

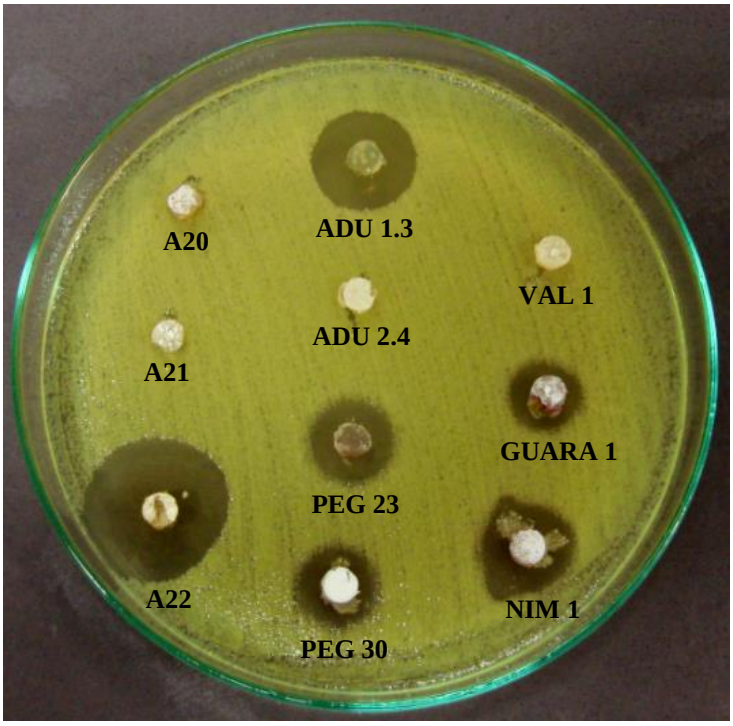


Figura 13 – Halos de inibição do crescimento da cepa-padrão de *K. rhizophila* ATCC 9341 gerados pelos *plugs* de actinobactérias cultivados em ágar ISP-2.

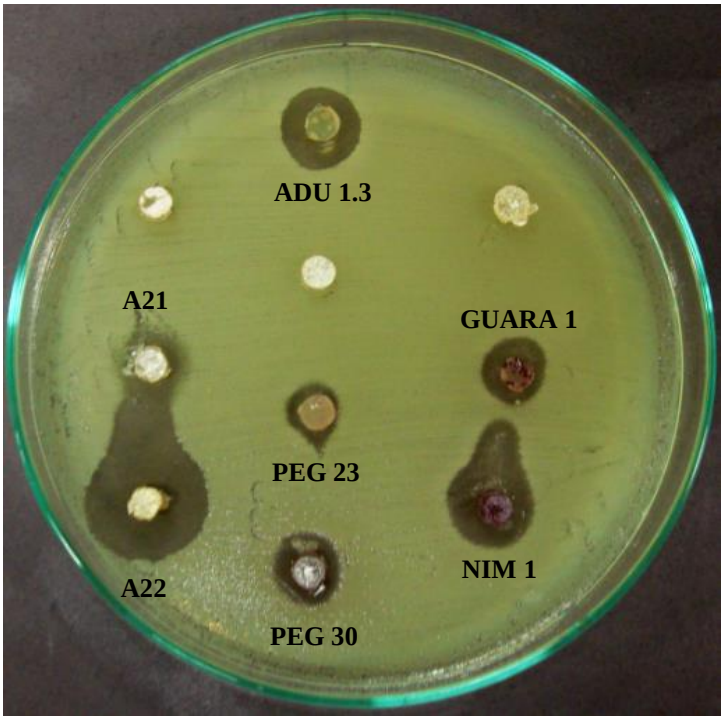


Figura 14 – Halos de inibição do crescimento do isolado de MRSA CCBH 6089 produzidos pelos *plugs* de actinobactérias cultivados em ágar ISP-2. Observar o aparente sinergismo de ação antimicrobiana dos compostos gerados pelos isolados A21 e A22.

5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos brutos

O conjunto de actinobactérias selecionadas (triagem primária) para os testes de triagem secundária da atividade antimicrobiana foi submetido à produção e extração dos metabólitos antibióticos a partir do crescimento das mesmas em meios sólido e líquido. Este procedimento foi assim conduzido, uma vez que, tais biomoléculas podem estar presentes tanto associadas às células microbianas (intracelularmente) ou serem liberadas na solução sob fermentação constante (extracelularmente). Todos os extratos etanólicos resultantes foram testados frente às amostras hospitalares de MRSA pela técnica de difusão em poço. Em vista de sua ação antagônica contra bactérias gram-negativas na primeira fase de avaliação, o ECS e ECL da morfoespécie BC-A22 também foram testados frente a essas cepas-padrão.

O ECS da morfoespécie BC-A22 se sobrepôs quanto a sua alta atividade antimicrobiana contra as cepas de MRSA indicadoras (Tabela 9) e, inclusive, frente a todos as bactérias gram-negativas, com exceção de *K. pneumoniae* ATCC 70063 (dados não mostrados). Tanto o ECS quanto o ECL do isolado ADU 1.3 apresentaram um alto nível de inibição do crescimento do patógeno gram-positivo, semelhante ao que foi notado para o ECS da morfoespécie BC-A22 (diâmetro das zonas de inibição > 20 mm). Por sua vez, a ação antimicrobiana dos ECLs dos isolados GUARA 1, PEG 23 e PEG 30 foram relativamente superiores em relação aos seus respectivos ECSs. Os extratos obtidos a partir de ambos os modos de cultivo do endofítico NIM 1 e do isolado de solo ADU 2.2 exibiram um nível semelhante quanto à sua atividade antagonista frente aos estafilococos. Nenhum dos extratos da morfoespécie BC-A1 inibiram o crescimento tanto da cepa-padrão quanto das variantes patogênicas de *S. aureus* (Tabela 9). Não foi observada ação antimicrobiana dos solventes orgânicos empregados no processo de extração, etanol e acetato de etila (Figuras 15 e 16).

Tabela 9 – Comparação do diâmetro dos halos de inibição do crescimento da cepa-padrão de *S. aureus* ATCC 25923 e isolados de MRSA (CCBH/FIOCRUZ) promovidos pelos extratos brutos do crescimento dos isolados de actinobactérias em meio sólido (ECS) e líquido (ECL) nos ensaios de triagem secundária da atividade antimicrobiana. Técnica de Difusão em Poço.

Isolados	Diâmetros dos halos de inibição (∅ em mm) do crescimento dos micro-organismos indicadores									
	S. aureus ATCC 25923		MRSA CCBH 6087		MRSA CCBH 6089		MRSA CCBH 7903		MRSA CCBH 8508	
	ECS	**ECL**	**ECS**	**ECL**	**ECS**	**ECL**	**ECS**	**ECL**	**ECS**	**ECL**
BC-A1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
BC-A22	**24**	15	**27**	16	**24**	14	**26**	14	**26**	15
GUARA 1	14	**18**	15	**20**	14	**18**	13	**19**	13	**18**
NIM 1	16	15	15	**18**	15	14	15	**17**	16	
PEG 23	13	**17**	12	**18**	12	**17**	11	**18**	12	**17**
PEG 30	15	**17**	15	**19**	15	**17**	14	**18**	13	**17**
ADU 1.3	**22**	**20**	**22**	**21**	**21**	**22**	**23**	**23**	**22**	**21**
ADU 2.2	15	11	12	13	13	13	13	14	13	14
Etanol (C –)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Acetato de etila (C –)	¥	–	¥	–	¥	–	¥	–	¥	–

ECS = extrato obtido a partir do crescimento das actinobactérias em meio sólido; ECL = extrato obtido a partir do crescimento das actinobactérias em meio líquido; – = ausência de atividade antimicrobiana; C – = controle negativo; ¥ = não avaliado.

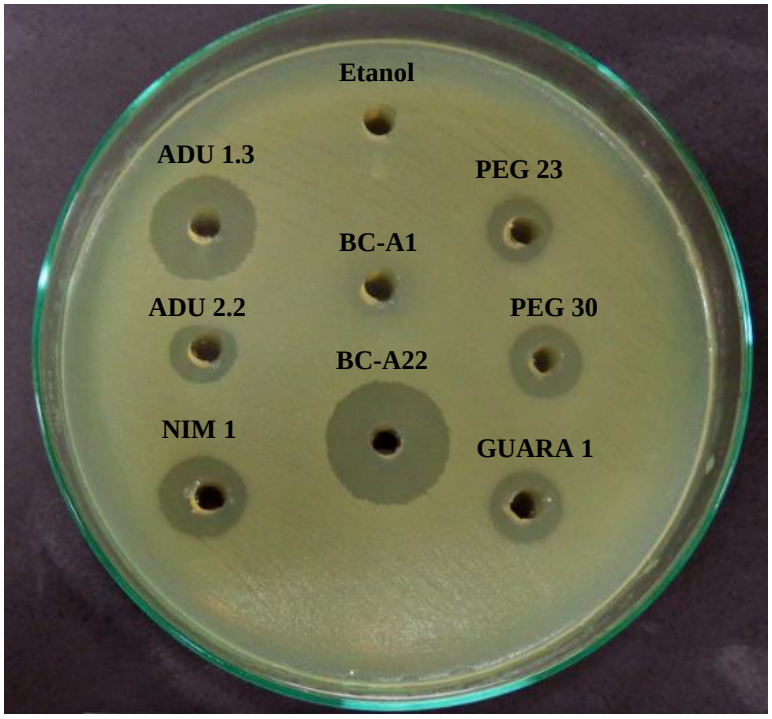


Figura 15 – Halos de inibição do crescimento do isolado MRSA CCBH 6089 provocados pelos extratos brutos derivados do crescimento em meio sólido (ECS) das actinobactérias analisados pela técnica de difusão em poço.

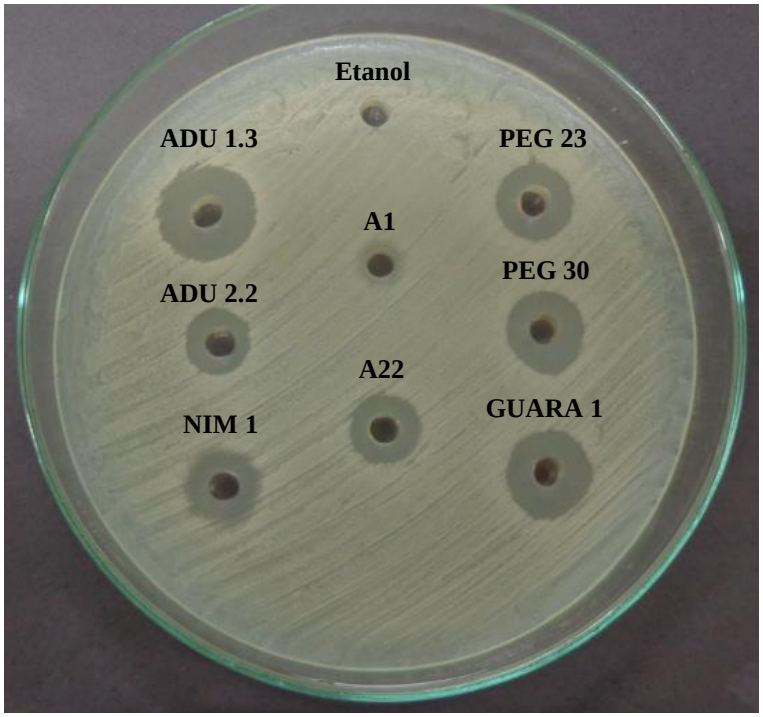


Figura 16 – Halos de inibição do crescimento do isolado MRSA CCBH 8508 provocados pelos extratos brutos derivados do crescimento em meio sólido (ECL) das actinobactérias analisados pela técnica de difusão em poço.

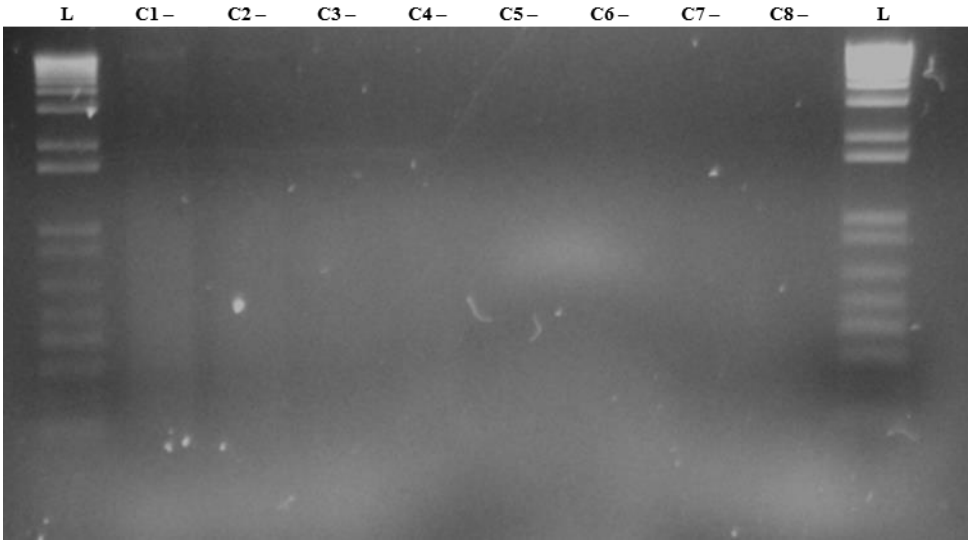
5.4 Exame da ação lítica sobre a parede celular bacteriana dos extratos orgânicos brutos

A triagem do mecanismo de ação lítica sobre a parede celular bacteriana dos extratos brutos foi executada mediante um ensaio simples de extração do material genômico de *S. aureus* ATCC 25923 eMRSA CCBH 6089 (selecionada dentre as demais aleatoriamente). A maior parte dos extratos foi capaz de extrair o conteúdo de ácidos nucleicos do coco gram-positivo, com uma relativa predominância dos ECSs sobre os ECLs. Como esperado, a detecção do material genético da cepa-padrão foi predominante em relação ao MRSA (Tabela 10). Nenhum dos controles adotados, ou seja, os solventes orgânicos (etanol e acetato de etila) aplicados no processo de produção dos extratos brutos e os componentes empregados durante o teste (água ultrapura, etanol gelado a 95%, NaCl 5 M) evidenciaram atividade de lise sobre a parede celular (Figura 17a), validando o bioensaio. Foi encontrada significativa variação em termos de concentração de DNA bacteriano isolado após tratamento com os extratos, o que pode ser percebido pela diferença no padrão das bandas no gel após eletroforese (Figura 17b).

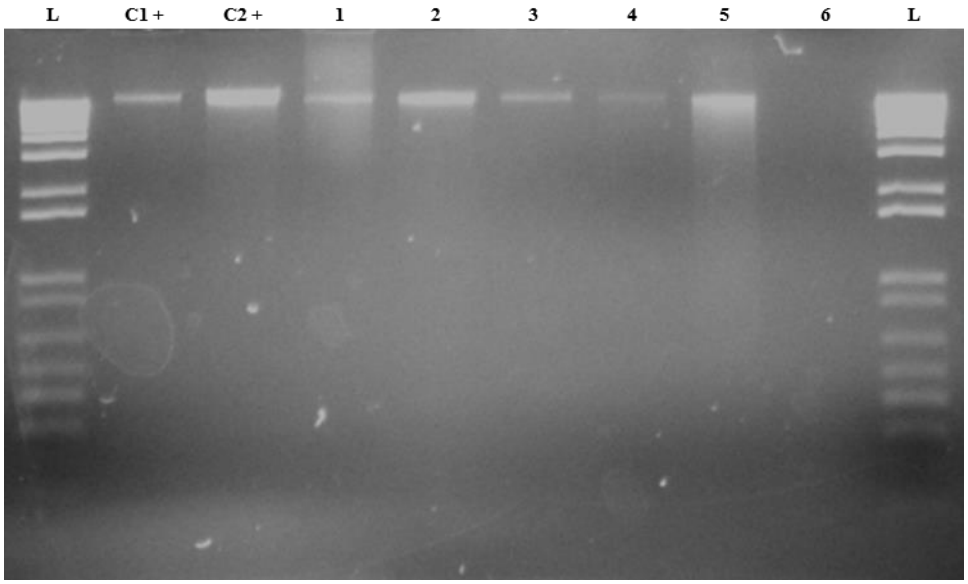
Tabela 10 – Resultado do ensaio de extração do material genômico estafilocóccico após tratamento com os extratos orgânicos brutos.

Isolados	**Detecção de material genômico da bactéria indicadora**			
	S. aureus ATCC 25923		MRSA CCBH 6089	
	ECS	**ECL**	**ECS**	**ECL**
BC-A22	+	+	+	–
GUARA 1	+	+	+	+
NIM 1	+	–	+	+
PEG 23	+	+	+	–
PEG 30	+	–	+	–
ADU 1.3	+	+	–	–
ADU 2.2	+	+	+	+
H_2O ultrapura (C –)	–		–	
Etanol (C –)	–		–	
Acetato de etila (C –)	–		–	
NaOH 5 M (C –)	–		–	

+ = presença de material genômico; – = ausência de material genômico; C – = controle negativo
ECS = extrato obtido a partir do crescimento das actinobactérias em meio sólido;
ECL = extrato obtido a partir do crescimento das actinobactérias em meio líquido.



(a)



(b)

Figura 17 – Detecção do material genômico de *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA CCBH 6089 após tratamento com os extratos orgânicos brutos em gel de agarose a 1,0% submetido a eletroforese. **(a)**: L = marcador de massa molecular (*ladder*) de 1 Kb; C1 **–** = controle negativo 1 (*S. aureus* ATCC 25923 + H_2O miliQ); C2 **–** = controle negativo 2 (MRSA + H_2O miliQ); C3 **–** = controle negativo 3 (*S. aureus* ATCC 25923 + EtOH 95%); C4 **–** = controle negativo 4 (MRSA + EtOH 95%); C5 **–** = controle negativo 5 (*S. aureus* ATCC 25923 + Ac. etila); C6 **–** = controle negativo 6 (MRSA + Ac. etila); C7 **–** = controle negativo 6 (*S. aureus* ATCC 25923 + NaOH 5 M); C8 **–** = controle negativo 8 (MRSA + NaOH 5 M). **(b)**: C1 + = controle positivo 1 (DNA de *S. aureus* ATCC 25923); C2 + = controle positivo 2 (DNA de MRSA CCBH 6089); Coluna 1 = *S. aureus* ATCC 25923 + ECL BC-A22; Coluna 2 = MRSA + ECS NIM 1; Coluna 3 = *S. aureus* ATCC 25923 + ECS PEG 23; Coluna 4 = MRSA + ECS GUARA 1 ; Coluna 5 = *S. aureus* ATCC 25923 + ECL GUARA 1; Coluna 6 = MRSA + ECL BC-A22.

5.5 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos brutos orgânicos

A avaliação da atividade citotóxica dos extratos brutos oriundos dos isolados de actinobactérias com atividade antimicrobiana nos ensaios de triagem secundária foi executada com o emprego de *A. salina* como organismo alvo. A Tabela 11 concentra os valores da DL_{50} das taxas de mortalidade dos náupilos do microcrustáceo obtidos nos testes.

Observa-se que dentre os extratos testados, o ECL de PEG 23, os ECS e o ECL de PEG 30 e o ECL de GUARA 1 se apresentaram citotóxicos a *A. salina* em concentrações inferiores, ou seja, com valores de DL_{50} < 1.000 ppm, segundo Meyer e colaboradores (1982). Os ECSs das morfoespécies BC-A22 e ADU 2.2 e os ECLs de ADU 1.3 e ADU 2.2 exibiram citotoxicidade superior a 20.000 ppm. O etanol e DMSO não foram tóxicos para os náupilos, evidenciando ausência de interferência desses solventes nos testes (dados não mostrados). Pode ser constatada uma ampla variação dos valores de DL_{50} entre os extratos derivados de um mesmo isolado de actinobactéria, com exceção de ambos extratos da morfoespécie ADU 2.2, cujo valor de DL_{50} foi idêntico (>20.000 ppm) (Tabela 11).

