

## 1. INTRODUÇÃO

## **1. Introdução**

Actinomicetos são procariotos gram-positivos pertencentes à ordem *Actinomycetales*, caracterizados pela formação de micélio de substrato, micélio aéreo, produção de esporos e alto conteúdo de G+C em seu DNA. São, em sua maioria, aeróbios, quimio-heterotróficos, saprófitos, encontrados principalmente no solo, onde seu crescimento é controlado por fatores ambientais abióticos e biológicos tais como teor de matéria orgânica, pH, umidade, aeração, profundidade e estação climática (Alexander 1961; Holt et al. 1994; Heuer 1997; Vieira & Nahas 2005; El-Tarabily & Sivasithamparam 2006).

Possuem importância indiscutível na sustentabilidade da biosfera, têm papel predominante nos ciclos biogeoquímicos e destacam-se por uma extraordinária habilidade de produzir metabólitos secundários, substâncias não essenciais para o desenvolvimento bacteriano, que conferem caracteres seletivos ao microrganismo produtor. Os produtos do metabolismo secundário apresentam diversas estruturas químicas e atividades biológicas, que possuem aplicação nas áreas agrícola, industrial e médico-farmacêutica, atuando como herbicidas, pesticidas, anti-parasitários, enzimas, substâncias promotoras de crescimento animal e vegetal, imunoreguladores, antibióticos, antivirais e antitumorais (Umezawa 1967; Weber et al. 2003; Oskay et al. 2004; Ramírez-Durán et al. 2006).

O primeiro antibiótico produzido por actinomicetos isolados a partir do solo foi a actinomicina, obtida de *Streptomyces antibioticus* que apresentava potente atividade antibacteriana, entretanto elevada toxicidade, o que inviabilizou o seu uso na terapêutica. Posteriormente, foi identificada a estreptomicina produzida por *Streptomyces griseus*, com grande impacto na terapêutica por não ser tóxica e por apresentar grande eficiência no tratamento da tuberculose. Desde então vários outros antibióticos foram isolados a partir de actinomicetos, sendo que atualmente somam mais de 5000 conhecidos. Os fatores que regulam a expressão dos genes envolvidos na síntese destes antibióticos são controlados por nutrientes disponíveis no meio de cultura, pH, temperatura e aeração (Perkins 1965; James & Edwards 1989; Hobbs et al. 1990; Demain 1992; Bystrikh et al. 1996; Bryder 2002).

Em um contexto geral da história da medicina, poucas descobertas tiveram um impacto tão profundo, na vida humana e na sociedade, quanto a descoberta dos antibióticos. A partir da segunda metade do século XX, começou a se utilizar clinicamente um grande número de substâncias antibióticas no controle das infecções. A grande euforia originada pela descoberta e utilização em grande escala dos antibióticos e quimioterápicos a partir de 1940, levou a uma

diminuição significativa na morbidade e letalidade para a maioria das doenças microbianas, mas foi substituída por um clima de apreensão nos meios médico e científico, pois o uso abusivo e, muitas vezes, irracional dessas drogas teve como consequência a seleção e disseminação de microrganismos resistentes (Moreillon 1995; Montelli & Sadatsune 2001; Lowy 2003).

Um dos maiores desafios na terapêutica das infecções microbianas tem sido a emergência de microrganismos resistentes aos antimicrobianos atualmente disponíveis. Desde os primeiros relatos até os dias atuais, a frequência de microrganismos multirresistentes vem aumentando em instituições de saúde e comunidade, constituindo falha terapêutica, recorrência de infecções e elevado custo. Neste cenário faz-se necessário destacar os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) que são importantes patógenos e causa frequente de infecções em todo mundo, com índices significativos de morbimortalidade. Tais microrganismos possuem vários fatores de virulência, diversidade de infecções potencialmente fatais e uma extrema capacidade de disseminação e adaptação às diferentes condições ambientais (Arbuthnott et al. 1990; Dinges et al. 2000; Oliveira et al. 2002).

Considerados problemas mundiais de saúde pública, o crescente nível de resistência dos MRSA desponta para um quadro alarmante: o aparecimento de microrganismos virtualmente resistentes a todo o arsenal antimicrobiano disponível na atualidade e isso, provavelmente, significará um retrocesso à era pré-antibiótica. Esse fato tem despertado um maior interesse pela busca de novas e melhores substâncias antimicrobianas e redireciona a atenção para os actinomicetos (Souza 1998; Chambers 2001; Debbia et al. 2001; Watson et al. 2003; Peláez 2006).

A biotecnologia baseia-se na pesquisa e descobrimento de recursos biológicos exploráveis, portanto são de grande interesse pesquisas que visem o descobrimento de microrganismos com potencial para a exploração em processos biotecnológicos, especialmente aqueles que gerem melhoria da qualidade de vida da população. A atenção dada aos actinomicetos em aplicações biotecnológicas é um resultado natural da sua grande diversidade metabólica e ecológica, além de uma grande capacidade de produção de compostos empregados em diferentes necessidades humanas (Bull et al. 1992; Bull et al. 2000).

O Brasil destaca-se por sua megabiodiversidade, não totalmente conhecida e muito menos aproveitada. Destaca-se ainda pelo rápido processo que está levando à eliminação

dessa riqueza potencial. O caso mais antigo, que ilustra o processo, é o da Floresta Atlântica, explorada durante séculos e hoje restrita a menos de 7,0% de seu tamanho original. No caso do Cerrado, tem-se que mais de 50,0% de sua área original está completamente ocupada por atividades produtivas, mas ainda faltam informações e estimativas mais precisas sobre sua destruição (MMA 2006).

A descoberta de actinomicetos produtores de compostos naturais desconhecidos ocorre quando novos sistemas de seleção são utilizados, quando materiais de locais ainda não explorados são examinados ou a partir da manipulação das condições de cultivo dos microrganismos (Duke et al. 2002). Vale ressaltar que o grande desafio para a comunidade científica nas próximas décadas envolve a determinação de novos sítios de ação dos antimicrobianos, o estudo detalhado dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos para preservação de sua subsistência, a pesquisa de novas drogas altamente eficazes frente a determinados patógenos e a busca por substâncias que apresentem efetiva ação antineoplásica. Portanto, o isolamento de actinomicetos de solos de biomas brasileiros como o Cerrado e a Floresta Atlântica é uma forma de se encontrar microrganismos com atividades novas ou com aplicações conhecidas, porém melhores que aquelas em uso (Nolan & Cross 1988; Wang et al. 1999; Montelli & Sadatsune 2001).

O fato de que muitos antibióticos já foram descobertos não faz cessar a pesquisa por novas moléculas, pois enquanto existirem doenças sem tratamento, a pesquisa continuará e mesmo quando um tratamento eficaz estiver disponível, será sempre possível que um outro mais eficaz e menos tóxico possa ser encontrado. Com este raciocínio visamos neste trabalho dar uma contribuição ao estudo dos actinomicetos de solos de Cerrado e Mata Atlântica, não só através de seu isolamento, mas também quanto a sua capacidade de produzir antibióticos com atuação frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, bem como avaliar a citotoxicidade e uma possível atividade antitumoral dos compostos produzidos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Actinomicetos**

O termo actinomiceto deriva-se do grego (*aktis* =irradiado; *mykes*=fungo) e refere-se a um grupo heterogêneo de microrganismos que filogeneticamente pertence ao ramo das bactérias gram-positivas (Pandey et al. 2004). Desde a sua descrição em 1875, os actinomicetos foram considerados microrganismos exóticos, com características de fungos filamentosos e de bactérias. Entretanto a partir de 1950, com o melhor conhecimento do material genético e composição química ficou comprovada sua natureza procariótica (Goodfellow & Cross 1984; Wösten & Willey 2000).

As principais evidências que colocam os actinomicetos junto aos procariotos são a ausência de uma membrana nuclear e a sensibilidade à lisozima e a agentes antibacterianos em geral (Coelho 1976). Estes microrganismos possuem uma parede celular de 10,0 a 20,0nm de espessura e composição química típica de bactérias, consistindo de peptidoglicano associado a um ou mais polímeros, tais como ácidos teicóicos aniônicos e polissacarídeos neutros (Piret & Demain 1988; McNeil & Brown 1994). A classificação desta estrutura em quatro quimiotipos distintos é feita com base em duas informações químicas importantes: o aminoácido dibásico (isômero *L* ou *meso* do ácido diaminopimélico- DAP) que está presente na parede celular, e os açúcares presentes no hidrolisado celular em adição aos ácidos murâmico e glicosamina do peptidoglicano (Suput et al. 1967; Lechevalier 1989; Anazawa & Manfio 1997).

Actinomicetos apresentam uma região nuclear fibrilar e citoplasma granular com ribossomos de até 12,0nm de diâmetro, podendo conter inclusões, dependendo do organismo, da idade e do meio de crescimento utilizado (Piret & Demain 1988). A membrana citoplasmática é típica, varia de 7,5 a 10,0nm de espessura, do tipo bicamada lipídica, obtida pela interação anfipática de lipídeos e proteínas de membrana que produzem uma matriz estável para incorporação de outros lipídeos funcionais (Minnikin & O'Donnel 1984).