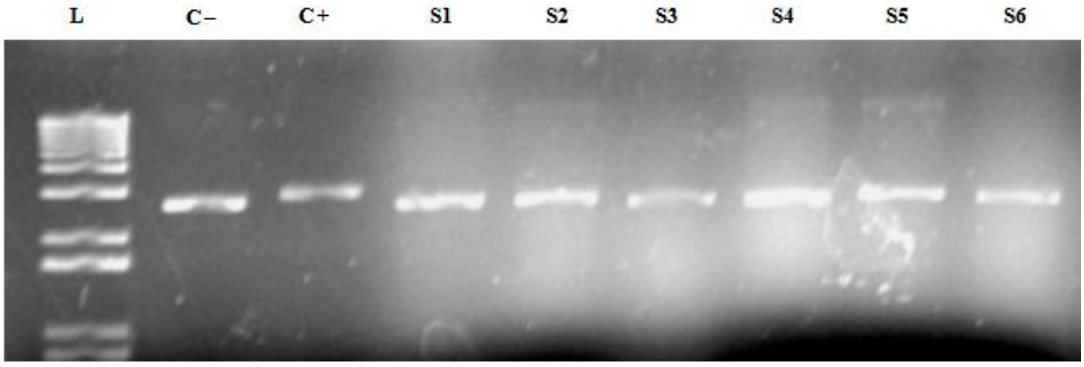
Tabela 11 – Valores de Dosagem Média Letal (DL_{50}) dos extratos brutos avaliados.

Isolados	Dosagem Letal Média (DL_{50}) em ppm	
	ECS	**ECL**
BC-A22	**>20.000€**	11.640
GUARA 1	**7.675€**	950
NIM 1	**8.500€**	2.065
PEG 23	**1.285€**	395
PEG 30	**400€**	115
ADU 1.3	7.325	**>20.000€**
ADU 2.2	**>20.000€**	**>20.000€**

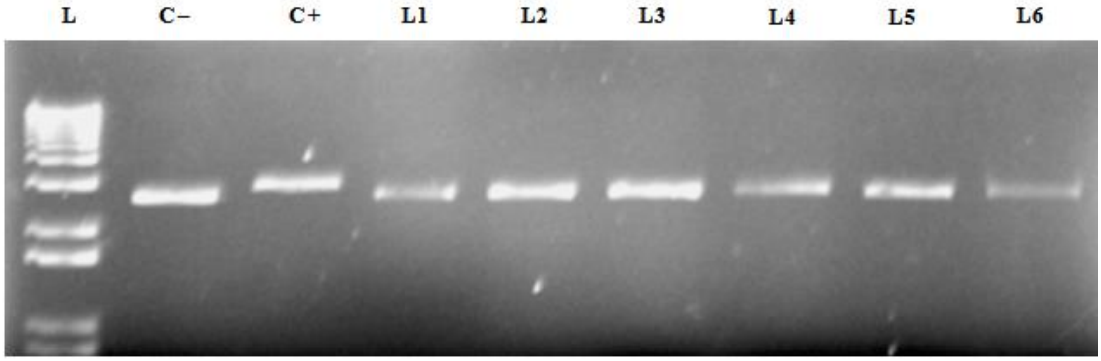
ppm = partes por milhão;
ECS = extrato obtido a partir do crescimento das actinobactérias em meio sólido;
ECL = extrato obtido a partir do crescimento das actinobactérias em meio líquido;
€ = valores de DL_{50} com menor citotoxicidade.

5.6 Detecção da ação intercalante dos extratos orgânicos brutos sob a molécula de DNA

Nenhum dos extratos brutos submetidos à etapa de triagem secundária da atividade antimicrobiana exibiu atividade intercalante na molécula de DNA alvo (plasmídeo pUC18 linearizado com *Eco*RI) pela técnica de *gel shift*. Esse resultado pode ser visualizado no gel de agarose após eletroforese (Figura 18) pela ausência de deslocamento do material genético quando previamente incubado com os extratos etanólicos, em comparação com os controles negativo e positivo. Assim, por esse ensaio, não foi detectado esse possível mecanismo de ação antitumoral das biomoléculas isoladas nos extratos.



(a)



(b)

Figura 18 – Perfil de migração do DNA alvo incubado com extratos brutos orgânicos com atividade antimicrobiana frente aos isolados clínicos de MRSA em eletroforese em gel de agarose a 0,7%. L = marcador de massa molecular (*ladder*) de 1 Kb; C **–** = controle negativo; C + = controle positivo. **(a)** Coluna S1 = ECS BC-A22; Coluna S2 = ECS GUARA 1; Coluna S3 = ECS NIM 1; Coluna S4 = ECS PEG 23; Coluna S5 = ECS PEG 30; Coluna S6 = ECS ADU 1.3. **(b)** Coluna L1 = ECL BC-A22; Coluna L2 = ECL GUARA 1; Coluna L3 = ECL NIM 1; Coluna L4 = ECL PEG 23; Coluna L5 = ECL PEG 30; Coluna L6 = ECL ADU 1.3.

5.7 Caracterização morfológica dos isolados de actinobactérias

5.7.1 Macromorfologia

Os sete isolados de actinobactérias que se destacaram nos ensaios de triagem secundária da atividade antimicrobiana foram caracterizados quanto aos seus aspectos culturais após crescimento nos meios específicos recomendados pelo ISP (Shirling & Gottlieb 1966) e classificados de acordo com o manual de identificação taxonômica de actinobactérias de Wink (2012). Todas as morfoespécies cresceram bem (micélio vegetativo) em todos os meios, com variação evidente nas cores e desenvolvimento dos micélios e pigmentos liberados. A produção de melanina não foi claramente detectada, todavia a presença de pigmentos de coloração acastanhada, possivelmente relacionados, foi observada. As imagens abaixo mostram as culturas de algumas das morfoespécies após 14 dias de crescimento em ágar ISP-2, tanto o micélio de superfície quanto o reverso da placa (Figura 19). Os resultados dessa etapa de caracterização morfológica estão agrupados nas Tabelas 12 e 13.

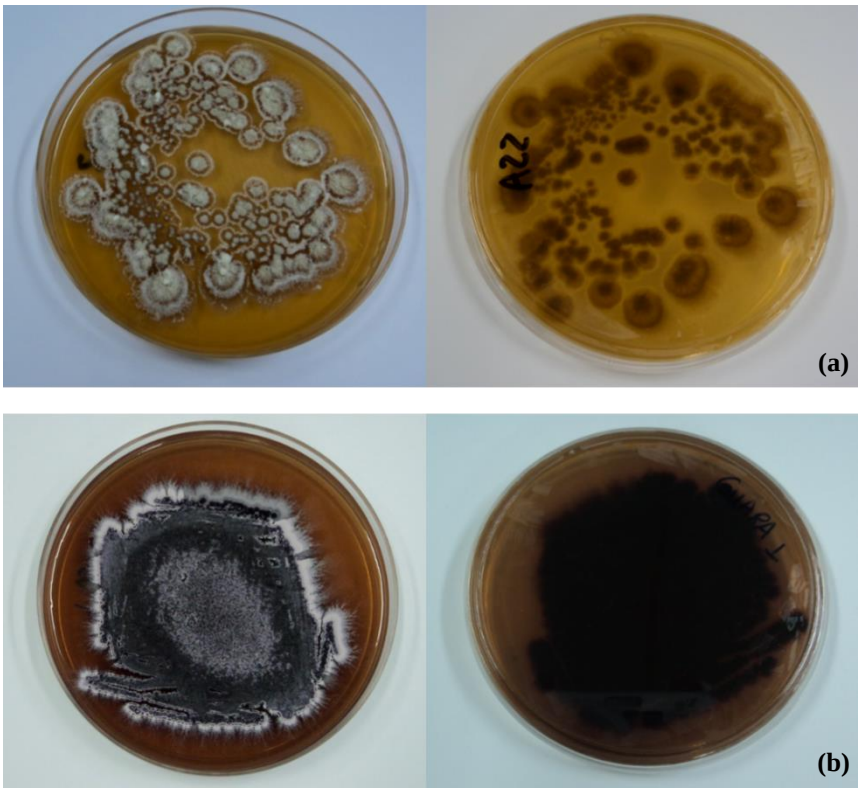


Figura 19 – Características culturais – micélio aéreo (esquerda) e reverso da placa (direita) – de alguns dos isolados de actinobactérias após cultivo em ágar ISP-2 por 14 dias a 30ºC: **(a)** BC-A22; **(b)** GUARA 1.

Tabela 12 – Padrão de cores do micélio aéreo e reverso da placa e produção de pigmentos solúveis dos isolados de actinobactérias crescidos nos meios de cultivo específicos da descrição macromorfológica.

	Meios de cultivo																	
	ISP-2			**ISP-3**			**ISP-4**			**ISP-5**			**ISP-6**			**ISP-7**		
Isolados	**MA**	**RP**	**PS**	**MA**	**RP**	**PS**	**MA**	**RP**	**PS**	**MA**	**RP**	**PS**	**MA**	**RP**	**PS**	**MA**	**RP**	**PS**
BC-A22	CzS	MA	MOc	CzC	MA	MOc	CzS	Bg	–	–	Mf	–	MA$^{\Delta}$	MS	Oc	VdP	MOl	MfC
GUARA 1	RxT	RxT	MOc	RxU	RxT	MOc	AL	VtS	MfC	AzL	VtS	RsC	CzPlt	MCz	OstC	LVm	RxVt	OstC
NIM 1	CzAg	RxVt	MOc	CzAg$^{\Delta}$	RxT	–	CzAg	VtCt	–	VtPst	VtCt	RsSl	CzAg	VtCt	MOc	CzAg	VtCt	MfC
PEG 23	TlCz4	VtCt	MOc	RxT$^{\Delta}$	RxT	–	CzPlt	VtS	–	CzPlt	VmE	RsC	CzPlt$^{\Delta}$	AmOc	–	CzAg	PtS	MfC
PEG 30	TlCz4	VtCt	MOc	TlCz4	RxVt	–	TlCz4	VtS	–	TlCz4	VmOx	VmBg	TlCz4	AmOc	–	TlCz4	MCz	MfC
ADU 1.3	CzS	MOc	–	CzS	AmAr	–	CzS	Mf	–	–	CzBg	Mf	–	AmAr	AmVs	CzS$^{\Delta}$	CzBg	Mf
ADU 2.2	CzPlt	AmAr	–	CzBs	CzBg	–	CzPlt	CzPd	–	–	MfC	–	–	Bg	–	CzPlt	BgAr	BgVd

MA = micélio aéreo; RP = reverso da placa; PS = pigmento solúvel; – = ausência; Δ = crescimento esparso.

Cores (conforme catálogo RAL K-7)**:**
AmAr = amarelo areia; AmOc = amarelo ocre; AmVs = amarelo vassoura; AzL = azul lilás; Bg = bege; BgAr = bege areia; BgVd = bege verde; CzAg = cinza ágata; CzBg = cinza bege; CzBs = cinza basalto; CzC = cinza claro; CzPd = cinza pedra; CzPlt = cinza platina; CzS = cinza seda; CzS = cinza sinal; LVm = lilás vermelho; MA = marrom argila; MCz = marrom cinza; Mf = marfim; MfC = marfim claro; MOc = marrom ocre; MOl = marrom oliva; MS = marrom sinal; OstC = ostra claro; PrS = preto sinal; RsC = rosa claro; RsSl = rosa salmão; RxT = roxo tráfico; RxU = roxo urze; RxVt = roxo violeta; TlCz4 = telecinza 4; VdP = verde pálido; VltS = violeta sinal; VmBg = vermelho bege; VmE = vermelho escuro; VmOx = vermelho óxido; VtCt = violeta clarete; VtPst = violeta pastel.

Tabela 13 – Produção de pigmento difusível relativo a melanina pelos isolados de actinobactérias crescidos nos meios de cultivo específicos na descrição macromorfológica.

Isolados	Meios de cultivo			
	ISP-6	**ISP-7**	**Ágar Suter + Tyr**	**Ágar Suter – Tyr**
BC-A22	+	+	+	+
GUARA 1	+	+	+	+
NIM 1	+	+	+	+
PEG 23	–	+	+	+
PEG 30	–	+	+	+
ADU 1.3	+	+	+	–
ADU 2.2	–	+	+	+

Tyr = tirosina; + = presença de pigmentação de cor marrom; – = ausência de pigmento de cor marrom.

5.7.2 Micromorfologia

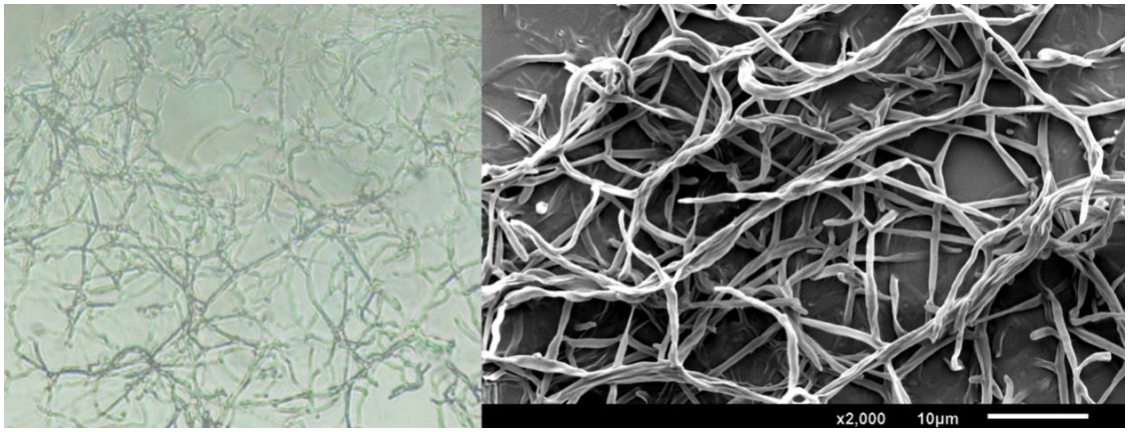
As características micromorfológicas das actinobactérias foram determinadas após observação das lamínulas enterradas em ágar ISP-2 cultivado, sob microscopia óptica de luz, com a concomitante comparação com o material de referência adotado (Miyadoh et al. 1997). Esses aspectos considerados estão listados na Tabela 14. Todas as morfoespécies apresentaram-se gram-positivas tanto pela coloração de Gram quanto pela técnica de Ryu.

Tabela 14 – Características micromorfológicas dos isolados de actinobactérias determinadas por microscopia óptica de luz.

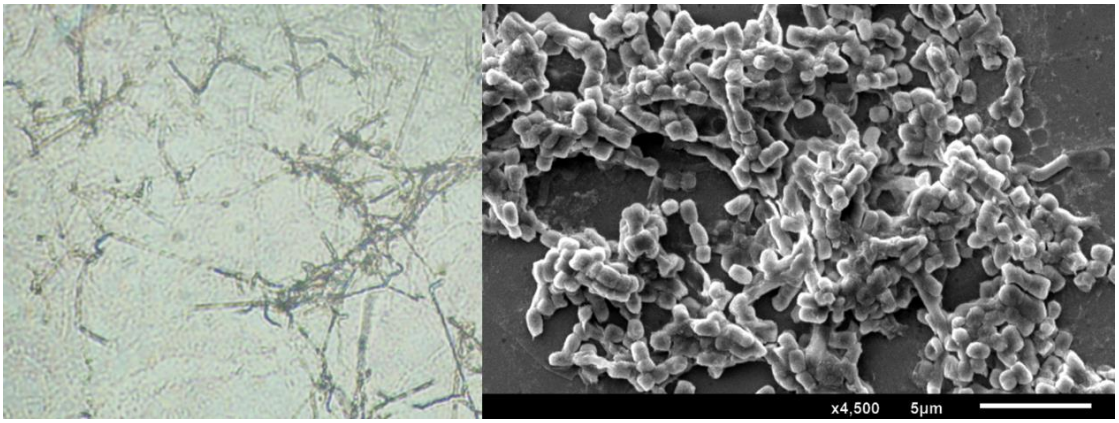
Isolados	Características micromorfológicas				
	Cadeia de esporos	**Esporângio**	**Esporos únicos**	**Fragmentação dos micélios**	**Morfologia da cadeia de esporos**
BC-A22	–	–	–	+	¥
GUARA 1	+	–	+	+	*Rectiflexibilis*
NIM 1	+	–	+	+	*Rectiflexibilis*
PEG 23	+	–	+	+	*Rectiflexibilis*
PEG 30	+	–	+	+	*Rectiflexibilis*
ADU 1.3	+	–	+	+	*Rectiflexibilis*
ADU 2.2	+	–	+	+	*Rectiflexibilis*

+ = presente; – = ausente; ¥ = indeterminado.

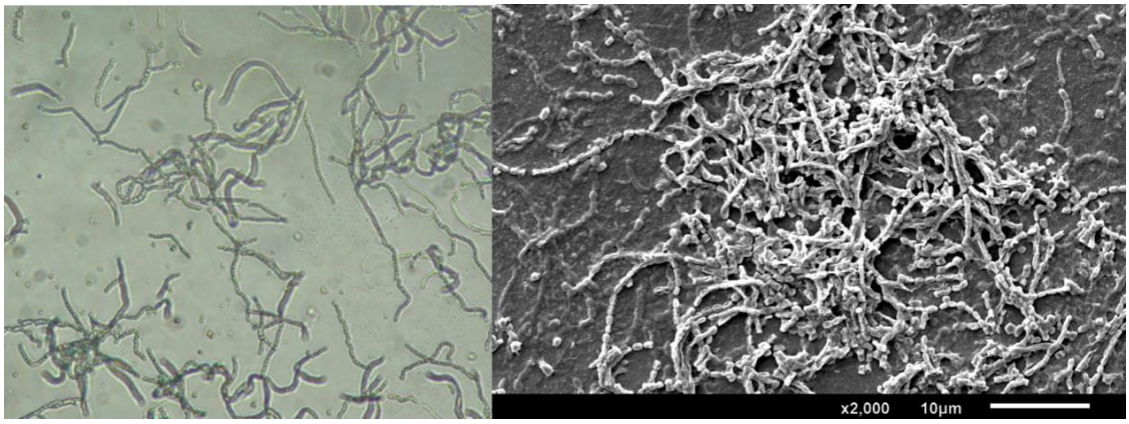
Reunindo-se os dados obtidos com a análise classificatória dos caracteres micromorfológicos, as imagens do crescimento micelial sob microscopia óptica direta e as micrografias eletrônicas obtidas (Figura 20), sugere-se que os isolados GUARA 1, NIM 1, PEG 23, PEG 30, ADU 1.3 e ADU 2.2 pertençam ao gênero *Streptomyces*. O padrão de fragmentação das hifas em esporos e o aspecto das cadeias dos mesmos foram as duas características fundamentais que auxiliaram nessa conclusão. Para esses isolados, a superfície dos esporos apresentou-se lisa, sem aparente ornamentação, e a morfologia da cadeia dos mesmos foi classificada como *rectiflexibilis*, isto é, são retas ou parcialmente flexíveis no arranjo micelial. Apenas a presença de longas hifas e sem a aparente fragmentação em cadeia de esporos e de esporos únicos foram verificadas para a morfoespécie BC-A22. Infelizmente, nenhuma estrutura de esporângios clássica foi observada, o que orientaria nos possíveis gêneros aos quais essa amostra poderia ser classificada, como membro do "genera" *Actinoplanetes*.