O DNA (ácido desoxirribonucléico) apresenta-se em forma condensada, com alto teor de guanina e citosina ( $G+C > 50,0\%$ ), frequentemente em múltiplas cópias nas células das hifas, mas usualmente somente uma cópia nos esporos. Possuem, com elevada frequência,

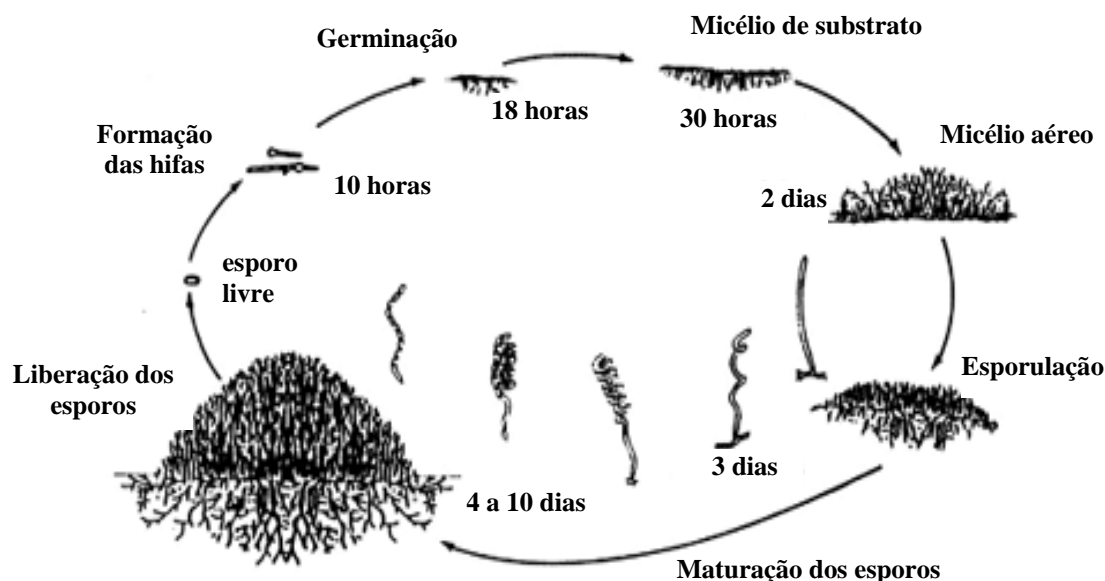
DNA extracromossomal (plasmídeos), em uma ampla variedade de tamanhos (10 a 40 Kb) e número de cópias (1 a 30). Estes têm importante papel na fertilidade, transferência de genes, rearranjos genômicos e produção de antibióticos. A maioria desses plasmídeos também é rica em G+C, podendo ser lineares ou circulares, autônomos ou integrados (Piret & Demain 1988; Kinashi & Shimaji-Murayama 1991; Bentley & Parkhill 2004).

Quanto ao requerimento de oxigênio os actinomicetos são principalmente aeróbios, mas alguns gêneros podem apresentar-se anaeróbios facultativos ou obrigatórios. São geralmente quimio-heterotróficos e utilizam uma ampla variedade de fontes de energia, incluindo polímeros complexos (Holt et al. 1994). Possuem um sistema enzimático bastante completo, não sendo nutricionalmente exigentes. A maioria deles é capaz de crescer em meio contendo apenas uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio (mineral ou orgânico), sais minerais e água, sem necessidade de adição de vitaminas, cofatores e outras substâncias mais complexas (Küster 1967).

Dentre as características comuns com os fungos filamentosos, destacam-se: a) o ciclo de vida e a morfologia superficial, pois apresentam formação de micélio e desenvolvimento de esporos (Goodfellow & Willians 1983; McNeil & Brown 1994; Gutiérrez-Lugo & Essayag 2003); b) a secreção de moléculas que reduzem a tensão em um ambiente aquoso, capacitando a hifa a crescer na superfície, recoberta por um filme hidrofóbico (Wösten & Willey 2000); c) seu cultivo em meio de cultura líquido apresenta-se, na maioria das vezes, como uma massa ou sedimento, raramente resultando em turbidez (Ensign 1978; Vobis 1997).

Em seu ciclo de vida, os actinomicetos apresentam um processo de diferenciação celular caracterizado por uma alteração morfológica bastante complexa, além de um processo de diferenciação química envolvendo uma extraordinária habilidade de produzir variadas moléculas bioativas, o que os torna microrganismos economicamente importantes (Demain 1989; Vining 1990). A fase vegetativa do crescimento é representada pelo micélio vegetativo, formando hifas ramificadas que penetram no substrato sólido, permitindo a exploração de recursos disponíveis, como exemplificado pela Figura 1 (Weber et al. 2003; Ryotaro et al. 2006). A massa micelial favorece uma alta concentração local de enzimas, tais como amilases, celulasas, pectinases e proteases, que hidrolisam restos orgânicos relativamente complexos. Após esse período de crescimento vegetativo as hifas no centro da colônia sofrem lise, fornecendo nutrientes para o crescimento das hifas aéreas. Esta fase coincide com a produção de diversas substâncias intracelulares biologicamente ativas, conhecidas como metabólitos secundários. As hifas aéreas, por sua vez, passam por um

processo de septação e formação de esporos, podendo formar estruturas enoveladas com diversos graus de complexidade. Os esporos propiciam a dispersão do organismo e são extremamente resistentes à dessecação, favorecendo a sobrevivência em condições adversas. Todo o processo de diferenciação é rigorosamente controlado por um sistema regulatório (Chater 1989; Demain 1989; Bibb 1996; Chater 2001).



**Figura 1** – Ciclo de vida dos membros do gênero *Streptomyces* (Fonte: Ryotaro et al. 2006).

A ordem *Actinomycetales* é constituída de microrganismos que possuem morfologia que varia desde simples bastonetes e cocos até uma organização micelial complexa e apresentam a capacidade de formar hifas em algum estágio de seu desenvolvimento (Goodfellow et al. 1984; Holt et al. 1994). Produzem filamentos (hifas) finos, ramificados, que podem ser longos, embora sejam curtos em alguns grupos, e devido ao crescimento da parede celular em intervalos regulares, subdividem-se em vários segmentos, todos contendo uma molécula de DNA (Gutiérrez-Lugo & Essayag 2003). Os filamentos se parecem morfologicamente aos filamentos de fungos, porém, são mais estreitos, normalmente com 0,5 a 1,0µm de diâmetro, uma dimensão análoga a de célula bacteriana, podendo chegar a 20,0µm de diâmetro em alguns gêneros (Alexander 1977).

A diversidade morfológica dos actinomicetos é exemplificada primariamente por suas estratégias reprodutivas que levam a formação de uma variedade de estruturas de reprodução. São exemplos de tipos de esporos os artrósporos, característicos de *Streptomyces*, endósporos



de *Thermoactinomyces*, aleuriósporos de *Micromonospora* e zoósporos de vários membros de *Actinoplanaceae*, como *Geodermatophilus*, *Oeskovia* e *Kitasatoa* (Ensign 1978). Os esporos formados são originados de hifas especializadas, podem ser únicos ou em cadeias de dois a mais de cinquenta e, em alguns casos, dentro de “vesículas”. Em casos raros, podem ainda se desenvolver como resultado de septação ou fragmentação de elementos hifas pré-existentes. A estrutura da superfície do esporo, que é devida à presença de uma bainha filamentosa, pode dar a ele o aspecto liso, espinhoso, ondulado ou filamentoso, constituindo uma característica muito estável e útil taxonomicamente (Piret & Demain 1988; Vobis 1997), assim como a sua forma, coloração, número e disposição, que são características particulares de cada gênero. Os esporos podem ser móveis (planósporos ou zoósporos) ou flagelados como no gênero *Actinoplanes* mas, de maneira geral, eles carecem de motilidade (aplanósporos ou conídios) e a maioria não é resistente ao calor, à exceção daqueles produzidos pela família *Thermoactinomycetaceae* (Gutiérrez-Lugo & Essayag 2003).

Actinomicetos desenvolvem-se lentamente, o que torna difícil o isolamento em relação aos seus competidores. A cultura em ágar apresenta colônias abundantes, de consistência firme e tenazmente aderidas ao substrato. Sua velocidade de crescimento radial sobre o meio é inferior ao de fungos e sua velocidade de produção de células geralmente é mais lenta que das demais bactérias. Enquanto que em *Escherichia coli* um ciclo de divisão celular é de vinte minutos, em alguns actinomicetos pode levar de dois a três dias para se completar (Lechevalier & Lechevalier 1981). O crescimento dos actinomicetos ocorre principalmente pela extensão da parede celular como hifas ramificadas, que seguem uma cinética de crescimento aparentemente exponencial. Crescidas as colônias, as partes mais distantes da margem podem acumular várias classes de material de reserva como glicogênio, lipídeos e polifosfato (Goodfellow et al. 1984).

Podem compreender bactérias que se multiplicam por simples divisão binária (*Corynebacterium* spp.) até espécies extensivamente filamentosas e ramificadas como *Streptomyces* spp. (Connell 2001). As bactérias nocardioformes podem, eventualmente, fragmentar suas hifas em cocos e bastões, que, ao crescerem, darão origem a um novo micélio. Os esporactinomicetos possuem uma morfologia que inclui a formação de esporos em partes definidas do micélio. Um terceiro nível de organização é formado por actinomicetos que se dividem, tanto transversalmente quanto longitudinalmente, dando origem a esporângios multiloculares, estando presentes nos *Dermatophilus* e *Geodermatophilus* (Goodfellow & Cross 1984; Vobis 1997).

Os actinomicetos são saprófitos estritos em sua maioria porém, alguns podem possuir capacidade parasitária para vegetais, animais e seres humanos (Willians et al. 1983a; Goodfellow et al. 1988; Holmalahti et al. 1994). As manifestações clínicas, severidade de doença e prognóstico em um hospedeiro infectado são extremamente variáveis e determinadas por fatores como a rota de infecção e o estado imunológico do paciente. No caso dos actinomicetos aeróbios a aparência típica da doença é uma reação inflamatória granulomatosa, que pode progredir para formação de abscesso. O diagnóstico destas infecções é difícil por uma combinação de dificuldades clínicas e microbiológicas, incluindo sua apresentação clínica não específica, uma necessidade de procedimentos invasivos (biópsia), dificuldades no isolamento e classificação dos microrganismos (McNeil & Brown 1994).

Dentre as doenças nas quais os actinomicetos podem apresentar-se etiológicamente envolvidos, destacam-se: a tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), a hanseníase (*M. leprae*), estreptotricoses, cáries e doenças periodontais provocadas pelo *Actinomyces viscosus* (Beaman 1984). As infecções invasivas tais como actinomicoses, nocardioses e actinomicetomas são potencialmente malignas, podendo causar risco de morte quando o tratamento é inadequado ou tardio (Lacey 1988). Alguns actinomicetos termofílicos (*Thermoactinomyces vulgaris* e *Micropolypora faeni*) estão implicados em numerosos casos de pneumonia hipersensível e outras reações alérgicas (Hurst et al. 1997). A maioria das infecções por *Nocardia* spp. é pulmonar ou subcutânea, entretanto, o microrganismo pode disseminar-se dos pulmões para outros órgãos em hospedeiro suscetível. Os actinomicetos patogênicos mais freqüentemente encontrados e identificados pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) são *Streptomyces griseus* e *Streptomyces somaliensis* (Hollick 1995).

### 2.1.1. Taxonomia

A ordem *Actinomycetales* é constituída de microrganismos particularmente variáveis, e esta extrema variabilidade morfológica e fisiológica, dificulta sua classificação e taxonomia, constituindo um problema ainda sem solução satisfatória, desde a sua descrição até os dias de hoje. Neste período várias chaves de classificação têm sido propostas, sendo a mais recente a da 9ª edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al. 1994) onde são apresentados 8 grupos, perfazendo um total de 48 gêneros, dentre os quais destacam-se:

*Streptomyces*, *Actinomyces*, *Dermatophilus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinoplanes* e *Thermoactinomyces* (Lechevalier & Lechevalier 1967; Holt et al. 1994).

A maioria das chaves de identificação baseia-se na morfologia dos esporóforos, composição química da parede celular, tipo de peptidoglicano, tipo de fosfolipídeos, padrões de ácidos graxos, cor do micélio aéreo e do reverso da colônia, excreção de pigmentos melanóides, produção de antibióticos, assimilação de compostos de carbono, morfologia dos esporos observados ao microscópio eletrônico e porcentagem de guanina e citosina (% G+C) no DNA (Tresner et al. 1961; Dietz & Mathews 1971; Kurylowicz et al. 1971; Keast et al. 1984; El-Tarabily & Sivasithamparam 2006).

Em 1960 foi estabelecido o Projeto Internacional para *Streptomyces* (*International Streptomyces Project* – ISP) visando determinar as relações entre os gêneros e as espécies, tendo em vista, que um novo isolado era, geralmente, descrito e caracterizado com base em critérios subjetivos (O'Donnell 1988). A taxonomia de actinomicetos não é possível de ser feita utilizando-se somente métodos tradicionais com base em características fenotípicas. Esta abordagem tem levado a grupos supragenéricos bastante heterogêneos. Tem-se utilizado três abordagens que se baseiam principalmente nas mais avançadas metodologias e técnicas de sistemática (Bull et al. 1992). A quimiotaxonomia utiliza a caracterização de componentes específicos da célula tais como lipídeos, aminoácidos da parede celular, açúcares e proteínas para distinguir relações supragenéricas. A taxonomia numérica é baseada na utilização do maior número possível de características fenotípicas de um grupo relacionado de microrganismos (Keast et al. 1984). A sistemática molecular que utiliza métodos de hibridização de ácidos nucleicos DNA-DNA e DNA-rDNA (Labeda 1992), fago-tipagem (Korn-Wendish & Scheneider 1992), espectroscopia de massa de pirolisados (Sanglier et al. 1992) e técnicas de seqüenciamento de DNA 16S para desvendar relações em níveis intra e intergenéricos (Embley & Stackenbrandt 1994). A partir destas características, são construídas diversas matrizes de identificação úteis para a distinção das espécies com o auxílio do computador (Willians et al. 1983a e b; Langham et al. 1989).

Na aplicação de técnicas moleculares como a análise de seqüência de DNA ribossomal (5S, 16S e 23S rRNA) e outras seqüências conservadas no genoma, há uma maior probabilidade de se ter uma aproximação fidedigna para a contagem de espécies e diversidade genética (Liesack & Stackenbrandt 1992; Embley & Stackenbrandt 1994). Limitações como as apresentadas por microrganismos não cultiváveis, talvez sobrepujados por representantes

de diferentes grupos em amostras de meio ambiente, podem ser solucionadas utilizando-se sondas de ácido nucléico designadas para *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya* (Manfio 1995).

### **2.1.2. Actinomicetos no solo**

O solo é a parte superficial intemperizada não consolidada da crosta terrestre, contendo matéria orgânica e seres vivos (MMA 2006). A biodiversidade e a atividade biológica estão relacionadas a funções e características essenciais para a manutenção da capacidade produtiva dos solos. Os microrganismos são responsáveis por diversas atividades essenciais para o funcionamento dos ecossistemas, como a fragmentação e decomposição da matéria orgânica, a disponibilização de nutrientes e a agregação das partículas do solo (Moreira & Siqueira 2002; Hackl et al. 2004).

Os actinomicetos estão amplamente distribuídos na natureza, tendo sido encontrados com maior ou menor frequência, na água (Burman 1973; Kitouni et al. 2005; El-Sersy & Abou-Elela 2006), no ar (Lloyd 1969; Grigorevski-Lima et al. 2006) e em tecidos humanos, animais e vegetais. É no solo, porém que se encontra a maior densidade populacional destes microrganismos. Vários autores aplicam diferentes meios para a contagem e isolamento dos actinomicetos do solo. Uma revisão das técnicas aplicadas sugere que os melhores resultados, bem como a limitação do desenvolvimento de outros microrganismos nas placas, podem ser obtidos aplicando-se meios contendo amido como fonte de carbono, além de antibióticos e antifúngicos (Williams & Davies 1965; Duangmal et al. 2005).

Os microrganismos no solo apresentam estreita associação com as partículas argilosas e matéria orgânica, podendo ser encontrados como células simples ou micro-colônias, que frequentemente estão embebidas em uma matriz de polissacarídeos. O metabolismo, interação com outros microrganismos e com as partículas do solo são dependentes das condições do micro-habitat que, no geral, apresenta-se bastante heterogêneo (Rolf 2004). A densidade da população, como no caso de outros grupos de microrganismos, é controlada pela interação de fatores ambientais físicos, químicos e biológicos, tais como tipo de solo, vegetação, teor de matéria orgânica, pH, umidade, aeração, profundidade e temperatura (Alexander 1961; Melin et al. 1999; Pereira et al. 1999a; Veira & Nahas 2005; El-Tarabily & Sivasithamparam 2006).

Actinomicetos têm sido encontrados em quase todos os tipos de solo estudados em várias regiões geográficas e climáticas. Isto inclui regiões apresentando condições extremas como desertos tropicais (Flint et al. 1973; Takahashi et al. 1996; Takahashi & Omura 2003), regiões semi-áridas (Le Roes & Meyers 2005), solos da Antártida e solos montanhosos primitivos (Cameron 1971). De maneira geral, os números dos actinomicetos variam entre  $10^4$  e  $10^8$  ufc/g de solo seco e numericamente são superiores aos fungos e inferiores às demais bactérias (Alexander 1961; Ishizawa et al. 1968; Davies & Williams 1970; Lacey 1973; Visser & Banage 1973; McCarthy & Williams 1992).

Os actinomicetos são favorecidos por solos que possuem um teor de matéria orgânica relativamente alto (Davies & Williams 1970; Lacey 1973). Assim, a contagem destes organismos aumenta com o teor de matéria orgânica presente no solo, isto é, a quantidade de substância orgânica morta no solo capacita o desenvolvimento proporcional de actinomicetos (Muller et al. 1971). Por isso, esses microrganismos são mais facilmente encontrados em solos cultivados do que virgens, uma vez que, em geral, os primeiros são mais ricos em matéria orgânica (Alexander 1961; Ishizawa et al. 1969).

A maior parte dos actinomicetos do solo pertence ao grupo aeróbio e é sabido que o alto teor de umidade é desfavorável ao seu crescimento em comparação com as demais bactérias. Em oposição, resistem bem à secagem extrema (Alexander 1961; Lacey 1973). Preferem um solo neutro ou ligeiramente alcalino, cessando seu crescimento *in vitro* em pH 5,0. Em solos ácidos eles correspondem a menos de 1,0% da contagem de viáveis (Alexander 1961; El-Tarabily & Sivasithamparam 2006). Uma exceção seriam os esporoactinomicetos acidófilos que crescem bem em pH 3,5 a 5,5 (Khan & William 1975; Hagedorn 1976; Coelho & Drozdowicz 1978).

De acordo com El-Tarabily & Sivasithamparam (2006), a frequência de actinomicetos varia nos diferentes solos, além do que, a quantificação e estimativa das diferentes espécies é grandemente influenciada pela metodologia empregada no isolamento. Segundo estes autores, dentre os 20 gêneros mais frequentemente encontrados nesses ambientes há uma predominância de *Streptomyces* em torno de 95,3%, seguido de *Actinoplanes* (0,2%), *Actinomadura* (0,1%), *Microbispora* (0,18%), *Micromonospora* (1,4%), *Nocardia* (1,98%), *Pseudonocardia* (0,06%), *Streptosporangium* (0,10%), *Thermoactinomyces* (0,14%), e *Thermomonospora* (0,22%).

Segundo Hackl et al. (2005), florestas nativas, com específicas comunidades de vegetais selecionam microrganismos com específicos requisitos ambientais. Diferentes tipos de florestas seriam então associadas a comunidades microbianas características daquele solo e daquela vegetação, sendo que e as modificações ambientais provocadas pela flutuação estacional das condições climáticas podem modificar as populações que constituem a comunidade, assim como as interações benéficas e/ou antagônicas dos microrganismos determinam a composição qualitativa e quantitativa da comunidade.

Quase 80,0% dos actinomicetos do solo ocorrem na camada mais superficial (0-10cm), diminuindo progressivamente com a profundidade (Iwai & Takahashi 1992). Mas a profundidade, por si só, não é um fator independente influenciando a distribuição dos microrganismos no solo, pois em qualquer ponto do perfil existem condições particulares de pH, umidade, aeração, temperatura e competição biológica. De maneira geral, porém, o número das demais bactérias e fungos aumenta com a profundidade (Alexander 1961; Ishizawa et al. 1971; Lacey 1973; Takahashi & Omura 2003), desta forma, baixos índices de isolamento de actinomicetos remetem a uma predominância de outras espécies bacterianas e/ou fúngicas naquele habitat (Pereira et al. 1999a; Melin et al. 1999).