(a)

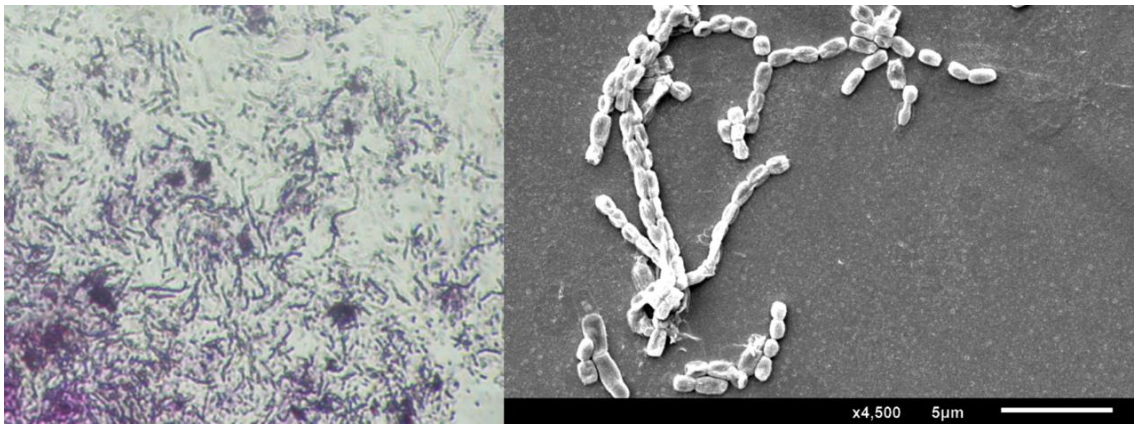


(b)

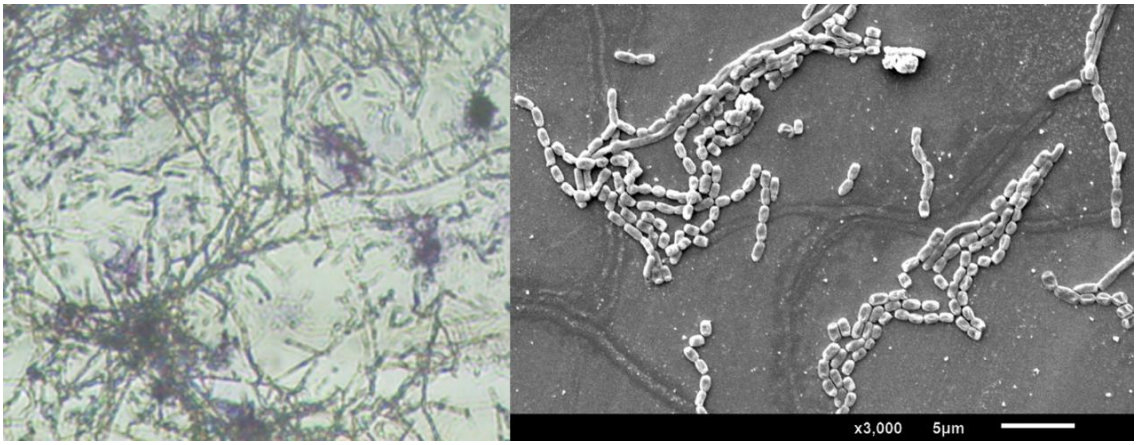


(c)

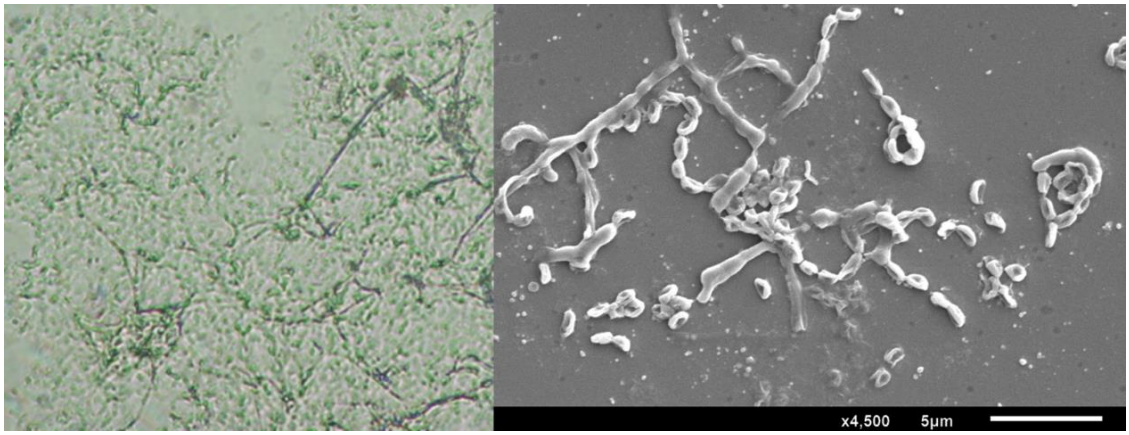
Continuação da Figura 20.



(d)

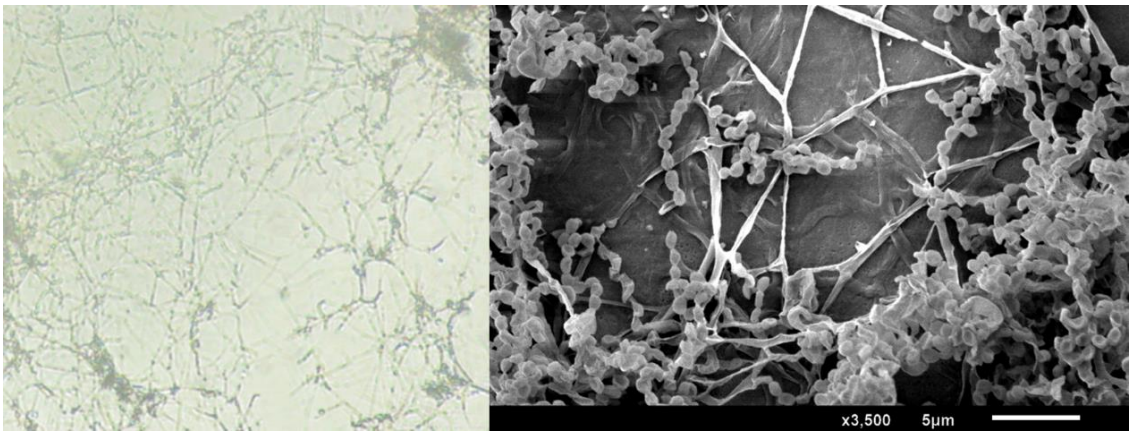


(e)



(f)

Continuação da Figura 20.



(g)

Figura 20 – Micrografias das estruturas morfológicas dos potenciais isolados de actinobactérias cultivados em ágar ISP-2 (14 dias, 30ºC) conforme a técnica da lamínula enterrada por microscopia óptica de luz (à esquerda, aumento de 4.000x) e microscopia eletrônica de varredura (à direita, aumento informado abaixo da imagem): **(a)** BC-A22; **(b)** GUARA 1; **(c)** NIM 1; **(d)** PEG 23; **(e)** PEG 30; **(f)** ADU 1.3; **(g)** ADU 2.2.

5.8 Caracterização fisiológica/bioquímica dos isolados de actinobactérias

A fenotipagem clássica dos isolados de actinobactérias selecionados também foi efetuada pela caracterização fisiológica e bioquímica, a qual consisitiu em uma série de provas de avaliação do crescimento frente a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, condições de resistência (compostos químicos e antimicrobianos) e de tolerância (faixas de pH e salinidade), empregando-se o painel da Microplaca^{TM} GEN III (Biolog) e complementação com alguns testes manuais de tolerância e de atividade enzimática. Os resultados dessa etapa da taxonomia estão reunidos a seguir (Tabela 15). A maior parte das morfoespécies metabolizou as fontes de carbono e nitrogênio. Esses resultados variaram entre os isolados, mais siginificativamente, quanto a sensibilidade aos agentes químicos e antimicrobianos.

Tabela 15 – Diferentes características fenotípicas (fisiológicas e bioquímicas) dos isolados de actinobactérias.

	Isolados						
Características	BC-A22	GUARA 1	NIM 1	PEG 23	PEG 30	ADU 1.3	ADU 2.2
Testes enzimáticos e de degradação							
Amido	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+	–	+
DNA	+	+	+	+	+	+	+
RNA	+	+	+	+	+	+	+
Uréia	–	+	+	+	+	+	+
Ácido úrico	–	+	+	+	–	+	+
Esculina	–	+	+	+	+	+	+
Redução de nitrato	–	+	–	+	+	–	–
Produção de catalase	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio							
Dextrina	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+
D-celobiose	+	+	+	+	–	+	+
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+
D-turanose	+	+	+	+	+	+	+
Estaquiose	+	+	+	+	+	+	–
D-rafinose	+	+	+	+	+	+	+
α-D-lactose	+	+	+	+	+	+	+

Continuação da Tabela 15.

Características	Isolados						
	BC-A22	GUARA 1	NIM 1	PEG 23	PEG 30	ADU 1.3	ADU 2.2
D-melibiose	+	+	+	+	+	+	+
β-metil-D-glicosídeo	+	+	+	+	–	+	+
D-salicina	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-D-glicosamina	+	+	+	+	–	+	+
N-acetil-D-manosamina	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-D-galactosamina	+	+	+	+	+	–	+
Ácido N-acetil neuramínico	+	+	+	+	+	–	+
α-D-glucose	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+
3-metilglucose	+	+	+	+	+	–	+
D-fucose	+	+	+	+	+	+	+
L-fucose	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	–	+
Inosina	+	+	+	+	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+
D-arabitol	+	+	+	+	+	+	+
Mio-inositol	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+
Glicose-6-PO_4	+	+	+	+	+	+	+
D-Frutose-6-PO_4	+	+	+	+	+	+	–
Ácido D-aspártico	+	+	+	+	+	–	+
D-serina	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+

Continuação da Tabela 15.

Características	Isolados						
	BC-A22	GUARA 1	NIM 1	PEG 23	PEG 30	ADU 1.3	ADU 2.2
Glicil-L-prolina	+	+	+	+	+	+	–
L-alanina	+	+	+	+	+	+	+
L-arginina	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-aspártico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-glutâmico	+	+	+	+	+	+	+
L-histidina	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-piroglutâmico	+	+	+	+	+	–	+
L-serina	+	+	+	+	+	+	+
Pectina	+	+	+	+	–	+	+
Ácido D-galacturônico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-galactônico lactona	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-glucônico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-glucorônico	+	+	+	+	+	+	+
Glucoronamida	+	+	+	+	+	+	+
Ácido múcico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido quínico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-sacárico	+	+	+	+	+	+	+
p-hidroxil-ácido fenilacético	+	+	+	+	+	+	+
Metilpiruvato	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-láctico metil éster	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-láctico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido cítrico	+	+	+	+	+	–	+
Ácido α-cetoglutárico	+	+	+	+	+	–	+
Ácido D-málico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-málico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido bromo-succínico	+	+	+	+	+	+	+

Continuação da Tabela 15.

Características	Isolados						
	BC-A22	GUARA 1	NIM 1	PEG 23	PEG 30	ADU 1.3	ADU 2.2
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+
Ácido gama-aminobutírico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido hidroxi-butírico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D,L-β-hidroxibutírico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido α-cetobutírico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido acetoacético	+	+	+	+	+	+	+
Ácido propiônico	+	–	+	+	+	+	+
Ácido acético	+	–	+	+	+	+	+
Sensibilidade a antimicrobianos							
Ácido fusídico	+	–	–	–	–	+	+
Ácido nalidíxico	+	–	+	+	–	+	+
Aztreonam	+	–	–	+	–	+	+
Lincomicina	+	+	–	–	–	+	+
Minociclina	+	–	–	–	–	+	+
Rifamicina	+	–	+	+	+	+	+
Troleandomicina	+	–	–	–	–	+	+
Vancomicina	+	–	–	–	–	+	+
Sensibilidade a agentes químicos							
Lactato de sódio 1,0%	+	+	+	+	+	+	+
D-serina	+	–	–	–	–	+	+
Niaproof 4	+	–	–	–	–	+	–
Azul de tetrazólio	+	–	+	–	+	+	+

Continuação da Tabela 15.

Características	Isolados						
	BC-A22	GUARA 1	NIM 1	PEG 23	PEG 30	ADU 1.3	ADU 2.2
Violeta de tetrazólio	+	+	+	+	+	+	+
Hidrocloreto de guanidina	+	–	–	–	+	+	+
Cloreto de lítio	+	–	+	–	+	+	+
Telurito de potássio	+	–	–	–	+	+	+
Butirato de potássio	+	–	+	–	–	+	+
Bromato de sódio	+	–	+	–	–	–	+
Controles							
Positivo	+	+	+	+	+	+	+
Negativo	–	–	–	–	–	–	–
Testes de tolerância							
pH 4,0	–	–	–	–	–	–	–
pH 5,0	+++	–	–	–	–	++	+++
pH 7,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 9,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
pH 11,0	++	+++	+++	+++	+++	++	++
NaCl 0%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NaCl 2,5%	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NaCl 5,0%	–	++	++	++	++	++	++
NaCl 7,5%	–	+	+	+	+	+	+
NaCl 10,0%	–	–	–	–	–	–	–

Para os testes enzimáticos e de degradação, de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio e sensibilidade a antimicrobianos e agentes químicos:
+ = presença de crescimento/positividade para o teste; – = ausência de crescimento/negatividade para o teste.
Para os testes de tolerância:
+ = presença apenas de micélio vegetativo; ++ = presença de micélio vegetativo e micélio aéreo em desenvolvimento; +++ = ótimo desenvolvimento dos micélios vegetativo e aéreo; – = ausência de crescimento.

5.9 Caracterização molecular dos isolados de actinobactérias

Em decorrência de problemas na padronização da PCR, apenas o isolado ADU 1.3 foi identificado molecularmente com base na comparação de sua sequência parcial do 16S rDNA com outras presentes no banco de dados do *GenBank*, pela aplicação da ferramenta de bioinformática BLASTn. O segmento desse marcador molecular apresentou o mesmo valor de elevada identidade (91%) com várias de *Streptomyces* sp. (Tabela 16), além de idênticos valores de cobertura de sequência e *E-value*.

Tabela 16 – Identificação do isolado ADU 1.3 com base na comparação da sequência de 16S rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados do *GenBank* (análise BLASTn).

Isolado	Resultado BLASTn	Identidade	Número de acesso
ADU 1.3	*Streptomyces* sp.	91%	FVWUH61S014

6 DISCUSSÃO

Esse estudo foi fundamentado na estratégia tradicional de bioprospecção de metabólitos com atividades antimicrobiana e citotóxica. O grupo selecionado de micro-organismos para essa pesquisa foram as actinobactérias, a fonte principal da maioria dos antimicrobianos em uso clínico atualmente, assim como uma parcela apreciável das drogas antitumorais. De um modo geral, a varredura por essas bioatividades foi sistematizada em práticos ensaios fenotípicos *in vitro* de triagem.

Como outros processos de prospecção da diversidade microbiana, o trabalho foi iniciado com o isolamento dos micro-organismos. O solo do Cerrado goiano foi escolhido como essa fonte ambiental. Das várias amostras coletadas nos meses de estação seca do ano de 2013, aquele referente ao do Bosque Saint-Hilarie do Campus Samambaia da UFG foi selecionado, aleatoriamente, para essa etapa.

A relativa alta taxa de morfoespécies resultantes (19) evidencia a eficácia do método de isolamento aplicado. Entre 24-96 h de incubação a 30ºC, as placas de cultivo iniciais demonstraram um crescimento microbiano não muito denso e, consequentemente, foi possível selecionar colônias características com maior segurança. Dois fatores provavelmente influenciaram diretamente para o êxito nessa fase: o pré-tratamento com calor seco, o qual eliminou contaminantes bacterianos e fúngicos que certamente inibiriam o desenvolvimento das actinobactérias; e o fundamento da técnica, isto é, a seleção de membros do grupo *Actinoplanetes* e relacionados produtores de esporos móveis, os quais se enquadram também como "actinobactérias raras", grupo que tem recebido maior atenção para a pesquisa por novos antibióticos.

Seong e colaboradores (2001) enfatizam a importância de se adaptar o próprio método de isolamento pela integração de diversas formas de pré-tratamento e meios de cultura especiais para encontro de "cepas raras". Em habitats naturais de solo, estreptomicetos constituem a população predominante de actinobactérias. A principal forma de isolamento tradicional, a diluição seriada do solo e respectivo plaqueamento das suspensões preparadas, não é efetiva para a seleção de membros de outros gêneros de *Actinomycetes*. Por isso, é necessário aprimorar as metodologias de isolamento desses micro-organismos, seja com alternativas de pré-tratamento, o enriquecimento, ou ainda pela alteração do meio do cultivo, como por adição de antimicrobianos ou fatores essenciais específicos para certos grupos microbianos (Hayakawa 2008).

De modo amplo, membros do "genera" *Actinoplanetes* não são geralmente recuperados quando é efetuado o isolamento de actinobactérias do solo e de outros substratos pela diluição seriada da amostra de solo. Nesse sentido, o método de Palleroni (1976a; 1976b) é relativamente simples, demanda um tempo menor de realização e é uma interessante opção às técnicas para atração dos propágulos flagelados dessas actinobactérias através de "iscas", como pólen (Hayakawa et al. 1991). Outra vantagem desse método é a dispensabilidade de adição de antifúngicos e outros antimicrobianos, uma vez que o isolamento seja monitorado constantemente e que as colônias características de *Actinoplanetes* já sejam purificadas logo nos primeiros dias de cultivo (Palleroni 1980).

O meio ágar AC adotado não é altamente seletivo, no entanto, é uma opção prática e adequada para o isolamento. Kuster & Williams (1964) relatam que meios com amido e glicerol como fonte de carbono e caseína, arginina e nitrato como fonte de nitrogênio possibilitam um adequado desenvolvimento de actinobactérias e até mesmo supressão de outras bactérias. Segundo Korn-Wendish & Kutzner (1992), a maior parte das actinobactérias hidrolizam amido e, logo, esse polissacarídeo constitui uma fonte de carbono seletiva para esses procariotos, ainda mais quando associado com nitrato, também preferencialmente assimilado como fonte de nitrogênio por membros desse filo.

A xilose foi escolhida como quimioatraente em vista de bactérias do gênero *Actinoplanes* serem capazes de consumir esse sacarídeo como fonte de carbono primária, devido à peculiar produção da enzima xilose isomerase. Tal evidência sugere um papel ecológico desses micro-organismos na degradação de pentoses de origem vegetal e, claramente, fundamenta sua atração pelo carboidrato (Parenti & Coronelli 1979). Além da competência em catabolizar esse açúcar, nem todas as espécies conhecidas de *Actinoplanetes* exibem atração quimiotática por íons haletos (cloreto, brometo). Em um estudo prévio executado pelo presente grupo de pesquisa, Lima (2007) comparou o emprego de xilose e de cloreto de potássio como quimioatraentes e isolou um maior número de actinobactérias quando a pentose foi adotada. Esse padrão de diferença de afinidade química também foi observado por Palleroni (1976b) no seu trabalho pioneiro de padronização do método. O autor em questão examinou que isolados de *Actinoplanes* de solos áridos e de desertos não empregavam o íon cloreto e nenhuma resposta quimiotática ao cloreto de potássio (KCl), algo que era verificado para as amostras microbianas que ocorriam em ambientes aquáticos, o que pode ser explicado pela origem ecológica desse grupo. Dessa maneira, o conhecimento das propriedades físico-químicas do solo se faz precisa para a seleção do agente quimiotático.

Há de se relevar também que esporos de outros gêneros relacionados podem se depositar nos capilares e serem ressuspensos na etapa de lavagem, ora pela mobilidade dos zoósporos, ou então por pequenas populações bacterianas que flutuam na água adicionada nas cavidades da câmara quimiotática (Palleroni 1976a; Gallinger et al. 1995). Em outras palavras, o método não é plenamente seletivo e, possivelmente, actinobactérias que não pertençam ao "genera" *Actinoplanetes* podem ser eventualmente purificadas.

Semêdo e colaboradores (2001) sugerem a existência de uma alta diversidade de actinobactérias em solos tropicais, escassamente pesquisados sob o aspecto microbiológico. O fato de o Cerrado ter sido tão pouco estudado quanto à estrutura de suas comunidades bacterianas e a descoberta de isolados de *Actinobacteria* não comumente relatados reforça a necessidade de trabalhos centrados nesse sentido. Os mesmos podem sustentar iniciativas novas visando à conservação desse macrobioma e, principalmente, o aproveitamento de uma vasta e inexplorada gama de potencialidades biotecnológicas a partir dos micro-organismos que o habitam. Um conveniente empreendimento seria a criação de um projeto microbioma ou de uma coleção de culturas com as amostras microbianas provenientes desse domínio fitogeográfico.

Após a purificação e o devido armazenamento dos isolados de actinobactérias, foi principiada a primeira fase de triagem da atividade antimicrobiana. Na literatura comumente se observa duas opções metodológicas para essa varredura inicial da ação antagonista: o método de blocos de gelose de ágar ("*agar piece technique*") ou a técnica de estria cruzada ("*cross-streak technique*") (Arifuzzaman et al. 2010). A primeira variante foi preferida em vista da possibilidade de mensurar de modo mais exato os diâmetros dos halos de inibição do crescimento dos micro-organismos indicadores. Assim, um certo caráter quantitativo parcial pode ser atribuído ao teste, mediante a comparação das regiões de inibição obtidas com os valores definidos do tamanho das mesmas, como estabelecido segundo Matsuura (2004).