Aos actinomicetos são atribuídas várias funções no solo e, dentre elas, três parecem ser as mais importantes: eles afetam a estrutura do solo, ligando partículas de argila através de suas hifas; são capazes de produzir antibióticos nocivos a outros microrganismos no solo e em raízes de plantas, atuando no controle biológico de microrganismos fitopatogênicos, além de que, funcionam nas transformações da matéria orgânica. Estas bactérias filamentosas possuem um importante papel na biodegradação de polímeros como lignina, quitina, queratina, complexos aromáticos de ácido húmico e amido (Alexander 1961; Gottlieb 1973; Goodfellow & Williams 1983; Lacey 1988; Yuan & Crawford 1995; Paul & Clark 1996).

Actinomicetos podem utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, porém no solo, a fonte primária é geralmente insolúvel e polimérica, o que torna necessária a secreção de uma variedade de enzimas extracelulares (celulases, hemicelulases, quitinases, amilases, glucanases e amilases) para que as hifas possam penetrar e colonizar o substrato (McCarthy & Williams 1992; Yuan & Crawford 1995; Paul & Clark 1996). As culturas de actinomicetos isolados a partir de solos apresentam um cheiro característico de terra molhada, que é denominado geosmina (do grego *geo* = terra; *osme* = odor) e ocorre como resultado da produção de pigmentos terpenóides e enzimas celulares que são capazes de degradar matéria orgânica de origem animal e vegetal (Gerber & Lechevalier 1965; Pollak & Berger 1996).

O equilíbrio da microbiota do solo pode ser alterado de várias formas dependendo do tipo de manejo que se imprime a ele, sendo que o desmatamento, a aração, a monocultura, o uso indiscriminado de agroquímicos, a erosão e as queimadas são as formas que mais afetam a comunidade microbiana. Considerando-se que no Brasil as perdas ambientais associadas ao recurso do solo para uso agrícola são estimadas em 5,9 bilhões de dólares ou 1,4% do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro, torna-se fundamental e indispensável que a sociedade incorpore a visão de que os recursos naturais só estarão disponíveis para a atual e futuras gerações se utilizados de modo racional, compatível com a preservação e o tempo de regeneração dos recursos utilizados (Lilienfein et al. 2003; MMA 2001).

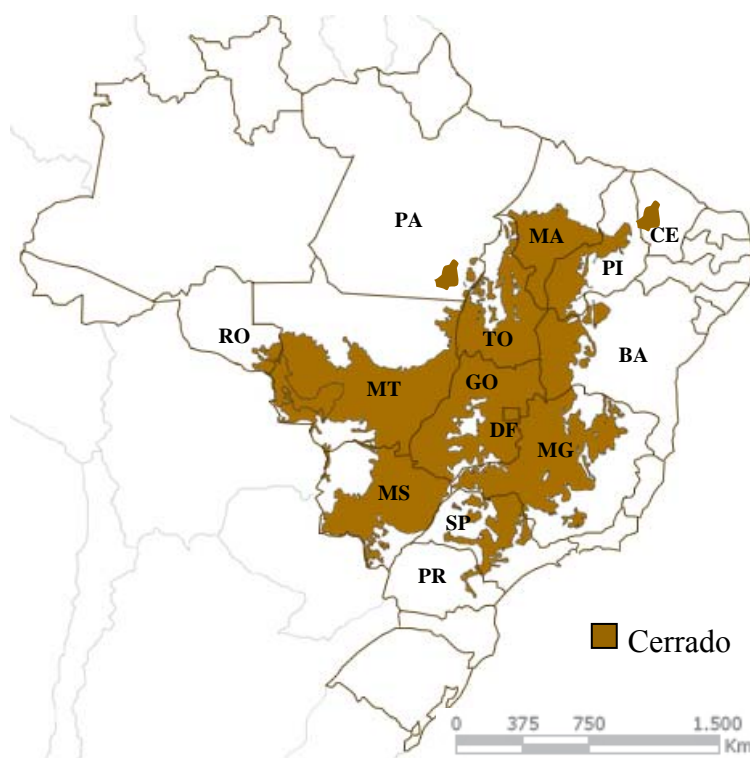
A diversidade de microrganismos no solo tem sido explorada por vários anos baseada no cultivo e isolamento de espécies microbianas. Uma alta proporção dos microrganismos presentes neste habitat apresenta atividade antimicrobiana, com isso os mais conhecidos microrganismos produtores de antibióticos têm sido isolados, e os actinomicetos, bem como seus produtos do metabolismo secundário, têm recebido grande destaque no cenário clínico devido a produção das mais diversificadas substâncias bioativas (Rolf 2004).

#### **2.1.2.1. Cerrado**

O Brasil apresenta seis biomas continentais - Amazônia, Cerrado, Caatinga, Floresta Atlântica, Pantanal e Pampa. O conceito de bioma envolve um conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelo agrupamento de tipos de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, com condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças, o que resulta em uma diversidade biológica própria. Os biomas brasileiros englobam uma imensa variedade de tipos de solos, nutricionalmente, biologicamente e com propriedades físico-químicas distintas (IBGE 2004).

O impacto sofrido pelos biomas brasileiros decorre do processo de expansão e ocupação dos espaços nacionais, o que pode ser avaliado pelo que ocorreu na Floresta Atlântica, hoje reduzida a menos de 10,0% da área original, ocorrendo em fragmentos ao longo da costa brasileira. No entanto, nos últimos anos, esses impactos têm sido mais frequentes na Amazônia e no Cerrado (MMA 2001).

O Cerrado, segundo maior bioma do Brasil, ocupa mais de 200 milhões de hectares, cerca de 25,0% do território brasileiro, abrangendo os estados de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Tocantins, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e parte dos estados do Paraná, Bahia, Ceará, Maranhão, Rondônia, Pará e São Paulo, totalizando 1445 municípios (Figura 2). Abriga um rico patrimônio de recursos naturais e uma das mais ricas biodiversidades dentro da vegetação savânica do mundo (Sano & Almeida 1988; Hungria & Vargas 1997; MMA 2006; WWF 2006).



**Figura 2** – Regiões que constituem o Bioma Cerrado  
(Fonte: World Wildlife Fund - WWF 2006)

Devido a sua riqueza biológica e à alta pressão antrópica a que tem sido submetido, o Cerrado é uma das 25 áreas do mundo consideradas críticas para a conservação. A extensa transformação que vem sofrendo este Bioma pode acarretar grandes perdas de biodiversidade, especialmente em vista das limitações das áreas protegidas, pequenas em número e concentradas em poucas regiões. Estudos recentes indicam que apenas cerca de 20,0% do Cerrado ainda possui a vegetação nativa em estado relativamente intacto (MMA 2002).

Apesar de possuírem textura e estrutura consideradas adequadas ao trabalho agrícola, os solos de Cerrado contêm algumas características que os situam, principalmente os existentes



em Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal, entre os menos férteis do país. Estas características, consideradas negativas, são o baixo teor de nutrientes minerais, tais como cálcio, magnésio e potássio, fósforo assimilável e fósforo total, presença de quantidades excessivas de alumínio, baixo teor de matéria orgânica na forma de húmus e a acidez generalizada (Mendes et al. 1973).

As florestas nativas cumprem a função estratégica de funcionar como barreiras naturais à desertificação, à erosão genética, à perda de recursos biológicos, à fragmentação de ecossistemas e às catástrofes naturais. No Cerrado, estima-se que cerca de 50,0% da cobertura original está convertida em pastos, plantações de soja ou formas degradadas de solos abandonados. Outro problema na região do Centro-Oeste é a extração não-sustentável da madeira do Cerrado para produção de carvão vegetal e as queimadas, que agravam a destruição florestal e todo o ecossistema local (MMA 2001).

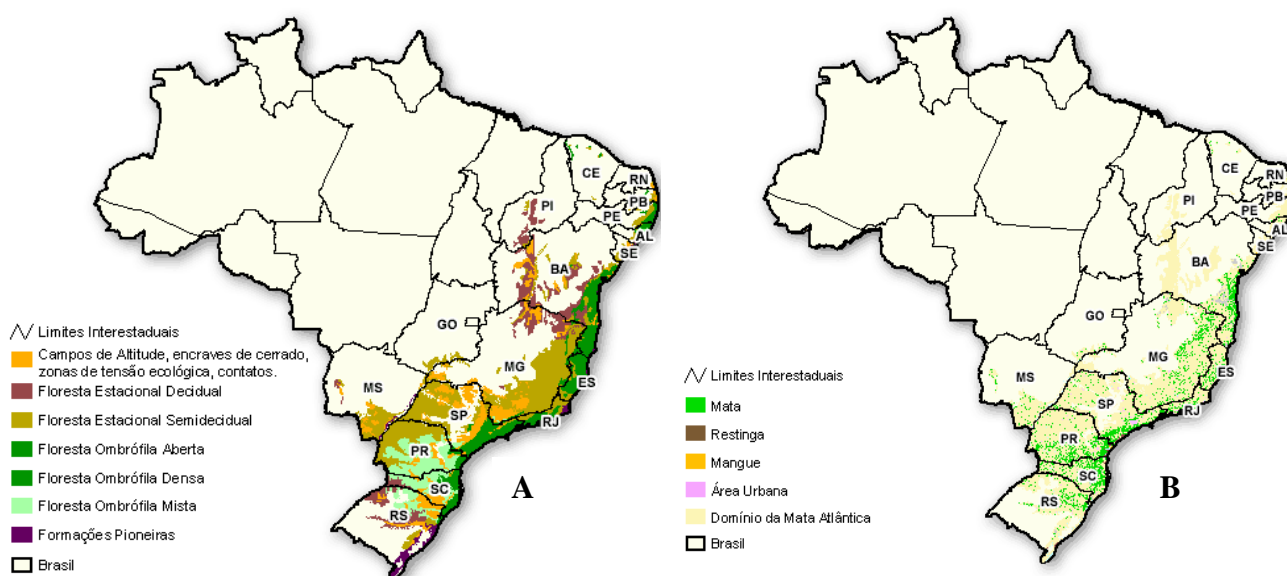
Os actinomicetos compreendem, aproximadamente, de 20,0 a 60,0% da população microbiana do solo. Contudo em solos de Cerrado, com vegetação nativa, a ocorrência dessas bactérias pode ser superior a 75,0%, com predominância do gênero *Streptomyces* (Pereira et al. 1999b).