Historicamente, a estratégia mais comum para triagem de novos candidatos à drogas antibióticas e outras moléculas com fins terapêuticos a partir de micro-organismos do solo consiste na literal dissecação empírica de um número enorme de isolados. O processo, apesar de nos primeiros anos ter surtido ótimos resultados, é extremamente laborioso e dispendioso. Com as atuais ferramentas genômicas e a visão voltada para ambientes inexplorados e seleção das "actinobactérias raras", tempo pode ser economizado e as chances de sucesso são maiores no encontro de espécies taxonomicamente novas e com significativas atividades biológicas (Goodfellow & Fiedler 2010; Genniloud et al. 2011). No atual contexto de procura por metabólitos bioativos, é fundamental a adoção de estratégias de dereplicação,

ou seja, o reconhecimento e eliminação desses compostos ou até micro-organismos já caracterizados nas fases iniciais dos processos de triagem (Ito & Masubuchi 2014). Entretanto, em vista das nossas atuais condições de pesquisa, ainda não foi exequível lançar mão de abordagens de dereplicação mais sofisticadas, como o HPLC e a espectrometria de massas. Contudo, o próprio método de isolamento aplicado já pode ser concebido como uma dessas estratégias, uma vez que é focado para um grupo específico de membros da ordem *Actinomycetales* também conceituados como "raros" e, logo, visa a recuperação de amostras microbianas ainda talvez não caracterizadas taxonômica e metabolicamente.

As actinobactérias isoladas da amostra de solo de Cerrado foram avaliadas pela técnica dos *plugs* quanto a sua ação antimicrobiana. Cinco isolados (31,25%) exibiram atividade. A morfoespécie BC-A22 sobressaiu por apresentar uma alta ação antagônica frente às bactérias gram-positivas, inclusive MRSA. Distingue-se também por ser capaz de inibir, em menor extensão, o crescimento de cepas gram-negativas. É relativamente comum e até esperado em sistemas de prospecção por novas drogas antimicrobianas a partir de micro-organismos do solo, uma ação predominantemente frente às bactérias gram-positivas. Zitouni e colaboradores (2003) sugerem que os actinomicetos possuam uma característica de gradação decrescente de sua atividade inibitória, conforme a seguinte escala: bactérias gram-positivas > fungos > bactérias gram-negativas.

Essa hierarquização quanto à bioatividade desses isolados ambientais frente as bactérias gram-positivas e gram-negativas pode ter sua origem atribuída às diferenças morfológicas existentes entre esses micro-organismos: enquanto os gram-negativos possuem uma membrana externa lipopolissacarídica na parede celular, os gram-positivos apenas têm uma camada de peptideoglicano espessa, a qual não constituiria uma barreira de proteção efetiva (Gebreyohannes et al. 2013). Enfatiza-se também a elevada taxa de resistência intrínseca das bactérias gram-negativas a vários antimicrobianos e a existência de misturas de produtos microbianos bioativos em triagens sem outras etapas de fracionamento e purificação, as quais contêm substâncias estrutural e funcionalmente similares a algumas das drogas antibacterianas já existentes (Basilio et al. 2003).

Contudo, pode-se concretamente tentar explicar que a possível origem dessa diferença de sensibilidade bacteriana para as biomoléculas microbianas com ação antibiótica está justamente na origem dos micro-organismos gram-positivos e gram-negativos. Gupta (2000) propõe que as bactérias com uma dupla camada de membranas (ou didérmicas), as gram-negativas, em conjunto com as arqueobactérias, evoluíram a partir das bactérias com uma única membrana (ou monodérmicas), as gram-positivas, em vista da pressão seletiva

imposta pela produção de compostos antibióticos pelas bactérias gram-positivas presentes nos ambientes. Esse mecanismo de defesa teria culminando em uma divergência evolutiva a qual resultou nos reconhecidos grandes táxons bacterianos.

Segundo o autor, a hipótese é sustentada por certos argumentos, como: (i) procariotos monodérmicos, que englobam membros do gênero *Streptomyces,* são os principais produtores dos antibióticos conhecidos; (ii) os micro-organismos geradores desses metabólitos apresentam enorme vantagem seletiva sobre as cepas não produtoras e sensíveis a esses compostos; (iii) a resistência aos antimicrobianos surge como resultado de uma variedade de diferentes mecanismos; e, finalmente, (v) cepas gram-positivas sempre se apresentaram mais suscetíveis aos antimicrobianos em relação às bactérias gram-negativas (Gupta 2011). Inclusive, as primeiras drogas antibióticas eficazes para o tratamento de infecções por micro-organismos gram-negativos apareceram um pouco mais tardiamente na linha do tempo da antibioticoterapia, inicialmente, na forma de fármacos com o espectro de ação expandido e, após, como derivados semissintéticos das classes pioneiras. Além disso, o autor evidencia que a sua proposição tem um sentido biológico mais coerente do que as classificações estritamente baseadas em marcadores moleculares altamente conservados nos genomas bacterianos, como o rRNA, e as ideias previamente sugeridas de endossimbiose entre os táxons de procariotos. Considerando as reais funções das pequenas moléculas microbianas bioativas na evolução e ecologia dos organismos que as produzem, essa hipótese está em perfeita consonância.

Os isolados ADU 1.3, ADU 2.2, PEG 23, PEG 30 e NIM 1 exibiram um espectro de atividade antibacteriana similar ao que foi observado por Lima (2007) e Rodrigues (2009), que efetuaram testes *in vitro* de varredura primária da ação antibiótica dessas morfoespécies e, portanto, avaliaram parcialmente a ação antimicrobiana de tais isolados. Um resultado inédito do presente estudo foi o fato de ter sido ampliado o painel de micro-organismos indicadores, o qual inclui cepas de fungos, tanto leveduriforme quanto filamentosos e, inclusive, foi observada atividade antifúngica para várias das morfoespécies. Por sua vez, o isolado do mangue capixaba, GUARA 1, exibiu uma moderada antibiose nessa fase de prospecção.

Concluída a produção e extração das substâncias bioativas das oito morfoespécies de actinobactérias selecionadas nos testes iniciais, os extratos brutos orgânicos obtidos, ECSs e ECLs, foram avaliados frente a *S. aureus* e MRSA. De maneira geral, observou-se um ligeiro aumento do nível de bioatividade dos ECLs quando confrontado com os resultados adquiridos com os ECSs.

A biossíntese de antibióticos é uma propriedade específica dos micro-organismos produtores e depende muito das condições das culturas (Furlan 1997). É fundamental a busca por parâmetros de cultivo ideais para tornar possível uma melhor produção das biomoléculas ativas. A composição dos meios de cultura, como as fontes de carbono, nitrogênio e fosfato, presença de elementos-traço, pH e temperatura, tempo de cultivo e oferta de oxigênio, constituem basicamente essas variáveis (Iwai & Omura 1982; Reddy et al. 2011). Vijayakumar e colaboradores (2012) mencionam que a atividade antimicrobiana de compostos gerados por actinobactérias varia essencialmente dependendo das amostras microbianas que os sintetizam, o solvente de extração empregado e da natureza dos patógenos e demais organismos-alvo testados.

O cultivo bacteriano em meios em diferentes estados físicos também é uma estratégia para otimizar a geração dos metabólitos antibióticos para então se proceder com a apropriada extração dos compostos. Classicamente, o crescimento em culturas líquidas sempre consistiu na primeira opção para a produção, particularmente pela possibilidade de ser moldado para uma maior escala. No entanto, é bem caracterizada a existência de isolados microbianos, particularmente do solo, que quando crescidos em meios sólidos, acabam exibindo níveis superiores de ação inibitória e assim como a geração de produtos naturais totalmente diferentes em detrimento com os produzidos em caldos. Isso pode ser perfeitamente justificado pelo estilo de vida desses micro-organismos em seus habitats naturais. Actinobactérias, fungos filamentosos e outras bactérias vivem em agregados bem estruturados com as partículas de solo, o que fornece vantagens aos organismos residentes, como proteção à predação, concentração dos nutrientes disponíveis e fácil modificação do microambiente, como pH e aperfeiçoamento das condições de crescimento (Maier & Pepper 2009). Aqui está provavelmente a explicação da significativa melhor atividade biológica do ECS do isolado BC-A22 quando em comparação com o seu ECL.

Os extratos da morfoespécie BC-A1 não apresentaram atividade antimicrobiana frente à cepa-padrão de *S. aureus* e os isolados de MRSA. Okudoh & Wallis (2007) sugerem que a perda da ação antibiótica em ensaios de caráter secundário pode se atribuída a algumas interferências do processo como um todo, desde a preparação do filtrado, a composição dos meios de cultura e as circunstâncias de cultivo. Outro motivo plausível para o desaparecimento da bioatividade de BC-A1 pode estar associado a já comentada variação da antibiose provocada entre os ECSs e ECLs. Em testes primários, os compostos antibióticos estão na sua fase de produção e concentrados na massa microbiana em desenvolvimento e, geralmente, filtrados livres de células são aplicados nas etapas de *screening* secundário. O

aspecto a ser realçado mais uma vez é que essas biomoléculas ativas estão intimamente relacionadas ao crescimento micelial e não tanto quanto à sua liberação nos caldos de fermentação e, certamente, os extratos que se originaram a partir do meio líquido não terão a mesma potência em relação ao próprio crescimento celular. Essa observação não é de cunho randômico e está diretamente correlata com o real papel natural desses metabólitos na morfogênese, fisiologia e estilo de vida desses micro-organismos (Omoto et al. 1979; Shomura et al. 1979).

Não se pode desprezar a incontestável superioridade na qualidade dos ensaios secundários com os extratos brutos em relação aos testes com os pequenos blocos de ágar cultivado. A principal evidência desse avanço está na melhor nitidez dos halos gerados pelas soluções etanólicas do que em relação aos provocados pelos *plugs*. Isso decorre especialmente: (i) da maior difusão dos compostos que são liberados nos caldos de fermentação quando os mesmos são ressuspensos em solução aquosa; e (ii) da concentração das porções filtradas e tratadas com os solventes. A opção pela variante da técnica de difusão se fundamenta na simplicidade do procedimento e da dispensabilidade dos discos de papel filtro. Além disso, existe o risco dos metabólitos antimicrobianos se depositarem nos discos em vista da precipitação concomitante de algum composto hidrofóbico, o que preveniria a propagação das biomoléculas no ágar. Ressalta-se que em vista do papel filtro dos discos ter a superfície hidrofílica, as substâncias com atividade que possuírem caráter catiônico não poderão também se difundir. Em vista dessa viabilidade, esses métodos baseados na difusão em ágar e suas variantes foram e até hoje são a primeira alternativa nos estágios iniciais de seleção de produtos naturais com ação antimicrobiana (Fiedler 2004; Valgas et al. 2006).

Inúmeros trabalhos veem focando na procura de actinobactérias produtoras de metabólitos secundários com especial potencial anti-MRSA. Yoo e colaboradores (2007) caracterizaram a laidlomicina ($C_{37}H_{62}O_{12}Na$), um antibiótico gerado por um isolado de *Streptomyces* sp. de solo coreano com uma exclusiva ação antagonista frente a MRSA e VRE notavelmente maior do que a oxacilina e vancomicina, respectivamente, o que foi observado pelos baixíssimos valores de MIC encontrados. Higginbotham & Murphy (2009) avaliaram a excelente ação frente a esse patógeno gram-positivo de um novo representante de *Streptomyces globosus* do solo cambojano que gerava uma substância quimicamente relacionada aos aminoglicosídeos. Contudo, essa biomolécula possui um espectro de ação totalmente diferente às demais moléculas da referida classe, uma vez que as mesmas que estão hoje em uso clínico não apresentam uma atividade tão marcadamente elevada frente a variante multirresistente do coco. Em uma varredura sistemática por antibióticos ativos contra *S.*

aureus multirresistentes de origem clínica, incluindo VISA, a partir da coleção de sobrenadantes de culturas de actinobactérias do IMC (*Institute of Microbial Chemistry*), situado em Tóquio, Hiramatsu e colaboradores (2012) reisolaram um composto, nibomicina, já caracterizada quimicamente desde os anos 1950 só que nunca empregada clinicamente. Essa substância exibiu a impressionante ação de reverter a um fenótipo de suscetibilidade a quinolonas, singularmente fluoquinolonas, cepas multirresistentes de *S. aureus*, fomentando as esperanças de obtenção de uma nova classe de drogas antimicrobianas reservadas para o tratamento de infecções desencadeadas por esse patógeno. É importante reforçar que os exemplos descritos são de metabólitos ativos especificamente para MRSA e outras bactérias gram-positivas e que ainda não entraram na fase de ensaios clínicos.

É evidente no levantamento bibliográfico realizado os poucos trabalhos realizados em relação à pesquisa do potencial bioativo de actinobactérias do solo do Cerrado goiano. As publicações existentes de prospecção de actinobactérias de solos brasileiros têm focado em enzimas de interesse biotecnológico (Sobrinho Jr. et al. 2005; Coelho et al. 2012). Com exceção dos estudos anteriormente efetuados pelo presente grupo de pesquisa, o que pode ser feito é estabelecer um paralelo com outros trabalhos de caracterização da atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de regiões do mundo com características climáticas e de solos semelhantes ao desse domínio fitogeográfico brasileiro, isto é, com aspectos gerais de savanas.

Boudjelal e colaboradores (2011; 2012) isolaram actinobactérias das espécies semi-halofílicas *Actinoallotheicus* e *Saccharomonospora* de solos do Saara argelino, os quais exibiram elevado grau de ação antagônica de amplo espectro contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, com a detecção de duas frações bioativas com componentes aminoglicosídicos e ftalatos no primeiro trabalho. Elleuch e colaboradores (2013) caracterizaram estruturalmente lipopetídeos cíclicos produzidos por um isolado de *Streptomyces* sp. de solo do sul da Tunísia, selecionado após a triagem primária, devido ao seu espectro abrangente de atividade antimicrobiana. Kumar e colaboradores (2014) procederam com o isolamento de actinobactérias a partir do solo do distrito de Tiruvanamalai, do estado indiano de Tamil Nadu, área que se assemelha muito com o Cerrado goiano quanto ao clima, geografia e solo. Os autores recuperaram uma cepa de *Streptomyces* sp. com ação predominante frente a bactérias gram-positivas, inclusive MRSA, e bactérias gram-negativas. Foi identificado um composto 2,4-bis(dimetil)-fenol, certamente o princípio ativo, na fração do extrato metanólico do estreptomiceto.

Um progresso expressivo na pesquisa por produtos naturais de actinobactérias oriundas de mares e oceanos, singularmente de sedimentos, vem acontecendo nos últimos anos (Bull & Stach 2007). Isso se reflete na descrição de vários novos representantes desse filo, particularmente de manguezais (Huang et al. 2008; Hu et al. 2011; Ahmed et al. 2013; Goodfellow et al. 2013; Lee et al. 2014b). Vários novos metabólitos secundários de actinobactérias residentes de mangue estão sendo caracterizados e diversos deles apresentam uma extensa gama de atividades farmacológicas, principalmente como antitumorais efetivos para o tratamento de tumores malignos (salinosporamidas, marinomicinas, proximicinas); antimicrobianos eficazes para a terapêutica de infecções por bactérias multirresistentes (abissomicinas); além de imunossupressores, inibidores enzimáticos e enzimas com ação antineoplásica (Williams 2009; Amrita et al. 2012; Xu et al. 2014; Xu 2015).

Vieira e colaboradores (2013) realizaram o isolamento seletivo da actinobactéria GUARA 1 em um processo de bioprospeccção de lipase e esterase por bactérias derivadas de sedimentos de manguezal da cidade de Guarapari, Espírito Santo. Eventualmente, essa morfoespécie, que demonstrou maior atividade para as enzimas lipolíticas entre os demais bacilos gram-positivos recuperados, foi acrescida ao conjunto de cepas bacterianas a serem avaliadas quanto a seu potencial bioativo no corrente estudo. O que definiu essa seleção foi a viva pigmentação violácea gerada pela actinobactéria. Posto que muitos compostos bioativos transparecem na cultura microbiana em ágar como gotículas na superfície do crescimento micelial ou pigmentos de cores variadas (Furlan 1997), decidiu-se incorporar esse isolado ao conjunto de morfoespécies não previamente submetidas à análise proposta no trabalho.

Como resultado da caracterização morfológica, o isolado GUARA 1 foi presuntivamente identificado como *Streptomyces* sp. Ambos os extratos orgânicos brutos dessa morfoespécie exibiram significativo antagonismo ao desenvolvimento dos MRSA indicadores, o que mostra a presença de metabólitos secundários efetivos contra o patógeno gram-positivo. *Streptomyces* é o gênero dominante do filo *Actinobacteria* com base no que foi reportado até então dos trabalhos de busca de novos isolados microbianos de manguezais geradores de produtos naturais de interesse (Xu et al. 2014). A cosmopolita e predominante presença de *Streptomyces* tanto em ecossistemas marinhos quanto terrestres deve-se principalmente a sua abundante produção de esporos que são rapidamente dispersos. Entre as substâncias antimicrobianas e citotóxicas geradas por *Streptomyces* de origem marinha destacam-se peptídeos, quinonas, macrolídeos, terpenos e policetídeos (Dharmaraj 2010).

Shin e colaboradores (2010) caracterizaram um indol alcalóide, β-1-acetil-β-carbolina, gerado por uma amostra de *Streptomyces* isolada de sedimento marinho em uma

baía coreana. A substância demonstrou uma peculiar ação contra cepas suscetíveis e multirresistentes de *S. aureus* e uma ação sinérgica de inibição dos cocos gram-positivos quando o metabólito era aplicado em conjunto com outros β-lactâmicos de uso clínico, o que sugere a atuação dessa biomolécula sobre um sítio alvo diferente das PBPs. Lee e colaboradores (2014a; 2014b) isolaram, a partir de sedimentos coletados de florestas de uma zona de mangue malasiano, uma nova espécie de *Streptomyces* produtora de uma bacteriocina com excelente atividade frente a MRSA. Govindarajan e colaboradores (2014) recuperaram uma cepa filogeneticamente única de *Streptomyces* sp. de sedimentos de um manguezal indiano. O policetídeo aromático secretado pela actinobactéria exibiu superior ação antimicrobiana em relação a outros antibacterianos de amplo espectro, uma ação desestabilizante sobre a membrana celular de MRSA e nenhuma citotoxicidade frente a linhagem de células tumorais H9C2, o que torna o composto atrativo para a produção de um novo antimicrobiano anti-MRSA.

Actinobactérias endofíticas de plantas medicinais têm recebido atenção da comunidade científica por representarem reservatórios valiosos de novos produtos naturais com aplicação especial em medicina e agricultura (Hasegawa et al. 2006). A partir de 90 amostras de plantas de florestas tropicais chinesas empregadas na medicina tradicional local, Qin e colaboradores (2009) analisaram o potencial bioativo de 46 cepas de *Actinomycetes* com 32 representantes de gêneros raros, a partir de um total de 2.174 amostras recuperadas. Mais da metade dos isolados exibiu uma considerável ação antmicrobiana frente a pelo menos um dos patógenos testados, além da detecção molecular do potencial gênico biossintético em uma boa parcela das actinobactérias. Em um trabalho similar, Zhao e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antagonista de 60 actinobactérias a partir de um conjunto inicial de 560 amostras isoladas a partir de 26 espécies vegetais com propriedades medicinais do planalto chinês de Panxi. Apenas uma das amostras não apresentou ação antimicrobiana e os genes de policetídeos e peptídeos não ribossomais foram identificados em vários dos isolados.

A morfoespécie NIM 1, selecionada e analisada quanto às suas atividades antimicrobiana e citotóxica no presente estudo, foi também averiguada em triagens da atividade antibacteriana, juntamente com demais bacilos gram-positivos endofíticos isolados de *A. indica,* por Rodrigues (2009). A cepa em questão apresentou resultados moderados de bioatividade frente às bactérias gram-positivas nos testes primários e altos níveis de ação antagonista na varredura secundária contra uma amostra controle e outra multirresistente de *S. aureus*. Entretanto, a autora procedeu com a produção das substâncias bioativas apenas em culturas líquidas, avaliando, portanto, unicamente o ECL. No atual trabalho, não foi

observada diferença de atividade antimicrobiana entre o ECS e ECL derivados dessa actinobactéria, o que indica até mesmo que os metabólitos presentes em ambas as formas dos extratos etanólicos compartilhem de um caráter químico-funcional semelhante ou até idêntico e que, possivelmente, eles diferem apenas quanto às suas respectivas concentrações.