#### **2.1.2.2. Floresta Atlântica**

A Floresta Atlântica é o segundo conjunto de matas especialmente expressivas na América do Sul, perdendo apenas para a Floresta Amazônica, a maior do planeta. Denominada de Floresta Pluvial Atlântica, está localizada na Serra do Mar, que faz parte do Domínio Florestal Tropical Atlântico. Este Domínio Florestal abrange total ou parcialmente 3.409 municípios em 17 Estados brasileiros incluindo Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí. Estende-se por uma faixa relativamente paralela à costa brasileira, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, e constitui-se por "mares de morros" e "chapadões florestados", com solos profundos de drenagem perene (Höfling 2006; MMA 2003).

Hospedeira importante dos espaços geográficos onde se desenhou a nossa nacionalidade, a Floresta Atlântica, ao longo do processo de construção do país, foi sendo

substituída por atividades produtivas que sistematicamente causaram grande impacto. De sua cobertura original (1,2 milhão de km<sup>2</sup>) distribuídos em quatro das cinco regiões geográficas brasileiras, restam-lhe pouco mais que 7,0% (Figura 3). As áreas remanescentes não se distribuem uniformemente por todos os ecossistemas do Bioma, e a maior parte encontra-se sob regime de conservação em unidades de conservação –UCs ou sob pressão da atividade rural ou da expansão urbana. A seu modo, a Floresta Atlântica contém, ainda, a mais rica diversidade biológica relativa das florestas tropicais conhecidas. O grande número de espécies endêmicas que apresenta faz do Domínio Florestal Atlântico uma região prioritária para a conservação da biodiversidade brasileira (CONAMA 1999).



**Figura 3 – Floresta Atlântica A) Área original B) Área atual**  
(Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica 2006)

As áreas mais prejudicadas da Floresta Atlântica são justamente as mais importantes do ponto de vista conservacionista. São as remanescentes das matas do sul da Bahia e do Espírito Santo, que abrigam os últimos exemplares de gêneros e espécies de plantas e animais ameaçados de extinção. Na região Sudeste, onde se desenvolveram grandes metrópoles como São Paulo e Rio de Janeiro em áreas outrora de Floresta Atlântica, ainda existem trechos relativamente grandes onde recentemente foram criadas áreas de proteção ambiental. Nelas estão os últimos refúgios de um dos ecossistemas mais ricos do mundo (Höfling 2006).

A Constituição Federal de 1998, em seu artigo 225, parágrafo 4º, concedeu à Floresta Atlântica o *status* de Patrimônio Nacional. Essa categorização especial foi utilizada para destacar a importância de sua conservação e preservação. A Floresta Atlântica abriga extensa

diversidade biológica, inúmeras comunidades tradicionais, um rico patrimônio cultural e assegura a proteção do solo, sítios turísticos e mananciais. Por isso a UNESCO (*United Nations Educational Scientific and Cultural Organization*) a reconheceu, em 1991, como a primeira das Reservas da Biosfera Brasileira (CONAMA 1999).

A razão pela qual o Brasil aderiu ao Sistema de Reservas da Biosfera é que este é o mais alto reconhecimento internacional que se pode almejar para a proteção de um ecossistema. A declaração da Reserva da Biosfera da Floresta Atlântica endossa a sua situação de floresta tropical mais ameaçada do mundo, sendo, em consequência, a primeira prioridade planetária para a conservação da biodiversidade e do patrimônio genético (Costa 2006).

Considera-se como patrimônio genético toda informação de origem genética contida em amostras do todo ou de parte de espécime vegetal, microbiano ou animal na forma de moléculas ou substâncias provenientes do metabolismo destes seres vivos e de extratos obtidos destes organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticados, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ* no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva (MMA 2006).

O Brasil abriga cerca de 10,0 a 20,0% do número de espécies conhecidas pela ciência, principalmente nas suas extensas florestas. A questão central da conservação da biodiversidade e seu uso sustentável está no desafio de implementar meios de gestão ou manejo que garantam a continuidade de espécies, de formas genéticas e de ecossistemas (MMA 2001).

### **2.1.3 Isolamento de actinomicetos**

Alguns estágios devem ser observados para o isolamento de actinomicetos. Entre estes, incluem-se: a escolha do material a ser analisado, o seu pré-tratamento, os meios de cultura empregados, assim como as condições de incubação utilizadas. O pré-tratamento pode propiciar o isolamento de actinomicetos raros. Neste caso, pode ser incluída a dessecação do solo, que favorece o isolamento de actinomicetos esporulados em detrimento dos que possuem somente hifas vegetativas. A adição de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) nas amostras secas pode levar a um aumento de até 100 vezes o número de colônias nas placas de isolamento, em comparação com o controle não tratado. Tratamentos térmicos das amostras

também podem influenciar na redução ou eliminação de outros microrganismos, sem prejudicar o microrganismo alvo (Labeda & Shearer 1990). A utilização da centrifugação diferencial e sedimentação, membrana de filtração e amostrador de esporos do ar (amostrador de Andersen), também podem ser empregados para concentrar microrganismos desejáveis, incluindo os actinomicetos (Korn-Wendisch & Kutzner 1992).

No isolamento de actinomicetos, geralmente são utilizadas temperaturas de incubação que variam de 25°C a 30°C por um período de 7 a 14 dias (Nolan & Cross 1988). Os microrganismos são geralmente obtidos pela técnica de diluição seriada e as amostras podem ser diluídas em água destilada ou salina esterilizadas, semeadas na superfície do meio sólido com o auxílio de alças de Drigalsky e, posteriormente, incubadas até o aparecimento das colônias (Labeda & Shearer 1990).

Muitos meios contendo diferentes constituintes têm sido sugeridos para a estimativa da diversidade bacteriana, que incluem meios seletivos para determinado grupo, bem como meios complexos, ricos em polipeptídeos, aminoácidos e vitaminas ou minerais (Vieira & Nahas 2005). Alguns autores usam combinações de aminoácidos e carboidratos, com ou sem a adição de antibióticos (penicilina, ácido nalidíxico, novobiocina, estreptomicina), para inibir o crescimento de microrganismos contaminantes e selecionar actinomicetos raros ou incomuns, conhecidos por serem uma fonte promissora de metabólitos antimicrobianos (Duangmal et al. 2005).

Metodologias alternativas para a seleção de grupos específicos como os *Actinoplanetes*, tidos como actinomicetos raros, também têm sido bastante utilizadas. Os *Actinoplanetes* constituem-se membros da Ordem *Actinomicetales*, os quais estão intimamente relacionados com o gênero *Actinoplanes* e apresentam os esporos dentro de vesículas (esporângio) e altamente resistentes à dessecação (Bland & Couch 1981). A imersão do esporângio em água, geralmente, resulta na liberação dos esporos em aproximadamente uma hora à temperatura ambiente (Higgins 1967) e esta característica, associada ao fato de que os esporos destes microrganismos possuem uma afinidade por algumas substâncias químicas levou ao desenvolvimento do método quimiotático (Palleroni 1980).

Muita atenção tem sido dispensada ao desenvolvimento de técnicas de isolamento para estes actinomicetos ditos raros, em locais ainda não explorados (Nolan & Cross 1988), uma vez que os mesmos podem constituir numa fonte em busca de novos compostos bioativos. No

entanto, o número e a variedade de isolados depende da microbiota regional ou ambiental da amostra de solo coletada (Ramsey 1984; MacDonald 1986 a e b; Takahashi et al. 1996).

O Quadro 1 traz de forma sucinta o inventário da biodiversidade mundial. Vale ressaltar que apenas 12,0% do número estimado de bactérias que existem na Terra são conhecidas pelo homem, o que nos mostra o quanto ainda deve ser pesquisado e descoberto sobre estes procariotos (Bull et al. 1992). Tem se tornado claro que menos de 1,0% dos microrganismos no ambiente são cultivados usando as técnicas de cultivo convencionais hoje disponíveis. Desta forma, do ponto-de-vista da microbiologia aplicada, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias que nos permitam isolar e cultivar estes microrganismos ainda não-cultiváveis, permitindo a exploração de novas capacidades (Hamaki et al. 2005).

**Quadro 1** – Números conhecidos e estimados de vírus, bactérias e fungos.

<i>Grupo</i>	<i>Espécies Conhecidas</i>	<i>Total de Espécies Estimadas</i>	<i>% de Espécies Conhecidas</i>
Vírus	5.000	130.000	4
Bactérias	4.750	40.000	12
Fungos	69.000	1.500.000	5

Adaptado de Bull et al. 1992

#### **2.1.4. Síntese de metabólitos secundários**

Os actinomicetos apresentam um enorme potencial de aplicação industrial, médica, farmacêutica e agrícola, devido a produção de importantes metabólitos secundários que constituem uma rica fonte de estruturas para o desenvolvimento de produtos como antibióticos (eritromicinas, oxitetraciclinas, tetraciclinas, anfotericina B, nistatina), antitumorais (aclacinomicina, bleomicina, dactinomicina, doxorubicina, retamicina), herbicidas (fosfinotricina), anti-parasitários (avermectina, milbemicina), enzimas (celulase, amilase, xilanase, quitinase), imunossuppressores (FK-506, rapamicina, ascomicina) e substâncias promotoras do crescimento animal e vegetal (Connell 2001; Weber et al. 2003; Oskay et al. 2004).