Em um estudo pioneiro, Verma e colaboradores (2009) efetuaram o isolamento de actinobactérias das folhas, raízes e tronco de árvores adultas de Neem. Dos 55 isolados, a maior parte foi recuperada das raízes e, apenas pelas caracterizações morfológica e bioquímica, foi identificada como *Streptomyces* sp., seguidos por membros dos gêneros *Streptosporangium* e de *Nocardia*. A atividade antimicrobiana de extratos metanólicos derivados das morfoespécies foi primariamente observada frente a fungos fitopatogênicos e uma ação antagônica de amplo espectro foi verificada para amostras clínicas de bactérias gram-positivas e gram-negativas. A caracterização morfológica executada no presente trabalho evidencia que o isolado NIM 1 também é um estreptomiceto, com uma excelente bioatividade frente a MRSA hospitalar, patógeno não aplicado como organismo indicador no estudo do grupo indiano.

Em vista do direcionamento do trabalho para a pesquisa inicial de biomoléculas microbianas ativas frente à MRSA, um adicional ensaio *in vitro* qualitativo foi efetuado visando uma triagem do modo de ação dos metabólitos bioativos sobre as bactérias testadas, no caso, a capacidade de lise sobre a parede celular bacteriana. As cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e de MRSA CCBH 6089 foram adotadas como os micro-organismos alvo, com o objetivo de tentar verificar algum padrão de diferença de atividade dos compostos entre uma amostra sensível e resistente do coco. Ao contrário do observado nos testes de varredura secundária da atividade antimicrobiana, os ECSs preponderaram quanto à sua ação lítica sobre esse envoltório celular bacteriano em relação aos ECLs. Conforme previsto, a variante padrão do estafilococo exibiu maior suscetibilidade a lise pelas biomoléculas dissolvidas nos extratos etanólicos, o que mostra a resistência dos MRSA hospitalares a algumas das substâncias isoladas nos extratos.

A diferença da quantidade de material genômico extraído no teste não foi pormenorizada anteriormente nos resultados. Por exemplo, todos os extratos brutos da morfoespécie ADU 2.2 foram eficazes em isolar o DNA dos micro-organismos indicadores. Contudo, a concentração de ácidos nucleicos extraídos pelo ECS desse isolado de Cerrado foi consideravelmente menor quando comparados eletroforeticamente com o ECL. O arraste de conteúdo genético também percebido pode ser esclarecido por um efeito de lise parcial sobre

a parede celular causado pelas moléculas bioativas e pela carência metodológica de uso de algum agente para segregação de debris indesejados (Hassi et al. 2007).

Outro aspecto do ensaio que merece ser mencionado e que, inclusive, auxilia em sua validação é a ausência da utilização de componentes convencionais de lise, como lisozima, SDS e proteinase K. Foram também avaliados todos os possíveis interferentes, isto é, os solventes orgânicos aplicados na geração dos extratos etanólicos finais e os reagentes necessários para a precipitação dos ácidos nucleicos: NaCl 5 M e o etanol a 96%. Esses controles não foram adotados por Maataoui e colaboradores (2014), estudo do qual a técnica foi baseada.

O trabalho de Hassi e colaboradores (2007) fundamentou a metodologia delineada por Maatatoui e colaboradores (2014). Nesse trabalho foi executado o isolamento de uma amostra ambiental de *Staphylococcus* sp. capaz de produzir uma molécula de natureza proteica anti-micobacteriana. O ensaio de extração do DNA da micobactéria foi feito com o extrato bruto da proteína após precipitação com sulfato de amônio e do uso de solução de fenol/clorofórmio para desnaturação dos contaminantes proteicos e separação das fases orgânica e aquosa. O que Maataoui e colaboradores (2014) realizaram foi uma adaptação do teste de Hassi e colaboradores (2007), com a aplicação do extrato bruto de acetato de etila de *Streptomyces* sp. isolado de detritos de madeira do solo marroquino como agente de lise. Nossos resultados foram similares ao desse estudo, sugerindo que a metodologia é uma ferramenta para triar biomoléculas que apresentam mecanismo de ação lítica sobre a parede celular de bactérias gram-positivas.

A citotoxicidade dos extratos brutos orgânicos foi efetuada com *A. salina* como organismo-teste. Esse componente da fauna marinha possui uma enorme sensibilidade a diversas substâncias e as larvas desses crustáceos têm sido constantemente utilizadas para bioensaios de toxicidade a componentes orgânicos. Os empregos desses animais incluem desde rastreio de fontes de toxicidade em misturas químicas e amostras ambientais, triagem da atividade de certas substâncias químicas, detecção de toxinas naturais em gêneros alimentícios e fármacos, estudos do modelo de ação nociva de substâncias e de transferência trófica de poluentes (Perssone & Wells 1987; Nunes et al. 2006).

O bioensaio com *A. salina* foi confirmado como uma legítima opção às linhagens de células cancerígenas na etapa preliminar de identificação da atividade antitumoral de produtos naturais. Anderson e colaboradores (1991) constataram uma excelente correlação estatística entre os testes *in vivo* com culturas de células tumorais humanas e com os náupilos de *Artemia* na avaliação da ação inibitória de conhecidos compostos antineoplásicos.

McLaughlin e colaboradores (1998) argumentam que dentre as vantagens do uso do invertebrado nessa triagem, ressaltam-se: (i) a fácil acessibilidade aos ovos do organismo-teste, que podem ser adquiridos a um baixo custo e permanecem duradouros por anos; (ii) a factível estimativa da DL_{50} em um teste objetivo, que não requer uma estrutura laboratorial de alta complexidade e que demanda um curto período de tempo para realização; (iii) a possibilidade de avaliar um alto número de amostras. Parra e colaboradores (2001) compararam os efeitos citotóxicos frente a *A. salina* com a toxicidade oral de camundongos quando submetidos ao tratamento com os extratos brutos de plantas. Foi observada uma correlação positiva entre os valores de dose média letal (*in vitro*) e concentração letal mediana (*in vivo*), o que incita que o camarão consiste em um modelo alternativo útil aos animais laboratoriais, no mínimo, na fase inicial de averiguação toxicológica.

Os primeiros trabalhos com o uso de *A. salina* para investigação geral da toxicidade de produtos metabólicos de actinobactérias tinham como escopo principal examinar o potencial antiacaricida, antiparasitário e antitumoral das biomoléculas visadas (Blizzard et al. 1989; Takahashi et al. 1989). Isso é totalmente plausível, uma vez que o teste com esse invertebrado é um indicativo da presença de compostos citotóxicos e é completamente inespecífico para a elucidação do mecanismo de ação desses componentes (Krishnaraju et al. 2005).

No entanto, é válido o acoplamento desse ensaio em um processo de varredura da atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de actinobactérias, pois o mesmo permite uma rápida e prévia identificação prévia de extratos brutos com elevada citotoxicidade. Sob esse aspecto, os ECLs de GUARA 1 e PEG 23, assim como, ambos extratos derivados da morfoespécie de PEG 30 não seriam viáveis para a produção de antimicrobianos a partir dessas actinobactérias pela sua toxicidade (DL_{50} < 1.000 ppm), partindo do princípio elementar de toxicidade seletiva (Meyer et al. 1982).

Excetuando-se os trabalhos desenvolvidos pelo atual grupo de pesquisa, são escassos os relatos do emprego de *Artemia* para sondagem da citotoxicidade de compostos bioativos de actinobactérias. Nenhuma toxicidade dos ECLs de *Actinoplanetes* de solo do Cerrado goiano foi verificada por Azevedo e colaboradores (2004), similar ao que foi observado para os extratos da morfoespécie BC-A22. Manivasagan e colaboradores (2009) encontraram um acentuado efeito larvicida para *A. salina* pelos extratos de acetato de etila derivados de estreptomicetos isolados de sedimento marinho de uma baía indiana, a exemplo do ECL de GUARA 1. Tanvir e colaboradores (2014) constataram altos níveis de citotoxicidade frente ao microcrustáceo por extratos secos e solubilizados em DMSO de

actinobactérias isoladas de plantas mediciais da família *Asteraceae*, o que não foi notado para os extratos brutos do endofítico NIM 1.

A atividade intercalante sob a molécula de DNA alvo não foi observada para nenhum dos extratos etanólicos. Poderiam ter sido testados somente os extratos que se apresentaram citotóxicos a *Artemia*, contudo optou-se por examinar todos aqueles ativos na triagem secundária da ação antimicrobiana. A justificativa para essa medida foi que a toxicidade de um agente intercalante pode não se manifestar em um ensaio preliminar como é o teste com *A. salina* e, desse modo, acabar sendo desconsiderado posteriormente, o que foi analisado por Lima (2007): dois ECLs que não foram citotóxicos a *Artemia* exibiram capacidade de intercalar no DNA. De qualquer modo, a existência desse mecanismo de ação antitumoral foi eliminada em vista dos resultados negativos. Por sua vez, não se pode descartar a existência de outros metabólitos citotóxicos cujo modo de ação não seja a intercalação sobre a molécula do ácido nucleico.

Furlan e colaboradores (2002) reforçam a praticidade do ensaio de *gel shift* para a detecção de antibióticos antitumorais intercalantes. Os autores ressaltam que a técnica pela sua simplicidade, baixo custo e confiabilidade pode ser aplicada também no acompanhamento da produção desses metabólitos em processos fermentativos em maior escala e de estágios posteriores de purificação dos mesmos.

Ressalvando-se o isolado de Cerrado BC-A22, todas as morfoespécies foram identificadas como pertecentes ao gênero *Streptomyces*. A análise das micrografias eletrônicas foi o que confirmou essa classificação que já era pressuposta desde a caracterização macromorfológica. Esse resultado era aguardado já que Vieira (1999) aplicou um método de isolamento clássico e não seletivo para grupos de “actinobactérias raras” e, logo, a maior parte dos isolados recuperados foram estreptomicetos. Não foi surpreendente o fato de GUARA 1 e NIM 1 também serem membros desse gênero, em vista da prevalente porcentagem de estreptomicetos recuperados tanto nos ecossistemas de manguezais quanto como endofíticos de plantas medicinais reportadas nos últimos anos (Qin et al. 2009; Zhao et al. 2009; Hong et al. 2009; Verma et al. 2009; Dharmaraj 2010; Lee et al. 2014a).

Somente o isolado ADU 1.3 teve a região gênica do 16S rDNA sequenciada. Deparou-se com problemas críticos na padronização da PCR específica para esse gene. Diversos parâmetros do processo de amplificação foram modificados, como as temperaturas dos ciclos, crucialmente a de anelamento, e as concentrações dos componentes da reação. Entretanto, a variável que definitivamente influenciou no insucesso da obtenção dos produtos de PCR foi a concentração de DNA genômico. O elevado conteúdo G+C presente no material

genético das actinobactérias constitui um verdadeiro obstáculo nas reações de amplificação, em vista da maior energia necessária para romper as ligações de hidrogênio entre essas bases nitrogenadas além da concomitante formação indesejada de estruturas secundárias. A temperatura de anelamento foi um dos critérios analisados na tentativa de normalizar a PCR e, mesmo assim, não se alcançou êxito na obtenção dos produtos de amplificação desejados das outras morfoespécies. Uma futura alternativa a ser tentada é a adição à mistura de reação de agentes orgânicos, como DMSO e glicerol, que são comumente aplicados para potencializar a amplificação de fragmentos ricos em G+C (Strien et al. 2013).

Pela identificação molecular, certificou-se que o isolado ADU 1.3 é um estreptomiceto (*Streptomyces* sp.), o que está coerente com a caracterização morfológica. No entanto, não foi observada uma similaridade elevada para nenhuma espécie específica na pesquisa BLASTn. A cobertura do segmento e a porcentagem de identidade foram idênticas para um vasto número de sequências de 16S rDNA de *Streptomyces* sp. depositadas no *GenBank*. Esse dado sugere que esse isolado possa talvez vir a constituir uma nova espécie do gênero em questão, o que será elucidado com futuras análises taxonômicas.

A fenotipagem bioquímica e fisiológica surge nessa direção para auxiliar a uma classificação ao nível de espécie. No entanto, estão relativamente defasados os bancos de taxnomina numérica para identificação de procariotos do táxon *Actinobacteria*. Atualmente, um dos manuais mais confiáveis existente é o compêndio do DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*), organizado pelo professor Dr. Joachim Wink. Nesse contexto, é urgente uma renovação da sistemática desses organismos, uma vez que a taxonomia é uma ferramenta indispensável na identificação de novos isolados microbianos de interesse industrial. Ademais, serão realizadas algumas provas bioquímicas adicionais com o propósito de complementar o que já foi executado no presente trabalho, objetivando uma melhora no painel de resultados oriundos nessa fase de caracterização taxonômica.

Esse estudo representa o primeiro estágio de prospecção por metabólitos antibióticos desses isolados de actinobactérias. A otimização do processo de geração dessas substâncias bioativas, especialmente das morfoespécies BC-A22, GUARA 1 e NIM 1, será elaborada de modo a avaliar a influência de diversos meios de cultura, solventes orgânicos na fase de extração, faixas de pH e fontes de carbono e nitrogênio, além da análise de cinética de produção dessas biomoléculas. Com os melhores parâmetros já definidos, um aumento de escala de produção será efetuado para obtenção de extratos brutos ideias para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) frente às amostras clínicas de MRSA, citotoxicidade a diferentes linhagens de células tumorais, bem como exame de possível atividade antiviral. A

bioautografia será desenvolvida para um fracionamento preliminar dos extratos, com sucessivos novos testes de averiguação da bioatividade. Entretanto, a principal perspectiva futura será providenciar a caracterização do perfil químico dos metabólitos bioativos nas frações adquiridas, o que será alcançado por HPLC acoplada a espectrometria de massas.

Evidentemente, a amplificação do segmento gênico correspondente ao 16S rRNA será padronizada a fim de se concluir a identificação molecular desses procariotos. Essa padronização da PCR também será essencial para a detecção dos genes de sintases de policetídeos e peptídeos não ribossomais, parte experimental que chegou a ser iniciada nesse trabalho. Outra fase de caracterização taxonômica que será executada é a análise químico-celular, ou seja, a determinação de DAP e de açúcares de parede celular. Com base dos resultados da filogenia molecular desses isolados (baseada no gene do 16S rRNA), serão estabelecidas parcerias com grupos de pesquisa especializados em taxonomia polifásica para confirmação de possíveis espécies inéditas.

O recente relato de um isolado de VRSA de caráter comunitário carreador de plasmídeos conjugativos de resistência à múltiplos antimicrobianos no Hospital das Clínicas da USP (Rossi et al. 2014) adverte quanto ao patamar que o *S. aureus* já ascendeu como patógeno. A plasticidade com que essa bactéria perde a suscetibilidade aos antibióticos é preocupante, e evidencia ainda que está próximo o isolamento de uma cepa pan-resistente, com origem não hospitalar e que potencialmente pode alcançar êxito como causador de infecções nosocomiais, não somente oportunistas. Mesmo com a introdução na fase de avaliação clínica de novos fármacos candidatos para a terapêutica de infecções estafilocóccicas, as pesquisas para o desenvolvimento desses fármacos ainda estão muito atrasadas frente à adaptabilidade desse micro-organismo.

Contudo, a descoberta da teixobactina de uma β-proteobactéria do solo ainda não cultivável, a *Eleftheria terrae*, renova as esperanças frente ao contexto de regressão a época anterior a inclusão dos antibióticos antimicrobianos. Essa droga atua sobre um novo sítio alvo na parede celular bacteriana, demonstrou-se mais eficaz do que a vancomicina contra *S. aureus* multirresistentes e, notavelmente, sua atividade não é acompanhada de aparecimento de resistência para vários micro-organismos de importância clínica (Ling et al. 2015). Trabalhos com esse escopo, que se principiou dentro dos laboratórios acadêmicos de pesquisa e se fortaleceu com o apoio de empresas menores de biotecnologia atuantes na área, é que deve ser constantemente incentivado e fomentados. O que foi executado nessa dissertação de mestrado é um dos passos iniciais de um processo amplo que está sendo realizado por múltiplos grupos de pesquisa ao redor de todo o mundo. Todavia, é através dessa abordagem

prática de bioprospecção da diversidade microbiana de variados habitats que emergem novas moléculas com promissoras atividades farmacológicas.

7 CONCLUSÕES

- No presente estudo, 19 diferentes morfoespécies de actinobactérias foram recuperadas de uma amostra de solo do Cerrado goiano coletada durante a estação seca. Nove isolados de actinobactérias não caracterizados sob o aspecto taxonômico foram selecionados da bacterioteca do LAMAB (IPTSP/UFG), todas não previamente avaliadas completamente quanto à produção de compostos antibióticos;

- Das 16 morfoespécies isoladas da amostra de solo de Cerrado e testadas nos ensaios de triagem primária da atividade antimicrobiana, 5 (31,25%) exibiram atividade antimicrobiana. Dois isolados, BC-A1 e BC-A22, foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* e a maioria dos outros micro-organismos indicadores gram-positivos, bem como as cepas de MRSA de origem clínica;

- Do total de 9 actinobactérias selecionadas da bacterioteca, 6 apresentaram atividade antimicrobiana de moderada a alta frente a MRSA;

- Dos extratos brutos orgânicos obtidos a partir dos produtos de fermentação em culturas líquidas (ECL) e do crescimento em ágar (ECS) gerados a partir das 8 morfoespécies selecionadas para os ensaios de triagem secundária da atividade antimicrobiana, o ECS do isolado BC-A22 se destacou quanto à sua capacidade de inibir o crescimento das amostras hospitalares de MRSA, além da maioria das cepas-padrão gram-negativas. O ECS e o ECL da morfoespécie ADU 1.3 também exibiram um alto nível de ação antagônica contra MRSA;

- A maioria dos extratos brutos apresentou atividade lítica sobre a parede celular das cepas controle e multirresistente de *S. aureus*, com certa predominância dos ECSs sobre os ECLs;

- Somente o ECL de GUARA 1, o ECL de PEG 23 e os ECS e ECL de PEG 30 foram citotóxicos em baixas concentrações, o que sugere que os compostos bioativos presentes na solução dos extratos não sejam viáveis para a aplicação como antibióticos

antimicrobianos. Todavia, para os demais isolados, não foi observada significativa atividade citotóxica;

- Nenhum dos extratos demonstrou efeito de intercalação sob a molécula de DNA e, assim, as biomoléculas presentes nos mesmos provavelmente não possuem esse possível mecanismo de ação antitumoral;

- A caracterização taxonômica morfológica sugere que a maioria das actinobactérias, avaliadas nos bioensaios, pertença ao gênero *Streptomyces*, com exceção da morfoespécie BC-A22. A morfoespécie ADU 1.3 foi identificada como *Streptomyces* sp. com base no sequenciamento do segmento gênico do 16S rRNA, evidenciando a concordância dos resultados da análise morfológica com a identificação molecular.

REFERÊNCIAS

1. Adegboye MF, Babalola OO. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr J Agric Res* 7: 2255-2261, 2012.

2. Ahmed L, Jensen PR, Freel KC, Brown R, Jones AL, Kim BY, Goodfellow M. *Salinispora pacifica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 1069-1078, 2013.

3. Akhila A, Rani K. Chemistry of the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). *In* Herz W, Falk H, Kirby GW, Moore RE, Tamm Ch (eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag Wien, Nova Deli, p. 47-131, 1999.

4. Alam MT, Medema MH, Takano E, Breitling R. Comparative genome-scale metabolic modeling of actinomycetes: the topology of essential core metabolism. *FEBS Lett* 585: 2389-2394, 2011.

5. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 36: 697-705, 2005.

6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Toll. *J Mol Biol* 215: 403-410, 1990.

7. Amaral PA, Neves G, Farias F, Eifler-Lima V. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. *Braz J Pharm Sci* 39: 351-363, 2003.

8. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 1:1-7, 2010.

9. Amrita K, Nitin J, Devi CS. Novel bioactive compounds from mangrove derived actinomycetes. *IRJP* 3: 25-29, 2012.

10. Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem Anal* 2: 107-111, 1991.

11. Andersson DI, Hughess DI. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8: 260-271, 2010.

12. Andreote FD, Jimenéz DJ, Chaves D, Dias ACF, Luvizotto DM, Dini-Andreote F, Fasanella CC, Lopez MV, Baena S, Taketani RG, Melo IS. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *Plos One* 7: 1-14, 2012.

13. Araujo JF, Castro AP, Costa MMC, Togawa RC, Pappas Junior GJ, Quirino BF, Bustamante MMC, Williamson L, Handelsman J, Kruger RH. Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian Savanna-like vegetation reveals Acidobacteria dominance. *Microb Ecol* 64: 760-770, 2012.