O metabolismo primário está relacionado a uma série de reações catalizadas por enzimas, cujo produto final resulta principalmente em energia para as células, sendo essencialmente o mesmo para todos os sistemas vivos. Como resultado de um sistema de controle balanceado, os metabólitos primários raramente se acumulam, ao contrário dos metabólitos secundários, que freqüentemente se acumulam em quantidades substanciais e esta peculiaridade é fator chave de sua importância comercial (Turner 1973; Martin & Demain 1980; Maplestone et al. 1992).

Os metabólitos secundários, também conhecidos como idiólitos (produtos da idiofase), são assim considerados por não serem necessários ao crescimento vegetativo e reprodução celular. Diferente dos intermediários e co-fatores que têm participação na produção de energia e síntese das estruturas celulares, os metabólitos secundários são produzidos no final da curva de crescimento da cultura e, por esse motivo, por muitos anos estas substâncias não receberam a importância que hoje possuem (Granozzi et al. 1990; Wilson & Bushell 1995). Os organismos não são igualmente capazes de produzir tais metabólitos, esta habilidade é restrita a poucos grupos de bactérias e eucariotos. Estão associados principalmente, dentro dos procariotos aos actinomicetos filamentosos, mixobactérias, pseudomonas e cianobactérias, e dentre os eucariotos, incluem-se os fungos filamentosos (Donadio et al. 2002a).

O processo de produção dos metabólitos secundários, usualmente, está associado com uma fase de crescimento (trofofase) seguida pela fase de síntese de produtos (idiofase). Geralmente esse fenômeno é observado em meios ricos, capazes de manter um rápido crescimento, onde os nutrientes, provavelmente, reprimam a síntese das enzimas utilizadas para a produção dos metabólitos secundários na fase inicial do ciclo celular (Hopwood & Merrick 1977; Leitão et al. 1997). Entretanto, em meios quimicamente definidos, que impõem um crescimento lento, a idiofase sobrepõe a trofofase, inibindo o ciclo, talvez devido a fatores limitantes do próprio meio de cultivo. Isso demonstra que os nutrientes podem reprimir ou favorecer a síntese de produção de metabólitos secundários durante o crescimento (Demain 1992; Piret & Demain 1988).

Segundo Demain & Fang (2000) os metabólitos secundários podem funcionar como: (i) inibidores, com ação frente a bactérias, fungos, vegetais, insetos ou animais; (ii) agentes transportadores de metais; (iii) agentes de simbiose entre microrganismo e planta, nematóide, inseto ou animal; (iv) hormônios sexuais; e (v) efetores de diferenciação. Embora os metabólitos secundários não sejam obrigatoriamente necessários para a esporulação, alguns

estimulam a formação de esporos e inibem ou estimulam a germinação, dependendo das condições ambientais.

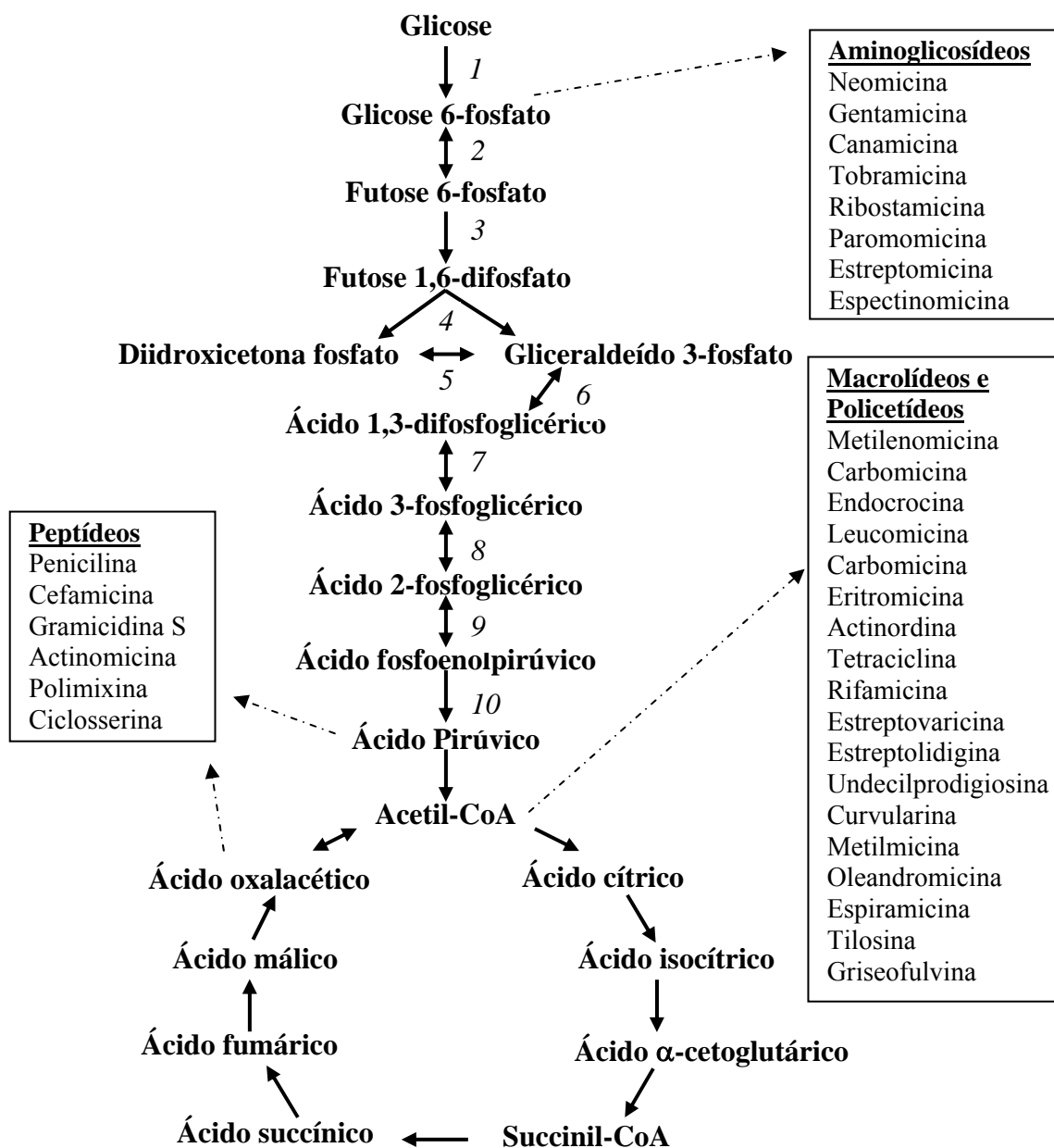
A maioria das características fenotípicas relacionadas à diferenciação e metabolismo secundário, tais como a formação de micélio aéreo, pigmentação, esporulação, resistência a agentes genotóxicos e resistência e/ou produção de antibióticos são geneticamente instáveis. A instabilidade genética é uma característica bastante comum dentre os actinomicetos, podendo a frequência de mutação chegar a pelo menos  $10^3$  no gênero *Streptomyces* (Volff et al. 1993; Leblond & Decaris 1994). Este fenômeno está relacionado a rearranjos do DNA em larga escala, principalmente a grandes deleções e amplificações em uma região limitada do genoma (Young & Cullum 1987; Leblond et al. 1993).

Os produtos do metabolismo secundário apresentam ampla diversidade de estruturas químicas e mecanismos de ação (Davis 1992) e as vias metabólicas para a sua produção são longas, complexas, energeticamente dispendiosas e aparentemente derivadas das vias do metabolismo primário, ou seja, das rotas biossintéticas dos componentes celulares, como por exemplo, a formação de aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, ou ainda de várias destas vias, formando classes complexas de metabólitos secundários, como pode ser observado na Figura 4 (Vining 1992a e b; Williams & Maplestone 1992).

Entre os produtos do metabolismo secundário destacam-se as enzimas e os compostos policetídeos, que são a mais relevante classe de produtos naturais (Hutchinson & Fujii 1995). Os actinomicetos produzem centenas de compostos policetídeos, incluindo uma grande diversidade de antibióticos, compostos parasiticidas, imunomoduladores e agentes antitumorais, cujas vendas superam 15 bilhões de dólares por ano (Hopwood & Sherman 1990; Weber 2003).

Os mecanismos de regulação da biossíntese de produtos do metabolismo secundário são extremamente complexos e ainda pouco elucidados. Sabe-se que existe um controle genético que inclui genes pleiotrópicos envolvidos tanto na regulação do metabolismo secundário como no processo de esporulação (Bibb 1996; Ueda et al. 1996). Os genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese destes metabólitos são, na maioria das vezes, de origem cromossomal, mas em alguns casos podem ser plasmidiais (Kinashi & Shimaji-Murayama 1991). Independente de serem cromossomais ou plasmidiais, os genes estão organizados em grupos (*clusters*) complexos, que incluem genes codificadores para os mecanismos de regulação, biossíntese e de resistência (Chater 1992). Os fatores que regulam a expressão

destes genes são fortemente controlados por nutrientes e outros componentes presentes no meio de cultura, incluindo sais, minerais, metais, indutores, produtos metabólicos, pH, temperatura e aeração (James & Edwards 1989; Hobbs et al. 1990, Demain 1992; Bystrykh et al. 1996).



**Figura 4** - Relação entre precursores do metabolismo primário e a produção de antibióticos. Os números em *itálico* indicam as enzimas catalizando cada passo glicolítico: 1 – hexoquinase; 2 – glicose-6-fosfato isomerase; 3 – fosfofrutoquinase; 4 – frutose-1,6-difosfato aldolase; 5 – triosefosfato isomerase; 6 – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 7 – fosfoglicerato quinase; 8 – fosfoglicerato mutase; 9 – enolase; 10 – piruvato quinase. Setas sólidas representam reações do metabolismo primário. Setas pontilhadas representam as vias para produção de vários grupos de metabólitos secundários (Fonte: Malik 1980)



Vários minerais, quando adicionados ao meio de cultura, também influenciam no crescimento e na produção de metabólitos secundários pelos actinomicetos. Jung et al. (2002) investigaram o efeito de minerais na produção de vancomicina por *Amycolaptosis orientalis*. Os autores verificaram que o  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  reduziam a produção da substância bioativa, enquanto que  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  apresentavam efeito sinérgico quando suplementados ao meio de cultura, influenciando na atuação das enzimas envolvidas na síntese do antibiótico, resultando em um aumento da produção. Diferentes condições de incubação, diferentes valores de pH, assim como diferentes concentrações de sais também têm sido efetivamente usados para melhorar a seletividade e produção de metabólitos secundários (Labeda & Shearer 1990; Ywai & Omura 1992; Basilio et al. 2003).

#### **2.1.4.1. Antitumorais**

O corpo humano é todo formado por células que se organizam em tecidos e órgãos. As células normais se dividem, amadurecem e morrem, renovando-se a cada ciclo. O câncer desenvolve-se quando células anormais deixam de seguir esse processo natural, sofrendo mutação que pode provocar danos em um ou mais genes de uma única célula. Os genes são segmentos do DNA, que controlam as funções normais das células. Quando danificada, a célula se divide descontroladamente e produz novas células anormais. Se falham os sistemas de reparo e imunológico na tarefa de destruir e limitar essas células anormais, as novas vão se tornando cada vez mais anormais, eventualmente produzindo células cancerosas (INCA 2006).

Alguns hábitos têm estreita correlação com o aparecimento da doença: o fumo, a vida sedentária, a dieta rica em alimentos gordurosos ou pobres em vegetais e frutas que, associados a fatores genéticos, podem levar ao desenvolvimento do câncer. Além disso, vírus como o da hepatite B (HBV) e o vírus do papiloma humano (HPV) também estão ligados ao aparecimento desta doença. Alguns tipos de câncer, quando detectados em estágio inicial, podem ter cura, porém, para um bom prognóstico é necessário um diagnóstico precoce e um tratamento adequado (Jurbeg et al. 2006).

O câncer é proporcionalmente importante na taxa de mortalidade global, porém, sua importância não tem sido avaliada em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, e isso

se deve ao seu relativo menor significado em termos de anos potenciais de vida perdidos, quando comparado com a mortalidade por doenças infecciosas e perinatais. Uma opinião grandemente equivocada no que se refere ao câncer como causa de morte no Brasil, é considerar a sua incidência baixa em comparação com as doenças infecciosas (Kowalski & Franco 1991).

A pesquisa pela busca de substâncias antineoplásicas se justifica pelo fato de que o câncer é responsável por mais de 12,0% de todas as causas de óbito no mundo: mais de sete milhões de pessoas morrem anualmente da doença. Como a esperança de vida no planeta tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará mais de 15 milhões em 2020. Esta previsão, feita em 2005, é da IUCC - *International Union Against Cancer* (Koifman & Koifman 2003; INCA 2006).

No Brasil o câncer constitui a segunda causa de morte por doença. Em 1994, os neoplasmas foram responsáveis por 10,86% dos 887.594 óbitos registrados. Somente na Região Nordeste, as neoplasias representam a terceira causa de morte por doença, respondendo por 6,34% dos óbitos. Nas demais regiões, os neoplasmas seguem as doenças cardíco-vasculares, como causa de morte, sua proporcionalidade aumenta à medida que se desloca para a região Sul: 7,83% (Região Norte), 9,89% (Região Centro-Oeste), 11,93% (Região Sudeste) e 15,19% (Região Sul) (Moraes 1997).

Desde 1963 a busca por metabólitos secundários produzidos por actinomicetos direcionou-se para as linhagens capazes de sintetizar antibióticos com potencial antitumoral ou citotóxico (Furlan 2002). A demanda por novas drogas antitumorais aumentou nessa época devido a três razões. A primeira delas foi a detecção de um tipo de resistência cruzada apresentada por linhagens celulares, entre quimioterápicos diversos. Este fenômeno estava relacionado à diminuição da concentração intracelular do quimioterápico e também à presença de uma glicoproteína, denominada P-170, pertencente à super família das proteínas ABC (*ATP-binding protein*), ligadas à membrana plasmática, servindo como uma bomba para o transporte das drogas para fora das células tumorais (Hortobágyi 1997; Strohl et al. 1997). Uma segunda razão foi devido à alta toxicidade e aos efeitos colaterais usualmente associados às drogas utilizadas na quimioterapia para câncer. A terceira foi a limitação dos métodos tradicionalmente usados na quimioterapia, o que fez com que ocorresse uma maior demanda por novas drogas com maior eficácia terapêutica (Salas & Mendes 1998).

Antibióticos com atividade antitumoral ou citotóxica têm sido descobertos através do ensaio de filtrados de culturas na inibição de crescimento de tumores *in vivo* ou de células tumorais *in vitro*. A maioria dessas substâncias foi encontrada por inibir a síntese de macromoléculas ou algumas funções da membrana celular. Por outro lado, alguns produtos microbianos têm sido descobertos pela seleção de inibição de certas enzimas específicas como transcriptase reversa, glicoxalase, adenosina deaminase e os inibidores de tirosina proteína quinase (Umezawa 1988).

Os antibióticos antitumorais em uso clínico são naturais da cultura de várias espécies de actinomicetos. Estes antibióticos produzem efeitos tumoricidas e antimicrobianos pela inibição direta da síntese do DNA e/ou RNA atuando como agente intercalante, como a actinomicina D e antraciclinas ou como agentes de ligações cruzadas, como a mitomicina C, causando a ruptura da fita do DNA como bleomicina e estreptonigrina, ou interagindo com o DNA em uma forma não intercalativa como mitramicina, cromomicina e olivomicina. O potente efeito citotóxico de algumas destas drogas não permite o seu uso terapêutico como antibacterianos. Possuem uma variedade de efeitos em fases diferentes do ciclo celular e cineticamente se comportam como agentes fase não-específico (Salas & Mendez 1998; Schwartzmann et al. 1991).

Entre os antibióticos sintetizados por *Streptomyces*, destacam-se as antraciclinas que pertencem a classe dos antibióticos com atividades antitumorais muito utilizadas em tratamentos quimioterápicos antineoplásicos. Estas moléculas apresentam diferentes modos de ação, destacando-se intercalação no DNA, promovendo a inibição de macromoléculas; formação de DNA *cross-linking*; formação de radicais livres; efeitos diretos na membrana; danos no DNA via inibição de topoisomerase II e indução de apoptose (Furlan 2002).

É importante mencionar que a quimioterapia antineoplásica é um dos métodos de tratamento mais empregados, podendo ser utilizada a monoquimioterapia ou poliquimioterapia. O tratamento quimioterápico pode ser classificado em: a) curativo – com o objetivo de controlar o crescimento do tumor; b) adjuvante – tentar diminuir a incidência de metástases; c) neoadjuvante ou prévia – com o intuito de obter redução parcial do tumor para complementação cirúrgica e/ou radioterapia; e d) paliativa – aplicada para melhorar a qualidade de vida do paciente (Furlan 2002). Para tanto, a utilização adequada de drogas antineoplásicas em seres humanos requer uma avaliação criteriosa das doses a serem administradas, vias de administração, efeitos colaterais de alto risco, mecanismos de eliminação, ajustes de doses em casos de disfunções de órgãos e interações com outras

drogas. É deste conhecimento que podem advir tentativas de modulações bioquímicas ou farmacológicas, objetivando ganhos quanto à atividade antitumoral e/ou reduções de seus efeitos colaterais indesejáveis (Schwartzmann et al. 1991).

A literatura revela que entre 1984 e 1995 mais de 60,0% das drogas antitumorais e antibióticas aprovadas eram de origem natural, e das 87 drogas antineoplásicas aprovadas neste período 62,0% apresentavam origem microbiana ou eram derivadas de produtos originados de microrganismos (Richardson & Ireland 2004), portanto são claros os imensos benefícios proporcionados pelos microrganismos, com destaque para os actinomicetos, especialmente pelo fato de que menos de 20,0% do reino procarioto é conhecido, e ainda existe todo um mundo de possibilidades para ser explorado, com a possibilidade de gerar melhorias na qualidade de vida da população (Cooper 2004).

#### **2.1.4.2. Antibióticos**

Os antibióticos são os mais importantes metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos e atualmente somam mais de 5.000 produtos, contribuindo com mais de 70,0% do total de drogas no mercado (Sanglier et al. 1993a e b; Demain 2002; Takahashi & Omura 2003). Por mais de um século, pesquisadores têm tido interesse na descoberta, isolamento e caracterização de metabólitos produzidos por microrganismos e a cada ano novas substâncias continuam sendo descobertas em todo o mundo (Vining 1990), sendo que o mercado mundial de antimicrobianos supera 25 bilhões de dólares por ano, e os produtos de origem natural têm contribuído largamente para o desenvolvimento de antibióticos ao longo da história da medicina (Harvey 2000; Coates et al. 2002).

Tem sido sugerido que a produção de antibióticos está ligada às funções de sobrevivência dos microrganismos que os produzem. Alguns pesquisadores afirmam que estes metabólitos secundários agem implementando a sobrevivência dos microrganismos produtores quando estes competem com outras espécies no ambiente, agindo via receptores específicos nos organismos competidores. Outros apoiam o conceito de que os microrganismos desenvolvem a capacidade de produzir antibióticos devido às vantagens seletivas que obtêm como resultado das funções destes compostos (Demain 1995). O mecanismo de resistência dos produtores de antibióticos aos seus próprios metabólitos são

bem conhecidos e entre eles estão a detoxificação enzimática do antibiótico, alteração no alvo normal do antibiótico na célula e modificação da permeabilidade à droga, aumentando a sua saída e dificultando a sua reentrada na célula (Malik 1982; Demain & Fang 1995; Mendes & Salas 2001; Serina 2004).