14. Arifuzzaman M, Khatun MR, Rahman H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *Afr J Biotechnol* 9: 4615-4619, 2010.

15. Atlas RM. Nitrate Agar. *In* Atlas RM (ed.), *Handbook of Microbiological Media*, CRC Press, Washington, p. 1289, 2010.

16. Azevedo RCLS, Pimenta FC, Vieira JDG. Determinação da atividade antimicrobiana de *Actinoplanes* isolados do solo de Cerrado goiano e o efeito citotóxico dos extratos etanólicos brutos dos isolados. *Rev Pat Trop* 3: 217-222, 2004.

17. Balis FM. Evolution of anticancer drug discovery and the role of cell-based screening. *J Natl Cance Inst* 94: 78-79, 2002.

18. Ball MC. Ecophysiology of mangroves. *Trees* 2: 129-142, 1988.

19. Baltz RH. Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 507-513, 2006.

20. Baltz RH. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol* 8: 557-563, 2008.

21. Barrett CT, Barrett JF. Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Curr Opin Biotechnol* 14: 621-626, 2003.

22. Barrett JF. Can biotech deliver new antibiotics? *Curr Opin Microbiol* 8: 498-503, 2005.

23. Basilio A, González I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, González A, Genilloud O. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95: 814-823, 2003.

24. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where we are? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 12: 1-15, 2013.

25. Batalha MA. O cerrado não é um bioma. *Biota Neotrop* 11: 21-24, 2011.

26. Bax R, Mullan N, Verhoef J. The millennium bugs - the need for and development of new antibacterials. *Int J Antimicrob Ag* 16: 51-59, 2000.

27. Bentley SD, Parkhill J. Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu Rev Genet* 38: 771-791, 2004.

28. Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58: 1-26, 2005.

29. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot* 65: 385-395, 2012.

30. Betina V. Differentiation and secondary metabolism in some prokaryotes and fungi. *Folia Microbiol* 40: 51-67, 1995.

31. Bhanot A, Sharma R, Noolvi MN. Natural sources as potential anti-cancer agents: a review. *Int J Phytomed* 3: 9-26, 2011.

32. Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 8: 208-215, 2005.

33. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr Sci* 82: 1336-1345, 2002.

34. Black T, Hare R. Will genomics revolutionize antimicrobial drug discovery? *Curr Opin Microbiol* 3: 522-527, 2000.

35. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13: 42-51, 2014.

36. Blasco F, Saenger P, Janodet E. Mangroves as indicators of coastal change. *Catena* 27: 167-178, 1996.

37. Blizzard TA, Ruby CL, Mrozik H, Preizer FA, Fisher MH. Brine shrimp (*Artemia salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. *J Antibiot* 62: 1304-1307, 1989.

38. Boeke SJ, Boersma MG, Alink GM, van Loon JJA, van Huis A, Dicke M, Rietjens MCM. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *J Ethnopharmacol* 94: 25-41, 2004.

39. Boucher H, Miller LG, Razonable RR. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Inf Dis* 51: 183-197, 2010.

40. Boudjelal F, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. Taxonomy study and partial characterization of antimicrobials compounds from a moderately halophilic strain of the genus *Actinoallotheicus*. *Braz J Microbiol* 42: 83-842, 2012.

41. Boudjelal F, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. Taxonomy and antimicrobial activities of two novel halophilic *Saccharomonospora* strains isolated in Algerian Sahara soils. *Annu Microbiol* 61: 229-235, 2011.

42. Brahmachari G. Neem – an omnipotent plant: a retrospection. *ChemBioChem* 5: 408-421, 2004.

43. Braña MF, Sanchéz-Migallón A. Anticancer drug discovery and pharmaceutical chemistry: a history. *Clin Transl Oncol* 8: 717-728, 2006.

44. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MWD, Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 56: 1000-1018, 2005.

45. Bull AT, Goodfellow M, Slater JH. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Ann Rev Microbiol* 46: 219-252, 1992.

46. Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol* 15: 491-499, 2007.

47. Bunge RH, McCready DE, Balta LA, Graham BD, French JC, Dion HW. Fingerprint methods used to identify known antineoplastic agents in culture filtrates. *In* Carter SK, Umezawa H, Douros J, Sakurai Y (eds.), *Antitumor Antibiotics*, Springer, Heidelberg, p.77-84, 1978.

48. Buratowski S, Chodosh SA. Mobility shift DNA-binding assay using gel electrophoresis. *In* Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Streehl K (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John-Wiley and Sons (eds.), Nova York, p. 12.2.1-12.2.8, 1996.

49. Burger AM, Fiebig HH. Preclinical screening for new anticancer agents. *In* Rudek M, Chau CH, Figg W, McLeod HL (eds.), *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodinamics*, Springer-Verlag, Nova York, p. 23-38, 2014.

50. Bustamante MMC, Nardoto GB, Pinto AS, Resende JCF, Vieira LCG. Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. *Braz J Biol* 72: 655-671, 2012.

51. Cantas L, Shah SQ, Cavaco LM, Manaia CM, Walsh F, Popowska M, Garelick H, Bürgmann H, Sørum H. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance on medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol* 4: 1-14, 2013.

52. Cassel GH, Mekalanos J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *JAMA* 285: 601-605, 2001.

53. Chabner BA, Roberts Jr. TG. Chemotherapy and war on the cancer. *Nat Rev Canc* 5: 65-72, 2005.

54. Challis GL, Hopwood DA. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS* 100: 14555-14561, 2003.

55. Chambers HF, Miick C. Characterization of Penicillin-Binding Protein 2 of *Staphylococcus aureus*: deacetylation reaction and identification of two Penicillin-Binding Peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 656-661, 1992.

56. Chambers HF. Methicillin resistance in Staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10: 781-791, 1997.

57. Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* 34: 171-198, 2010.

58. Chater KF. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil Trans R Soc* B 361: 761-768, 2006.

59. Clardy J, Walsh C. Lesson from natural molecules. *Nature* 432: 829-837, 2004.

60. Cloutier MJ. Antibiotics: mechanisms of action and the acquisition of resistance-when magic bullets lose their magic. *Am J Pharm Educ* 59: 167-172, 1995.

61. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test; Twenty-Four Informational Supplement*. M100-S24. v. 34, n.1. Wayne, 321 pp, 2014.

62. Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenging facing the development of new antimicrobial agents. *Nat Rev Drug Discov* 1: 895-910, 2002.

63. Cochrane VW. Physiology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 15: 1-24, 1961.

64. Coelho RRR, Grigorevski-Lima AL, Franco MN, Oliveira MNQ, Nascimento RP. Actinomicetos de solos brasileiros: um baú de enzimas interessantes. *Microbiologia in Foco* 5: 5-13, 2012.

65. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antibiotic era. *Science* 257: 1050-1055, 1992.

66. Courvalin P. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J Antimicrob Chemother* 37: 855-869, 1996.

67. Coutinho LM. O conceito de bioma. *Acta Bot Bras* 20: 13-23, 2006.

68. Coutinho LM. O conceito de cerrado. *Rev Bras Bot* 1: 17-23, 1978.

69. Coventry E, Allan EJ. Microbiological and chemical analyses of Neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data in antimicrobial activity. *Phytoparasitica* 29: 441-450, 2001.

70. Craney A, Salman A, Nodwell J. Towards a new science of secondary metabolism. *J Antibiot* 66: 387-400, 2013.

71. Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 320: 100-103, 2008.

72. David MZ, Dawn RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 23: 616-687, 2010.

73. David MZ, Glikman D, Crawford SE, Peng J, King KJ, Hostetler MA, Boyle-Vavra S, Daum RS. What is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *J Infect Dis* 197: 1235-1243, 2008.

74. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417-433, 2010.

75. Davies J, Ryan K. Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world. *ACS Chem Biol* 7: 252-259, 2011.

76. Davies J. Are antibiotics naturally antibiotics*? J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 496-499, 2006b.

77. Davies J. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. *Curr Opin Chem Biol* 15: 5-10, 2011.

78. Davies J. Specialized microbial metabolites: functions and origins. *J Antibiot* 66: 361-364, 2013.

79. Davies J. Where have all antibiotics gone? *Can J Infect Dis Med Microbiol* 17: 287-290, 2006a.

80. Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 69: 1-39, 2000.

81. Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* 62: 5-16, 2009.

82. Demain AL. History of industrial biotechnology. *In* Soetaert W, Vandamme EJ (eds.), *Industrial Biotechnology. Sustainable Growth and Economic Success*, Wiley, Weinheim, p. 17-78, 2010.

83. Demain AL. Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl Microbiol* 1: 259-264, 1998.

84. De-Souza MT. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose. *In* Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT (eds.), *Técnicas Básicas em Biologia Molecular*, Editora UnB, Brasília, p. 111-128, 2003.

85. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 8: 747-763, 2008.

86. DeVita VT, Rosenberg SA. Two hundred years of cancer research. *N Engl J Med* 366: 2207-2214, 2012.

87. Dharmaraj S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol* 26: 2123-2139, 2010.

88. Dias ACF, Andreote FD, Dini-Andreote F, Lacava PT, Sá ALB, Melo IS, Azevedo JL, Araújo WL. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1305-1311, 2009.

89. Drew RH. Emerging options for treatment of invasive, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pharmacother* 2: 227-249, 2007.

90. Drew SW, Demain AL. Effects of primary metabolism on secondary metabolism. *Annu Rev Microbiol* 31: 343-356, 1977.

91. Duke NC, Meynecke JO, Dittmann S, Ellison AM, Anger K, Berger U, Cannicci S, Diele K, Ewel KC, Field CD, Koedam N, Lee SY, Marchand C, Nordhaus I, Dahdouh-Guebas F. A world without mangroves? *Science* 317: 41-42, 2007.

92. Durigan G, Siqueira MF, Franco GADC. Threats to the Cerrado remnnants of the state of São Paulo, Brazil. *Sci Agric* 64: 355-363, 2007.

93. Dwyer DJ, Camacho DM, Kohanski MA, Callura JM, Collins JJ. Antibiotic-induced bacterial cell ceath exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Mol Cell* 46: 561-572, 2012.

94. Edreva A, Velikova V, Tsonev T, Dagnon S, Gurel A, Aktas L, Gesheva E. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of function and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiology* 34: 67-78, 2008.

95. Edwards B, Andini R, Esposito S, Grossi P, Lew D, Mazzei T, Novelli A, Soriano A, Gould IM. Treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: Where are we now? *JGAR* 2: 133-140, 2014.

96. Elleuch L, Shaaban KA, Abdel-Aziz MS, Chackchouk A, Nagia MS, Mellouli L, Shabban M. Cyclic lipopeptides and other bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN272. *Afr J Microbiol Res* 6: 2202-2210, 2012.

97. El-Tarabily KA, Sivasithamparam K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1505-1520, 2006.

98. Embley TM, Stackebrandt E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 48: 257-289, 1994.

99. Enright MC. The evolution of a resistant pathogen - the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* 3: 474-479, 2003.

100. Ensign JC. Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Ann Rev Microbiol* 32: 185-219, 1978.

101. Espinosa E, Zamora P, Feliu J, Báron MG. Classification of anticancer drugs - a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat Rev* 29: 515-23, 2003.

102. Fenical W, Jensen PR, Palladino MA, Lam KS, Llyod GK, Potts BC. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg Med Chem* 17: 2175-2180, 2009.

103. Fiedler HP. Screening for bioactivity. *In* Bull AT (ed.), *Microbial Diversity and Bioprospecting*, ASM Press, Washington D.C., p. 324-335, 2004.

104. Finch R. Bacterial resistance - the clinical challenge. *Clin Microbiol Infec* 8: 21-32, 2002.

105. Firn RD, Jones CG. The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Mol Microbiol* 37: 989-994, 2000.

106. Flardh K, Buttner MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* 7: 36-49, 2009.

107. Foucault ML, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Fitness cost of *van*A-type vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcusaureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2354-2359, 2009.

108. Foucault ML, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Fitness cost of *van*A-type vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2534-2539, 2009.

109. Frearson J, Wyatt P. Drug discovery in academia - the third way? *Expert Opin Drug Discov* 5: 909-919, 2010.

110. Freiberg C, Brotz-Oesterhelt H. Functional genomics in antibacterial drug discovery. *Drug Discov Today Targets* 10: 927-935, 2005.

111. Furlan RLA, Garrido LM, Brumatti G, Amarante-Mendes GP, Martins RA, Facciotti CR, Padilla G. A rapid and sensitive method for the screening of DNA intercalating antibiotics. *Biotechnol Lett* 24: 1807-1813, 2002.

112. Furlan RLA. Obtenção e estudo de mutantes com produção alterada do antibiótico retamicina sintetizado por *Streptomyces olindensis* DAUFPE5622. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia - ICB/USP], São Paulo, 76 pp., 1997.

113. Furukawa K, Wolanski E. Sedimentation in mangrove sediments. *Mangroves Salt Marshes* 1: 3-10, 1996.

114. Gallinger SJ, Rabenstein JD, Baker DD. Comparative study of chemoattractants for the isolation of motile-spored actinoplanetes. *J Ind Microbiol Biotec* 15: 131-134, 1995.

115. Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, Ju J, Thorson JS, Shen B. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes mitomycin. *Chem Rev* 105: 739-758, 2005.

116. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 66-112, 2012.

117. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. Isolation and characterization of potential producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed* 3: 426-435, 2013.

118. Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, d'Azevedo PA. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *An Bras Dermatol* 84: 501-506, 2009.

119. Gennilloud O, González I, Martín J, Tormo JR, Vicente MF. Current approaches to explore actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 375-389, 2011.

120. Ghizelini AM, Mendonça-Hagler LCS, Macrae A. Microbial diversity in Brazilian mangroves. *Braz J Microbiol* 1242-1254, 2012.

121. Ghosh S, LaPara TM. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME* 1: 191-203, 2007.

122. Girish K, Shankara Bhat S. Neem – a green treasure. *Elet J Biol* 4: 102-111, 2008.

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

124. Goodfellow M, Alderson G. Numerical taxonomy of *Actinomadura* and related actinomycetes. *J Gen Microbiol* 112: 95-111, 1979.

125. Goodfellow M, Brown R, Ahmed L, Pathom-aree W, Bull AT, Jones AL, Stach JEM, Zucchi TD, Zhang L,Wang J. *Verrucosispora fiedleri* sp. nov., an actinomycete isolated from a fjord sediment which synthesizes proximicins. *Antonie van Leeuwenhoek* 103: 493-502, 2013.

126. Goodfellow M, Cross T. Classification. *In* Goodfellow M, Willians ST and Mordarski M (eds.), *The Biology of the Actinomycetes*, Academic Press, Londres. p. 7-164, 1984.

127. Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 119-142, 2010.

128. Goodfellow M, Williams ST, Mordaski M. Introduction to and importance of actinomycetes. *In* Goodfellow M, Willians ST and Mordarski M (eds.), *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, Londres, p. 1-6, 1984.

129. Goodfellow M, Williams ST. Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 37: 189-216, 1983.

130. Goodfellow M. Suprageneric classification of actinomycetes. *In* Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins (ed.), Baltimore, p. 2333-2339, 1989.

131. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin Transl Oncol* 9:767-776, 2007.

132. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Inf Dis* 46: 350-359, 2008.

133. Gotz F, Bannerman T, Schleifer KH. The genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. *In* Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.), *The Prokaryotes. Vol.4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, Springer, Nova York, p. 5-75, 2006.

134. Gould IM. Costs of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its control. *Int J Antimicrob Ag* 28: 379-384, 2006.

135. Govindarajan G, Santhi S, Jebakumar SRD. Antimicrobial potential of phylogenetically unique actinomycete, *Streptomyces* sp. JRG-04 from marine origin. *Biologicals* 42: 305-311, 2014.

136. Groth I, Vettermann R, Schuetze B, Schumann P, Saiz-Jimenez C. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *J Microbiol Meth* 36: 155-122.

137. Gupta RS. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 171-182, 2011.

138. Gupta RS. The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* 22: 111-131, 2000.

139. Hall TA. Bio-Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98, 1999.

140. Hambley TW. Is anticancer drug development heading in the right direction? *Cancer Res* 69: 1259-1262, 2009.

141. Hao F, Kumar S, Yadav N, Chandra D. Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochim et Biophys Acta* 1846: 247-257, 2014.

142. Hasegawa S, Meguro A, Shimizu M, Nishimura T, Kunoh H. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetol* 20: 72-81, 2006.

143. Hashmat I, Azad H, Ahmed A. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) – a nature's drugstore: an overview. *I Res J Biological Sci* 1: 76-79, 2012.

144. Haslam E. Secondary metabolism: evolution and function: products or processes. *Chemoecology* 2: 89-95, 1995.

145. Hassi M, Haggoud A, El Mzibri M, Ibnosouda S, Houari A, Iraqui M. Isolation and identification of a staphylococcal strain with an anti-mycobacterial activity and it’s mode of action. *Ann Microbiol* 57: 651-656, 2007.

146. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 64: 3-10, 2009.

147. Hayakawa M, Tamura T, Nonomura H. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using γ-collidine as the chemoattractant. *J Ferment Bioeng* 72: 426-432, 1991.

148. Hayakawa M. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetol* 22: 12-19, 2008.

149. Higginbotham SJ, Murphy CD. Identification and characterization of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* 165: 82-86, 2009.

150. Higgins ML, Silvey JKG. Slide culture observations of two freshwater actinomycetes. *Trans Am Microsc Soc* 85: 390-398, 1966.

151. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9: 486-493, 2001.

152. Hiramatsu K, Igarashi M, Morimoto Y, Baba T, Umekita M, Akamatsu Y. Curing bacteria of antibiotic resistance: reverse antibiotic, a novel class of antibiotic in nature. *Int J Antimicrob Ag* 39: 478-485, 2012.

153. Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, Baba T. Multi-drug resistant *S. aureus* and the future of chemotherapy. *J Infect Chemother* 20: 593-601, 2014.

154. Hirsch CF, Christensen DL. Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* 46: 925-929, 1983.

155. Hogberg L, Heddini A, Cars O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol Sci* 31: 509-515, 2010.

156. Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol Fertil Soils* 33: 265-278, 2001.

157. Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197, 1981.

158. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams and Wilkins (eds.), Baltimore, 2418 pp., 1994.

159. Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XS, Goodfellow M, Ruan JS. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs* 7: 24-44, 2009.

160. Hopwood DA. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* 145: 2183-2202, 1999.

161. Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser J, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM and Schrempf H. *Genetic manipulations of Streptomyces: a Laboratory Manual*. John Innes Foundation, Norwich, England, 356 pp., 1985.

162. Hu H, Lin HP, Xie Q, Li L, Xie XQ, Sun M, Hong K. *Streptomyces shenzhenensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from mangrove sediment. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 631-637, 2011.

163. Huang H, Lv J, Hu Y, Fang Z, Zhang K, Bao S. *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Micr* 58: 17-20, 2008.

164. Hughes JP, Rees S, Kalindjan SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 162: 1239-1249, 2011.

165. Hummel HE, Hein DF, Schmutterer H. The coming age of azadirachtins and related tetranortriterpenoids. *JBiopest* 5: 82-87, 2012.

166. Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2: 188-200, 2002.

167. Hutter RA, Erckhardt T. Genetic manipulation. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordaski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, Londres, p. 89-184, 1988.

168. ICH – International Conference on Harmonization 2010. *Guidance for Industry: M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals*. Disponível em: http: // fda.gov/cder/guidance/1855fnl.pdf. Acesso em: 07/05/2012.

169. Ichikawa T, Date M, Ishikura T, Ozaki A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and prototroph method. *Folia Microbiol* 16: 218-224, 1971.

170. IDSA – Infection of Disease Society of America. The 10 ’20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antimicrobial drugs by 2020. *Clin Inf Dis* 50: 1081-1083, 2010.

171. INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva 2013. *Estimativa 2014: Incidência do Câncer no Brasil*. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/. Acesso em: 10/05/2014.

172. Ito T, Masubuchi M. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *J Antibiot* 67: 353-360, 2014.

173. Iwai Y, Omura S. Culture conditions for screening of new antibiotics. *J Antibiotics* 35: 124-141, 1982.

174. Iwai Y, Takahashi Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. *In* Omura S (ed.), *The search for bioactive compounds from microorganisms*, Springer, Nova York. p. 281-302, 1992.

175. Jones KL. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol* 57: 141-145, 1949.

176. Kathiresan K. How do mangrove forests induce sedimentation? *Rev Biol Trop* 51: 355-360, 2003.

177. Keller M, Zengler K. Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol* 2: 141-150, 2004.

178.Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 74: 65-76, 1999.

179.Khanna M, Solanki R, Lal R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int J Adv Biotechnol Res* 2: 357-375, 2011.

180.Kim B. Polyphasic taxonomy of thermofilic actinomycetes. [Tese de Doutorado - Department of Agriculture and Environmental Science/Newcastle University], Newcastle upon Tyne, 369 pp., 1999.

181.Kim BY. Biosystematics of the genus *Dactylosporangium* and some other filamentous actinomycetes. [Tese de Doutorado - Faculty of Science, Agriculture and Engineering/Newcastle University], Newcastle upon Tyne, 210 pp., 2010.

182.Kinghorn AD, Chin YW, Swanson SM. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12: 189-196, 2009.

183.Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Meth* 58: 169-188, 2004.

184.Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1: 147-155, 2005.

185.Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 206-220, 2005.

186.Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8: 423-435, 2010.

187.Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130: 797-810, 2007.

188.Korn-Wendisch F, Kutzner, HJ. The Family Streptomycetaceae. *In* Balowa A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds.), *The Prokaryotes*, Springer, New York, p. 921-955, 1992.

189.Koul O, Isman MB, Ketkar CM. Properties and uses of Neem, *Azadirachta indica*. *Can J Bot* 68: 1-11, 1990.

190.Koyama M, Inokoshi J, Tomoda H. Anti-infectious agents against MRSA. *Molecules* 18: 204-224, 2013.

191.Kozhevin PA, Vinogradova KA, Bulgakova BG. The soil antibiotic resistome. *Ecol* 68: 53-59, 2013.

192.Krishnaraju AV, Rao TVN, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay HS, Subbaraju G. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Int J Appl Sci Eng* 3: 125-134, 2005.

193.Kumar K, Chopra S. New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. *J Antimicrob Chemother* 68: 1465-1470, 2013.

194.Kumar PS, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *Kaohsiung J Med Sci* 30: 435-446, 2014.

195.Kumar SR S, Venkata K, Rao B. *In vitro* antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 1: 787-792, 2012.

196.Kurosu M, Siricilla S, Mitachi K. Advances in MRSA drug discovery: where are we and where do we need to be? *Expert Opin Drug Discov* 8: 1095-1116, 2013.

197.Kurtboke DI. Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 1843-1852, 2012.

198.Kuster E, Williams ST. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* 202: 928-929, 1964.

199.Labeda DP. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *J Ind Microbiol* 28: 115-121, 1987.

200.Lacerda LD, Ittekot V, Patchineelam SR. Biogeochemistry of mangrove soil organic matter: a comparison between *Rhizophora* and *Avicennia* soils in south-eastern Brazil. *Estuar Coast Shelf S* 40: 713-720, 1995.

201.Lancini G, Lorenzetti R. Antibiotics and bioactive microbial metabolites. *In* Lancini G, Lorenzetti R (eds.), *Biotechnology of Antibiotics and other Bioactive Microbial Metabolites*, Springer-Verlag, Nova York, p. 1-18, 1993.

202.Lancini G, Parenti F. The antibiotics: an overview. In Lancini G, Parenti F. (eds.), *Antibiotics: An Integrated View*, Springer-Verlag, Nova York, p. 1-12, 1982.

203.Lechavalier MP, Lechevalier HA. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* 20: 445-443, 1970.

204.Lechevalier HA, Lechevalier MP. Biology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 21: 71-100, 1967.

205.Lee LH, Zainal N, Azman AS, Eng SK, Goh BH, Yin WF, Mutalib NS, Chan KG. Diversity and antimicrobial activities of Actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *Scientific World Journal* 1: 1-14, 2014a.

206.Lee LH, Zainal N, Azman AS, Eng SK, Mutalib NS, Yin WF, Chan KG. *Streptomyces pluripotens* sp. nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Syst Evol Micr* 64: 3297-3306, 2014b.

207.Lee SY. Tropical mangrove ecology: physical and biotic factors influencing ecosystem structure and function. *Aust J Ecol* 24: 355-366, 1999.

208.Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: 122-129, 2004.

209.Levy SB. Antibiotic resistance - the problem intensifies. *Adv Drug Deliver Rev* 57: 1446-1450, 2005.

210.Lima DV. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos isolados do solo de Cerrado e Mata Atlântica. [Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical - IPTSP/UFG], Goiânia, 137 pp., 2007.

211.Ling LL, Scheneider T, Peoples AJ, Spoering AM, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schaerbelle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millet WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517: 455-459, 2015.

212.Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Inf Dis* 36: 11-23, 2003.

213.Loarie SR, Lobell DB, Asner GP, Mu Q, Field CB. Direct impacts on local climate of sugar-cane expansion in Brazil. *Nature Clim Change* 1: 105-109, 2011.

214.Locci R, Sharples P. Morphology. *In* Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (eds.), *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, Londres, p. 337-387, 1984.

215.Lopes AS, Guilherme LAG. A região do Cerrado. *In* Lopes AS, Guilherme LAG (eds.), *Solos sob cerrado: manejo da fertilidade para a produção agropecuária*, ANDA, São Paulo, p. 8-11, 1994.

216.Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Eng J Med* 339: 520-532, 1998.

217.Ludwig W, Euzéby J, Shumann P, Busse HJ, Trujillo ME, Kampfer P, Whitman WB. Road map to the phylum *Actinobacteria*. *In* Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 5: The Actinobacteria,* Williams and Wilkins (ed.), Baltimore, p. 1-25, 2012.

218.Lugo AE. Mangrove ecosystems: successional or steady state? *Biotropica* 12: 65-72, 1980.

219.Maataoui H, Iraqui M, Jihani S, Ibnsouda S, Haggoud A. Isolation, characterization and antimicrobial activity of a *Streptomyces* strain isolated from a deteriorated wood. *Afr J Microbiol Res* 8: 1178-1186, 2014.

220.Macintosh DJ, Ashton EC, Havanon S. Mangrove rehabilitation and intertidal biodiversity: a study in the Ranong mangrove ecosystem, Thailand. *Estuar Coast Shelf S* 55: 331-345, 2002.

221.Magris RA, Barreto R. Mapping and assessment of protection of mangrove habitats in Brazil. *Pan-Am J Aquat Sci* 5: 546-556, 2010.

222.Mahajan GB, Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes – a review. *Front Biosci* 4: 240-253, 2012.

223.Mahesh B, Tejesvi MV, Nalini MS, Prakash HS, Kini KR, Subbiah V, Shetty HS. Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Curr Sci* 88: 218-219, 2005.

224.Maier RM, Pepper IA. Earth environments. *In* Maier RM, Pepper IA, Gerba CP (eds.), *Environmental Microbiology*, Elservier, Oxford, p. 57-82, 2009.

225.Malik VS. Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem Sci* 5*:* 68-72, 1980.

226.Manivasagan P, Gnanam S, Sivakumar K, Thangaradjou T, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Antimicrobial and cytotoxic activities of an actinobacteria (*Streptomyces* Sp. PM-32) isolated from an offshore sediments of the Bay of Bengal in Tamilnadu. *ABR* 3: 231-136, 2009.

227.Manteca A, Sanchez J. *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 1: 560-566, 2010.

228.Maplestone R, Stone MJ, Williams DH. The evolutionary role of secondary metabolites – a review. *Gene* 115: 151-154, 1992.

229.Marra A. Antibacterial resistance: is there a way out of the woods? *Future Microbiol* 6: 707-709, 2011.

230.Marshall C, Wesselingh S, McDonald M, Spelman D. Control of endemic MRSA – what is the evidence? A personal view. *J Hosp Infect* 56: 253-268, 2004.

231.Martin JF, Demain AL. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* 44: 230-251, 1980.

232.Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902, 2009.

233.Martínez R, Chácon-Gárcia L. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Curr Med Chem* 12: 127-151, 2005.

234.Matsuura T. Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.). [Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos - FEA/Unicamp). Campinas, 68 p., 2004.

235.McCarthy AJ, Williams ST. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* 115: 189-192.

236.McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J* 32: 513-524, 1998.

237. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol* 15: 588-595, 2012.

238. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6: 924-935, 2006.

239. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general biossay for active plant constituents. *Planta Medica* 45: 31-34, 1982.

240. Minnikin DE, O'Donell AG. Actinomycete envelope lipid and peptidoglycan composition. *In* Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (eds.), *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, Londres, p. 337-387, 1984.

241. Miyadoh, S et al. *Atlas of Actinomycetes*. Asakura Publishing Co. Tokyo, 233 p., 1997.

242. MMA – Ministério do Meio Ambiente 2015. Manguezais. Disponível em: http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e marinha/manguezais. Acesso em: 05/01/2015.

243. MMA – Ministério do Meio Ambiente 2015. O Bioma Cerrado. Disponível em: http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado. Acesso em: 03/01/2015.

244. Morell EA, Balkin DM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. *Yale J Biol Med* 83: 223-233, 2010.

245. Mossini SAG, Kemmelmeier C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. *Acta Farm Bonaerense* 24: 139-148, 2005.

246. Moysés A, Silva ER. Ocupação e urbanização dos Cerrados: desafios para a sustentabilidade. *Cadernos Metrópoles* 20: 197-220, 2008.

247. Muller R, Wink J. Future potential for anti-infectives from bacteria – how to exploit biodiversity and genomic potential. *Int J Med Microbiol* 304: 3-13, 2014.

248. Mulvey MR, Simor AE. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *Can Med Assoc J* 180: 408-415, 2009.

249. Myers N, Mittermeier MA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858, 2000.

250. Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 54: 655-670, 2003.

251. NCI – National Cancer Institute 2014. *What is cancer?* Disponível em: http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer. Acesso: 10/05/2014.

252.Neto BAD, Lapis AAM. Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. *Molecules* 14: 1725-1746, 2009.

253.Nett M, Ikeda H, Moore BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26: 1362-1384, 2009.

254.Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1072, 1992.

255.Neves BP, Oliveira IP, Macedo FR, Santos KJG, Rodrigues C, Moreira FP. Utilização medicinal do Nim. *Revista Eletrônica FMB* 1: 107-118, 2005.

256.Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 78:119-46, 2009.

257.Nolan RD, Cross T. Isolation and screening of actinomycetes. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, Londres, p. 1-32, 1988.

258.Nomi R. Together with *Streptomycetes* for thirty-five years. *Actinomycetol* 6: 113-118, 1992.

259.Norrby SR, Nord CE, Finch R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis* 5: 115-119, 2005.

260.Nunes BS, Carvalho FD, Guilhermini LM, Stappen GV. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut* 144: 453-462, 2006.

261.O'Brien J, Wright GD. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 22: 552-558, 2011.

262.O'Donnel. Recognition of novel actinomycetes. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, Londres, p. 69-88, 1988.

263.Õiwa R. Antibacterial agents. *In* Omura S (ed.), *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*, Springer-Verlag, Nova York, p. 1-29, 1992.

264.Okami Y, Hotta K. Search and discovery of new antibiotics. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, Londres, p. 33-68, 1988.

265.Okudoh VI, Wallis FM. Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in KwaZulu-Natal, South Africa. *S Afr J Sci* 103: 216-222, 2007.

266.Olano C, Méndez C, Salas JA. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* 26: 628-660, 2009a.

267.Olano C, Méndez C, Salas JA. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar. Drugs* 7: 210-248, 2009b.

268. Oliveira PS, Marquis RJ. Introduction: Development of research in the Cerrados. *In* Oliveira PS, Marquis RJ (eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*, Columbia University Press, Nova York, p. 1-12, 2002.

269. Omoto S, Shomura T, Suzuki K, Inouye S. Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. II Isolation, structure and biological properties of N-carbamoyl-D-glucosamine (strain SF-1993). *J Antibiotics* 32: 436-441, 1979.

270. Omura S. Philosophy of new drug discovery. *Microbiol Rev* 50: 259-279, 1986.

271. Otto M. Community-associated MRSA: What makes them special? *Int J Med Microbiol* 303: 324-330, 2013.

272. Otto M. MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol* 14: 1513-1521, 2012.

273. Overbye KM, Barrett JF. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today* 10: 45-52, 2005.

274. Palchaudhuri R, Hergenrother PJ. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotech* 18: 497-503, 2007.

275. Palleroni NJ. A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*. *Arch Microbiol* 128: 53-55, 1980.

276. Palleroni NJ. Chamber for bacterial chemotaxis experiments. *Appl Environ Microbiol* 32: 729-730, 1976a.

277. Palleroni NJ. Chemotaxis in *Actinoplanes. Arch Microbiol* 110: 13-18, 1976b.

278. Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. *In Programme and Abstract Book for the International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation*, Tripureswore, Kathamandu, p. 12-15, 2004.

279. Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic *versus* bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clin Inf Dis* 38: 864-870, 2004.

280. Parenti F, Coronelli C. Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 33: 389-411, 1979.

281. Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD_{50} value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8: 395-400, 2001.

282. Pasberg-Gauhl C. A need for a new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria. *Drug Discov Today Technol* 11: 109-116, 2014.

283. Paul R, Prasad M, Sah NK. Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): a mini review. *Cancer Biol Ther* 12: 467-476, 2011.

284. Peláez F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – Can history repeat? *Biochem Pharm* 71: 981-990, 2006.

285. Pereira BAS, Venturoli F, Carvalho FA. Florestas estacionais do Cerrado: uma visão geral. *Pesq Agropec Trop* 41: 446-451, 2011.

286. Pereira JC, Neves MCP, Drozdowicz A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de Cerrados. *Pes Agropec Bras* 34:801-811, 1999.

287. Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4580-4587, 2009.

288. Persoone G, Wells PG. *Artemia* in aquatic toxicology: a review. *In* Sorgeloos P, Bengtson PA, Decleir W, Jaspers E. (eds.), Artemia *Research and Its Applications. Vol 1: Morphology, Genetics, Strains characterization, Toxicology*, Universa Press, Wetteren, p. 259-275, 1987.

289. Piddock LJV. The crisis of no new antibiotics – what is the way forward? *Lancet Infect Dis* 12: 249-253, 2012.

290. Pinheiro MHO, Monteiro R. Contribution to the discussions on the origin of the cerrado biome: Brazilian savanna. *Braz. J. Biol* 70: p. 95-102, 2010.

291. Piret JM, Demain AL. Actinomycetes in biotechnology: an overview. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, Londres, p. 461-481, 1988.

292. Procópio REL, Silva IS, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis* 16: 466-471, 2012.

293. Projan SJ. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr Opin Microbiol* 6: 427-430, 2003.

294. Puri HS. Introduction. *In* Puri HS (ed.), Neem: The Divine Tree *Azadirachta indica*, Overseas Publishers Association, Amsterdã, p. 1-7, 2003.

295. Qin S, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, Xu LH, Li WJ. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol* 75: 6176-6186, 2009.

296. Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46: 1088-1092, 1996.

297. Rajagopal K, Suryanarayanan TS. Isolation of endophytic fungi from leaves of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Curr Sci* 78: 1375-1378, 2000.

298.Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann Bot* 80: 223-230, 1997.

299.Read AF, Day T, Huijben S. The evolution of drug resistance and the curious orthodoxy of aggressive chemotherapy. *PNAS* 108: 10871-10877, 2011.

300.Reddy NG, Ramakrishna DPN, Rajagopal SV. Optimization of culture conditions of *Streptomyces rochei* (MTCC 10109*)* for the production of antimicrobial metabolites. *Egypt J Biol* 13: 21-29, 2011.

301.Reef R, Feeler IC, Lovelock CE. Nutrition of mangroves. *Tree Physiol* 30: 1148-1160, 2010.

302.Reponen TA, Gazenko SV, Grinshpun SA, Willeke K, Cole EC. Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl Environ Microbiol* 64: 3807-3812, 1998.

303.Rocha AB, Lopes RM, Schwartsmann G. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 1: 364-369, 2001.

304.Rodrigues AA. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats. [Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical - IPTSP/UFG], Goiânia, 80 pp., 2009.

305. Rodvold KA, McConeghy KW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Inf Dis* 58: S20-S27, 2014.

306.Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TSR, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *New Engl J Med* 370: 1524-1531, 2014.

307.Sahoo K, Dhal NK. Potential microbial diversity in mangrove ecosystem: a review. *Indian J Mar Sci* 38: 249-256, 2009.

308.Salas JA, Méndez C. Genetic manipulation of antitumor-agent biosynthesis to produce novel drugs. *Trends Biotechnol* 16: 475-482, 1998.

309.Sambrook J, Russel DW. Plasmids and their usefulness in molecular cloning. *In* Sambrook J, Russel DW (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2100 pp., 2001.

310.Sanglier JJ, Whitehead D, Saddler GS, Ferguson EV, Goodfellow M. Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. *Gene* 115: 235-242, 1992.

311.Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG. Mapeamento semidetalhado do uso de terra do bioma Cerrado. *Pesq Agropec Bras* 43: 153-158, 2008.

312. Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotech Adv* 31: 1397-1407, 2013.

313. Sarker SD, Nahar L. An introduction to natural products isolation. *Methods Mol Biol* 864: 1-25, 2012.

314. Schaeffer-Novelli Y, Cíntron-Molero G, Soares MLG, De-Rosa D. Brazilian mangroves. *Aquat Ecosys Health Manage* 3: 561-570, 2000.

315. Schaeffer-Novelli Y. Manguezal, marisma e apicum. *In* Fundação BIO - RIO; Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente do Pará - SECTAM; Instituto de Desenvolvimento Econômico e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte - DEMA; Sociedade Nordestina de Ecologia - SNE [et al]. (Org.). MMA - Ministério do Meio Ambiente 2002. Avaliações e ações prioritárias para conservação da biodiversidade das Zonas Costeira e Marinha. Brasília: MMA/SBF, 2002.

316. Schleifer KH, Stackebrandt E. Molecular systematics of prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* 37: 143-187, 1983.

317. Schleifer KH. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 32: 533-542, 2009.

318. Schmutterer H. Properties and potential of natural pesticides from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* 35: 271-297, 1990.

319. Schremfp H. The family *Streptomycetaceae*, Part II: Molecular Biology. *In* Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.), *The Prokaryotes. Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, Springer, Nova York, p. 605-622, 2006.

320. Schwartsmann G, Ratain MJ, Cragg GM, Wong JE, Saijo N, Parkinson DR, Fujiwara Y, Pazdur R, Newmann DJ, Dagher R, Di Leone L. Anticancer drug discovery and development throughout the world. *J Clin Oncol* 20: 47-59, 2002.

321. Schwartsmann G, Winograd B, Pinedo HM. The main steps in the development of anticancer drugs. *Radiother Oncol* 12: 301-313, 1988.

322. SEMADS – Secretaria do Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Estado do Rio de Janeiro. Aspectos geográficos, históricos e sócio-ambientais dos manguezais. *In* SEMADS (ed.) *Manguezais: Educar para Proteger*, Rio de Janeiro, p. 9-18, 2001.

323. Sêmedo LTAS, Linhares AA, Gomes RC, Manfio GP, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RRR. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiol Res* 155: 291-299, 2001.

324. Senthil-Nathan S. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Front Physiol* 4: 1-17, 2013.

325. Seong CN, Choi JH, Baik KS. An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *J Microbiolol* 39: 17-23, 2001.

326. Sepkowitz KA. One hundred years of Salvarsan. *N Engl J Med* 365: 291-293, 2011.

327. Servin JA, Herbold CW, Skophammer RG, Lake JA. Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria. *Mol Biol Evol* 25: 1-4, 2008.

328. Shaffer RK. The challenge of antibiotic-resistant *Staphylococcus*: lessons from hospital nurseries in the mid-20th century. *Yale J Biol Med* 86: 261-270, 2013.

329. Shin HJ, Lee HS, Lee DS. The synergistic antibacterial activity of 1-acetyl-β-carboline and β-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Microbiol Biotechnol* 20: 501-505, 2010.

330. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313-340, 1966.

331. Shlaes DM. The abandonment of antibacterials: why and wherefore? *Curr Opin Pharmacol* 3: 470-473, 2003.

332. Shomura T, Yoshida J, Amano S, Inouye S, Niida T. Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology – productivity relationship of *Streptomyces halstedii* (strain SF-1993). *J Antibiotics* 32: 427-435, 1979.

333. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the infulence of contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23: 15-22, 1957.

334. Silva MS, Sales AN, Magalhães-Guedes KT, Dias DR, Schwan RS. Brazilian Cerrado soil Actinobacteria research. *Biomed Res Int* 2013: 1-10, 2013.

335. Silva NA, Villela PMS, Boschiero C, Andrade JLF, Coutinho LL. Método alternativo de purificação de produto de PCR para seqüenciamento. 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador. Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética: p. 409, 2008.

336. Slonczewski JL, Foster JW. Bacterial Cultural, Growth and Development. *In* Slonczewski JL, Foster JW (eds.), *Microbiology: An Evolving Science*, W. W. Norton & Company, Nova York, p. 145, 2009.

337. Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ* 346: 1-15, 2013.

338. Souza MV, Reis C, Pimenta FC. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. *Rev Pat Trop* 34: 27-36, 2005.

339. Spellberg B, Guidos R, Glibert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld M, Bartlett JG, Edwards J. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Inf Dis* 46: 155-164, 2008.

340. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards Jr. JE. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis* 38: 1279-1286, 2004.

341. Spellberg B. The future of antibiotics. *Crit Care* 18: 1-7, 2014.

342. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin resistance in Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 15: 430-438, 2002.

343. Srinivasan MC, Laxman RS, Deshpande MV. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World J Microbiol Biotecnol* 7: 171-184, 1991.

344. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchical classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Evol* 47: 479-491, 1997.

345. Stackebrandt E, Schumann P. Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. *In* Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.), *The Prokaryotes. Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, Springer, Nova York, p. 297-321, 2006.

346. Staneck JL, Roberts GD. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* 8: 226-231, 1974.

347. Sticher O. Natural products isolation. *Nat Prod Rep* 25: 517-554, 2008.

348. Stone MJ, Williams DH. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Mol Microbiol* 6: 29-34, 1992.

349. Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich sequences. *Mol Biotechnol* 54: 1048-1054, 2013.

350. Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 491-502, 2003.

351. Subramani R, Aalbersberg W. Culturable rare actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 9291-9321, 2013.

352. Takahashi A, Kurasaw S, Ikeda D, Okami Y, Takeuchi T. Altemicin, a new acaricidal and antitumor substance. *J Antibiot* 52: 1556-1561, 1989.

353. Tan G, Gyllenhaal C, Soejarto DD. Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Curr Drug Targets* 7: 265-277, 2006.

354. Tanvir R, Sajid I, Hasnain S. Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with *Asteraceae* plants: isolation, biodiversity and bioactivities. *Biotechnol Lett* 36: 767-773, 2014.

355. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* 119: 3-10, 2006.

356.Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, Bora TC. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India. *Journal de Mycologie Médicale* 17: 242-249, 2007.

357.Theuretzbacher U. Future antibiotics scenario: is the tide starting to turn? *Int J Antimicrob Ag* 34: 15-20, 2009.

358.Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 60: 95-103, 2011.

359.Sobrinho Jr. IS, Bataus LAM, Guimarães, VM, Ulhoa CJ. Purification and properties of an N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces cerradoensis*. *Biotechnol Let*, 27: 1273-1276, 2005.

360.Umezawa H. Low-molecular-weight enzymes inhibitors and imunomodifiers. *In* Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, Londres, p. 285-326, 1988.

361.Valgas C, Souza SM, Smânia EFA, Smânia Jr. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol* 38: 369-380, 2006.

362.Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Struelens MJ, Tulkens PM. The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA compounds. *Trends Pharmacol Sci* 29: 124-134, 2008.

363.Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis. Methods Enzymol* 235: 196-205, 1994.

364.Veitch GE, Boyer A, Ley SV. The azaradachtin story. *Angew Chem Int Ed* 47: 9402-9429, 2008.

365.Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 495-548, 2007.

366.Verkman AS. Drug discovery in academia. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: 465-474, 2004.

367.Verma M, Lal D, Kaur J, Saxena A, Kaur J, Anand S, Lal R. Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. *Res Microbiol* 164: 718-728, 2013.

368.Verma VC, Gond SK, Kumar A, Mishra A, Kharwar RN, Gange AC. Endophytic actinomycetes from *Azadiractha indica* A. Juss.: isolation, diversity and anti-microbial activity. *Microb Ecol* 57: 749-756, 2009.

369.Verma VC, Gond SK, Kumar K, Kharwar RN, Boulanger LA, Strobel G. Endophytic fungal flora from roots and fruits of an Indian Neem plant *Azadirachta indica* A. Juss., and impact of culture media on their isolation. *Indian J Microbiol* 51: 469-476, 2011.

370. Verma VC, Gond SK, Kumar K, Kharwar RN, Strobel G. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). *Microb Ecol* 54: 119-125, 2007.

371. Vieira JDG. Purificação e caracterização de uma α-amilase de *Streptomyces sp.* [Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia) - ICB/UFG]. São Paulo, 86p., 1999.

372. Vieira MM, Oliveira BFR, Sadoyama G, Vieira JDG. Produção de lipase e esterase por bactérias isoladas em um mangue em Guarapari, ES. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Natal. ANAIS DO 27º CBM, 2013. Disponível em: http://www.sbmicrobiologia.org.br/cd27cbm/resumos/R2222-1.html.

373. Vijayakumar R, Panneerselvam K, Muthukumar C, Thajuddin N, Panneerselvam A, Saravanamuthu R. Optimization of antimicrobial production by a marine actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J Microbiol* 52: 230-239, 2012.

374. Vining LC. Functions of secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 44: 395-427, 1990.

375. Vobis G. The genus *Actinoplanes* and related genera. *In* Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.), *The Prokaryotes. Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*, Springer, Nova York, p. 623-653, 2006.

376. Waksman SA. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. *Int Rec Med Gen Pract Clin* 167: 267-280, 1953.

377. Waksman SA. *The Actinomycetes. Classification, Identification and Description of Genera and Species, Vol. 2*. Williams and Wilkins (ed.), Baltimore, 327 pp, 1961.

378. Walsh FM, Amyes SGB. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Curr Opin Microbiol* 7:439-444, 2004.

379. Watve MG, Rashmi T, Jog MM, Bhole BD. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176: 386-390, 2001.

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

381. Wellington EMH, Toth IK. Actinomycetes. *In* Bottomley PS, Angle JS, Weaver RW (eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 – Microbiological and Biochemical Properties*, Soil Science Society of America, Madison, p. 269-290, 1994.

382. White RJ. The early history of antibiotic discovery: empiricism ruled. *In* Dougherty TJ, Pucci MJ (eds.), *Antibiotic Discovery and Development*, Springer, Nova York, p. 3-31, 2012.

383. WHO – Word Health Organization 2014. *Cancer*. Disponível em: http://www.who.int/topics/cancer/en/. Acesso em: 10/05/2014.

384.Williams PG. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol* 27: 45-52, 2009.

385.Williams ST, Davies FL. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol* 38: 251-261, 1965.

386.Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PH, Sackin MJ. Numerical taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol* 129: 1743-1813, 1983.

387.Williams ST, Lanning S, Wellington EMH. Ecology of actinomycetes. *In* Goodfellow M, Willians ST and Mordarski M (eds.), *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, Londres, p. 481-528, 1984.

388.Williams ST, Vickers JC, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ, Mortimer AM. Numerical classification and identification of streptomycetes. *In* Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF, Yakoleff V (eds.), *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, Academic Press, Orlando, p. 537-551, 1984.

389.Wink JM 2012. Methods for the taxonomic description of actinobacteria. *In* Wink JM, *Compendium of Actinobacteria* [Internet], Braunschweig, p. 1-37, 2012. Disponível em: http://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/Bacterial_Nomenclature_uptodate/Actinomethods.pdf. Acesso em: 03/01/2014.

390.Wohlleben W, Mast Y, Muth G, Rottgen M, Stegmann E, Weber T. Synthetic biology of secondary metabolite biosynthesis in actinomycetes: engineering precursor supply as a way to optimize antibiotic production. *FEBS Lett* 586: 2171-2176, 2012.

391.Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen KY. Genomic evidence for antibiotic resistance genes of actinomycetes as origins of antibiotic resistance genes in pathogenic bacteria simply because actinomycetes are more ancestral than pathogenic bacteria. *Med Hypotheses* 67: 1297-1304, 2006.

392.Wosten HAB, Willey, JM. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology* 146: 767-773, 2000.

393.Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* 13: 589-594, 2010b.

394.Wright GD. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology* 8: 1-6, 2010a.

395.Xu DB, Ye WW, Han Y, Deng ZX, Hong K. Natural products from mangrove actinomycetes. *Mar Drugs* 12: 2590-2613, 2014.

396.Xu J. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. *RSC Adv* 5: 841-892, 2015.

397. Yamamoto T, Hung WC, Takano T, Nishiyama A. Genetic nature and virulence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed* 3: 2-18, 2013.

398. Yim G, Wang HH, Davies J. The truth about antibiotics. *Int J Med Microbiol* 296: 163-170, 2006.

399. Yoo JC, Kim JH, Ha JW, Park SO, Sohng JK, Lee JW, Park SC, Kim SM, Seong CN. Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *J Microbiol* 45: 6-10, 2007.

400. Zenaitis MG. Antibiotic production using self-cycling fermentation technique. [Dissertação de Mestrado - Department of Chemical Engineering/McGill University], Montreal, 67 pp., 1993.

401. Zhao K, Penttinen P, Guan T, Xiao J, Chen Q, Xu J, Lindstorm K, Zhang L, Zhang X, Strobel GA. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. *Curr Microbiol* 62: 182-190, 2011.

402. Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol* 156: 984-986, 2005.

ANEXOS

ANEXO I – Composição dos meios de cultura e soluções reagentes empregados

Anexo IA – Meios de cultura

Todos os meios de cultivo preparados no estudo foram esterilizados em autoclave a 121ºC por 20 minutos. Para alguns meios, detalhes especiais a respeito do preparo estão explicitados logo abaixo da composição química dos mesmos.

Ágar Amido-Caseína (AC) (Waksman 1961)

KH_2PO_4..... 0,5 g
$MgSO_4$..... 0,5 g
Amido..... 10,0 g
Caseína..... 1,0 g
Ágar..... 15,0 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (ISP-2) (Shirling & Gottlieb 1966)

Glicose..... 4,0 g
Extrato de levedura..... 4,0 g
Extrato de malte..... 10,0 g
Ágar..... 20,0 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Caldo Luria-Bertani (LB)

Triptona..... 10,0 g
Extrato de levedura..... 5,0 g
NaCl..... 10,0 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Ágar Aveia (ISP-3) (Shirling & Gottlieb 1966)

Aveia..... 20,0 g

Solução de elementos-traço..... 1,0 mL

Ágar..... 18,0 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Preparo: Adicionar 20 g de aveia em 1.000 mL de água destilada em cozer por 20 minutos. A mistura é filtrada em morim e o volume restaurado com água destilada para 1.000 mL. Um volume de 1,0 mL da solução de elementos-traço (abaixo) é acrescentado (esterilizada por filtração e armazenada em refrigerador), o pH ajustado para 7,0 com NaOH. Após o acréscimo de 18 g de ágar, o meio é autoclavado por 20 minutos a 121ºC.

Solução de elementos-traço (para os meios ISP-3, 4, 5 e 7):

$FeSO_4.7H_2O$..... 0.1 g

$MnCl_2.4H_2O$..... 0,1 g

$ZnSO_4.7H_2O$..... 18,0 g

H_2O..... 100 mL

Ágar Amido-Sais Inôrganicos (ISP-4) (Shirling & Gottlieb 1966)

Solução I:

Amido solúvel..... 10,0 g

H_2O..... 500 mL

Solução II:

K_2HPO_4..... 1,0 g

$MgSO_4.7H_2O$..... 1,0 g

NaCl..... 1,0 g

$(NH_4)_2SO_4$..... 2,0 g

$CaCO_3$..... 2,0 g

Solução de elementos-traço..... 1,0 mL

H_2O..... 500 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Ágar..... 20,0 g

Preparo: À massa de amido, acrescentar uma pequena quantidade de água destilada para produção de uma pasta. Em seguida, adicionar água destilada para completar um volume de 500 mL. As soluções I e II são misturadas e o ágar é então adicionado.

Ágar Glicerol-Asparagina (ISP-5) (Shirling & Gottlieb 1966)

L-asparagina..... 1,0 g
Glicerol..... 10,0 g
K_2HPO_4..... 1,0 g
Solução de elementos-traço..... 1,0 mL
Ágar..... 20,0 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Ágar Ferro-Extrato de Levedura-Peptona (ISP-6) (Korn-Wendisch & Kutzner 1992)

Peptona..... 15,0 g
Proteose peptona..... 5,0 g
Extrato de levedura..... 1,0 g
Citrato de amônio férrico..... 0,5 g
K_2HPO_4..... 0,5 g
Tiossulfato de sódio..... 0,08 g
Ágar..... 20,0 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Ágar Tirosina (ISP-7) modificado (Korn-Wendisch & Kutzner 1992)

Glicerol..... 15,0 g
L-tirosina..... 0,5 g
L-asparagina..... 1,0 g
K_2HPO_4..... 0,5 g
NaCl..... 0,5 g
$FeSO_4.7H_2O$..... 0,01 g
Solução de elementos-traço..... 1,0 mL

Ágar..... 20,0 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Caldo 5006 modificado (Wink 2012)

Sacarose..... 3,0 g
Glicose..... 15,0 g
Extrato de malte..... 1,0 g
Extrato de levedura..... 2,0 g
TSB..... 5,0 g
NaCl..... 0,01 g
K_2HPO_4..... 0,5 g
$FeSO_4.7H_2O$..... 0,01 g
$MgSO_4.7H_2O$..... 0,5 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Meio basal de tolerância ao NaCl (Wink 2012)

Peptona caseína..... 10,0 g
Extrato de levedura..... 5,0 g
Ágar..... 18,0 g
H_2O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Preparo: Adiciona-se as seguintes concentrações de NaCl: 0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0%, anterior ao ajuste de pH. Após o acréscimo de 18 g de ágar, o meio é autoclavado por 20 minutos a 121ºC.

Ágar Bennet's modificado (MBA) (Jones 1949)

Extrato de levedura..... 1,0 g
Extrato de carne..... 0,8 g
Bacto-casitona..... 2,0 g
Glicose..... 10,0 g
Ágar..... 18,0 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Meio para determinação da atividade proteolítica (Vieira 1999)

Solução I:

Caldo Nutriente..... 1,0 g

Glicose..... 0,8 g

Ágar..... 15,0 g

H_2O..... 1.000 mL

Solução II:

Leite desnatado..... 15 mL

H_2O..... 1.000 mL

Preparo: As duas soluções são autoclavadas separadamente e depois reunidas assepticamente.

Meio de Sierra (Sierra 1957)

Solução I:

Peptona..... 10,0 g

NaCl..... 5,0 g

$CaCl_2$. H_2O..... 0,1 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Solução II:

Tween 80..... 0,1 g

H_2O..... 1.000 mL

Preparo: As duas soluções são autoclavadas separadamente e depois reunidas assepticamente.

Ágar Triptona (Goodfellow & Alderson 1979)

Triptona..... 20,0 g

NaCl..... 5,0 g

Ácido ribonucleico..... 3,0 g

Ágar..... 15,0 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,3

Ágar Uréia (Korn-Wendisch & Kutzner 1992)

Peptona..... 1,0 g

Glicose..... 1,0 g

NaCl..... 5,0 g

KH_2PO_4..... 2,0 g

Vermelho de fenol..... 0,0012 g

Ágar..... 15,0 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Preparo: A uréia é acrescentada depois da autoclavagem do meio basal na concentração de 1,0% (m/v), já esterilizada por filtração.

Meio para determinação da hidrólise de ácido úrico (Vieira 1999)

Glicose..... 1,0 g

Extrato de levedura..... 1,0 g

Ácido úrico..... 5,0 g

Ágar..... 18,0 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Ágar Esculina (Williams et al. 1983)

Esculina..... 1,0 g

Extrato de levedura..... 3,0 g

Citrato de amônio ferroso..... 0,5 g

Ágar..... 7,5 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Ágar Nitrato modificado (Atlas 2005)

Peptona..... 10,0 g

Extrato de carne..... 3,0 g

Extrato de levedura..... 2,0 g

NaCl..... 5,0 g

Ágar..... 6,0 g

H_2O..... 1.000 mL

pH..... 7,2 ± 0,2

Anexo IB – Soluções reagentes e tampões

Solução de lugol (para revelação do teste de hidrólise de amido)

Iodo..... 5,0 g

Iodeto de potássio..... 10,0 g

H_2O..... 100 mL

Preparo: Os reagentes são solubilizados em 10 mL de água destilada e depois o volume é completado para 100 mL.

Reativos Griess-Ilosvay (para o teste de redução do nitrato)

I

Ácido sulfanílico..... 8,0 g

Ácido acético 5M..... 1.000 mL

II

Alfa naftilamina..... 5,0 g

Ácido acético 5M..... 1.000 mL

Tampão EDTA (0,5 M; pH 8,0)

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)..... 18,612 g

H_2O..... 80 mL*

Preparo: A solução deve ter o pH ajustado com aproximadamente 2,2 g de lentilhas de NaOH. No final, o volume é ajustado até 100 mL* com água destilada.

Tris-HCl (1 M)

Trizma base..... 121 g

H_2O..... 800 mL*

Preparo: Manter a solução em repouso a temperatura ambiente antes de ajustar o pH. Transferir o volume de HCl concentrado de acordo com o pH desejado: 60 mL para pH 7,6 e 42 mL para pH 8,0. Completar para o volume de água destilada de 1000 mL e autoclavar (121ºC por 15-20 minutos).

Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl (pH 7,6)..... 10 mM

EDTA (pH 8,0)..... 1,0 mM

pH..... 7,5

NaCl (5 M)

NaCl..... 29,2 g

H_2O ultrapura..... 100 mL

Preparo: Solubilizar o NaCl em 70 mL de água. Após completar volume para 100 mL.

Soluções de lise alcalina (Sambrook & Russel 2001)

Solução I

Tris-HCl (pH 7,4)..... 150 mM

EDTA (pH 8,0)..... 10 mM

Solução II

NaOH..... 200 mM

SDS..... 1,0 % (m/v)

Solução III

Acetato de sódio..... 3,0 M

Ácido acético glacial (pH 5,0)..... 2,0 M

Preparo: Acrescentar 80% do volume de água ultrapura ao acetato de sódio. Após solubilização, ajustar o pH com ácido acético glacial até completar o volume.

Tampão de amostra

Azul de bromofenol.....	0,5%
Glicerol.....	50%
EDTA (pH 8,0).....	100 mM

Tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5X

Trizma base.....	10 mM
Ácido bórico.....	90 mM
EDTA (pH 8,0).....	1,0 mM

Tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE) 50X*

Trizma base.....	242 g
Ácido acético glacial.....	57,1 mL
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	100 mL
H_2O destilada.....	1.000 mL

*Concentração de uso: 0,5 a 1,0X.

ANEXO II – Ficha de solicitação das amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar da Fundação Oswaldo Cruz (CCBH/FIOCRUZ).

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

USO DA CCBH
REGISTRO Nº 48

COLEÇÃO DE CUTURAS DE BACTÉRIAS DE INTERESSE EM SAÚDE

F O R N E C I M E N T O D E C E P A

DADOS SOBRE O SOLICITANTE

Nome do destinatário: José Daniel Gonçalves Vieira

Instituição de ensino/pesquisa: Instituição: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universiadade Federal de Góias / Lab. de Microbiologia Ambiental de Biotecnologia – Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia

Endereço completo: Rua 235 – s/n – Setor Universitário / CEP: 74605050 - Goiânia – Góias

Telefone : (62) 3209 6108 Fax: (62) 320906363

DADOS SOBRE A CEPA E CARACTERÍSTICAS GERAIS

Registro CCBH	Espécime	Característica da cepa
10882	*Sthaphylococcus aureus* *	MRSA
8508	*Sthaphylococcus aureus*	MRSA
7903	*Sthaphylococcus aureus*	MRSA
6087	*Sthaphylococcus aureus*	MRSA
6089	*Sthaphylococcus aureus*	MRSA

Meio de cultivo recomendado: Tripticase Soy Agar

Temperatura de incubação: 37C

Nível de risco biológico: NB 2

Forma de encaminhamento: (X) Cultura em tubo ( ) Cultura em placa ( ) Frasco-ampola, contendo papel de filtro impregnado com esporos liofilizados ( ) Papel de filtro impregnado com esporos em sistema de embalagem de papel grau cirúrgico lacrado.

OBSERVAÇÕES:

Curador da CCBH

Dra. Ana Paula A. C. Asser
Chefe
Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
FIOCRUZ

*Onde lê-se "*Sthaphylococcus aureus*", o correto é "*Staphylocoocus aureus*" (erro de digitação).