A história dos antibióticos nos remete ao ano de 1928 em que Alexander Fleming observou em placa de Petri a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* por uma cultura contaminante de *Penicillium notatum*, cuja molécula bioativa foi isolada mais tarde recebendo a denominação de penicilina e o seu uso clínico foi iniciado em 1940, dando origem à mais variada e mais utilizada classe de antibióticos: os  $\beta$ -lactâmicos (Hare 1983; Heatley 1984; Waenwright 1987; Coates et al. 2002). A reação inibitória entre as colônias em meio sólido recebeu a denominação de antibiose e a partir desta palavra, Waksman em 1942 definiu o termo antibiótico como uma substância produzida por um organismo vivo, antagonista ao desenvolvimento ou à vida de outro organismo (Sakula 1991; Chambers 2003; Finch et al. 2003).

Durante um período relativamente curto, compreendido entre o final da década de 1940 e início dos anos 50, ocorreu o esplendor da pesquisa do papel dos antibióticos na natureza, tendo destaque a ecologia do solo e a vida dos microrganismos que o compõem. Em decorrência dessas pesquisas constatou-se que vários microrganismos, incluindo os actinomicetos, apresentavam grande atividade antimicrobiana e proteção em situações competitivas pela eliminação de outros microrganismos do solo (Gottlieb 1976). Mais de 1.000 espécies de *Streptomyces* foram descritas no período compreendido entre 1.940 e 1.957, tendo aumentado para cerca de 3.000 em 1.970, apesar da imensa maioria estar apenas citada na literatura de patentes (Pridham et al. 1958; Trejo 1970).

O primeiro antibiótico produzido por actinomicetos isolados a partir do solo foi a actinomicina, obtida de *Streptomyces antibioticus*, que apresentava potente atividade antibacteriana, entretanto elevada toxicidade, o que inviabilizou o seu uso na terapêutica. A procura por antibióticos com efeitos menos tóxicos para as células humanas, levou Waksman, em 1.944, a isolar a estreptomicina de uma cepa de *Streptomyces griseus*, que causou grande impacto por não ser tóxica e por apresentar grande eficiência no tratamento da tuberculose, e por isso, receber o Prêmio Nobel de Medicina em 1952. Durante sua vida, Waksman isolou a neomicina além de outros 16 antibióticos, grande parte deles sem uso clínico, devido a sua alta toxicidade (Perkins 1965; Bryder 2002).

O método de investigação utilizado por Waksman, na descoberta da estreptomicina, dominou a pesquisa dos antibióticos por décadas. A descoberta da produção de antibióticos a partir de actinomicetos promoveu um intenso estudo destes microrganismos na comunidade científica e industrial. Conscientes de que eram fontes promissoras, comercialmente viáveis e altamente lucrativos, vários pesquisadores se sentiram estimulados a desenvolver novos métodos de isolamento e cultivo, sempre visando a descoberta de novos compostos (Chambers 2003; Finch et al. 2003). O gênero *Streptomyces*, entre os actinomicetos lidera como o maior produtor de compostos antibióticos e moléculas farmacologicamente ativas, e a diversidade das moléculas produzidas por estes microrganismos é bastante superior (Quadro 2) em comparação aos outros gêneros do grupo (Okami & Hotta 1988).

**Quadro 2** – Antibióticos produzidos por actinomicetos.

Gêneros	Grupos de antibióticos											
	AG	ML	AM	BL	PT	GP	AC	TC	NC	PL	QN	
Streptomyces	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Actinomadura	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	
Actinoplanes	−	−	−	−	+	+	−	−	+	+	+	
Actinosynnema	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	
Ampullariella	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	
Dactylosporangium	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	
Kibdelosporangium	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	
Micromonospora	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	
Nocardia	+	+	+	+	−	+	−	+	+		+	
Nocardiosis	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
Pseudonocardia	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	
Saccharomonospora	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	
Saccharopolyspora	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
Streptosporangium	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	

AG = aminoglicosídeos; ML = macrolídeos; AM = ansamicina; BL =  $\beta$ -lactâmicos; PT = peptídeos; GP = glicopeptídeos; AC = antraciclínicas; TC = tetraciclínicas; NC = nucleosídeos; PL = políenos; QN = quinolonas (Fonte: Okami & Hotta 1988).

Os produtos de origem natural têm um papel altamente significativo na descoberta e processo de desenvolvimento de novas drogas. Isto é particularmente evidente na área médica, considerando-se especialmente o tratamento para o câncer e doenças infecciosas, onde mais de 60,0 e 75,0% das drogas utilizadas, respectivamente, mostram-se originárias de produtos naturais (Newman et al. 2003). Em 2.001, aproximadamente 80 novos compostos derivados de produtos naturais se encontravam em diferentes estágios de triagem clínica ou desenvolvimento (Harvey 2002). Watve et al. (2001) estimaram, a partir de modelos matemáticos, que somente 3,0% dos metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Streptomyces* foram estudados até o momento, o que nos leva a uma vasta quantidade de possíveis novas drogas para serem descobertas e introduzidas para uso terapêutico.

Até 1980 a maioria dos conhecimentos sobre antibióticos, mecanismos de ação e receptores eram encontrados em poucas enciclopédias e figuras esquemáticas. Entretanto, com a recente explosão do conhecimento biológico e químico já é possível encontrar tais dados na forma de imagens, estruturas químicas, modelos, alvos e seqüências em bancos de dados eletronicamente disponíveis (Wishart et al. 2006).

A utilização dos antibióticos na terapêutica revolucionou de início, a abordagem das infecções e seu sucesso gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Sem dúvida, na história da medicina, poucas descobertas tiveram um impacto tão profundo na vida humana e na sociedade quanto a descoberta dos antibióticos. A partir da segunda metade do século passado, começou-se a utilizar clinicamente um grande número de substâncias antimicrobianas no combate às infecções. Entretanto, o uso exagerado e nem sempre criterioso ou racional dos antibióticos rapidamente gerou dificuldades, pois apesar do empenho na pesquisa de novos antimicrobianos assim como o melhoramento dos já existentes, a resistência antimicrobiana tem emergido como um sério problema no mundo todo (Montelli & Sadatsune 2001; Lowy 2003).

Os antibióticos utilizados no cenário clínico atual (Quadro 3), têm como alvo um pequeno número de funções metabólicas celulares vitais como a parede celular, DNA, RNA e síntese de proteínas. Exemplos de resistência a estes antibióticos são amplamente distribuídas e bem documentadas. Desta forma, há poucas dúvidas de que novos antibióticos são necessários para combater o crescente problema da resistência bacteriana e a busca por novos alvos representa um importante papel na descoberta de novos antibióticos (Caporale 1995; Moir et al. 1999).

**Quadro 3** – Alvos dos antibióticos na célula bacteriana.

<i>Alvo</i>	<b>Classe de Antibióticos</b>
<b>Síntese de proteínas</b>	
Subunidade ribossomal 30S.....	Aminoglicosídeos, tetraciclina
Subunidade ribossomal 50S.....	Macrolídeos, cloranfenicol
tRNA <sup>ile</sup> sintetase.....	Mupirocina
Fator G de elongação.....	Ácido fusídico
<b>Síntese de Ácidos Nucleicos</b>	
Subunidade A da DNA girase; Topoisomerase IV....	Quinolonas
Subunidade B da DNA girase.....	Novobiocina
Subunidade $\beta$ da RNA polimerase.....	Rifampicina
DNA.....	Metronidazol
<b>Síntese de peptidoglicano (Parede Celular)</b>	
Transpeptidases.....	$\beta$ -lactâmicos
Substrato D-ALA-D-ALA ligase.....	Glicopeptídeos
<b>Antimetabólitos</b>	
Dihidrofolato redutase.....	Trimetoprim
Síntese de dihidropteroato.....	Sulfonamidas
Síntese de ácidos graxos.....	Isoniazida

Fonte: Moir et al. 1999

## 2.2. Estafilococos

Estafilococos são bactérias em forma esférica (cocos), gram-positivas, com 0,5 a 1,5 $\mu$ m de diâmetro, imóveis, não formadoras de esporos, não capsuladas em sua maioria, produtoras de catalase, anaeróbias facultativas, porém desenvolvem melhor em atmosfera aeróbia, podendo apresentar-se isoladas, aos pares, em pequenas cadeias (três a quatro células) e em agrupamentos irregulares. São microrganismos que se multiplicam dentro de uma ampla faixa de temperatura (7 a 45°C, sendo a faixa ótima entre 30 e 37°C), pH (4,2 a 9,3 sendo ótima a



faixa de 7,0 a 7,5), alta concentração de sal (15,0% de NaCl) e pouca umidade (Gould & Chamberlaine 1995; Kloss 1997; Kloss & Bannerman 1999; Le Loir et al. 2003).

Alexandre Ogston em 1883 utilizou a denominação *Staphylococcus* (do grego *stafilé* = cacho de uvas), para denominar um grupo da família *Micrococcaceae* que causava inflamação e supuração. Em 1884 Rosembach usou o termo taxonomicamente e realizou a primeira descrição do gênero, que é composto por 40 espécies e 24 subespécies, das quais 17 estão presentes na pele e mucosas humanas, podendo ser isolados da boca, sangue, glândulas mamárias, trato intestinal, genitourinário e respiratório superior (Kloss & Bannerman 1999; Cohen 1986; Euzéby 1997; Archer 1998; Vanderlinde et al. 1999; Wijaya et al. 2006). As espécies mais comumente associadas a infecções humanas e animais incluem *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* (Kloss & Bannerman 1999).

Tradicionalmente, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positiva e coagulase negativa. Essa divisão é baseada na capacidade de coagular o plasma, por reação direta com o fibrinogênio. Esta reação produz fibrina, que recobre as células bacterianas, permitindo sua rápida aglutinação e resistência aos processos de opsonização e fagocitose, o que é uma propriedade considerada, há longo tempo, como importante marcador de patogenicidade para tais microrganismos (Kloss 1997).

*S. aureus* é a espécie representativa dos estafilococos coagulase-positiva. Clinicamente é o mais importante dos estafilococos (Gould & Chamberlaine 1995; Marangoni 1996; Lowy 1998). A capacidade do *S. aureus* em colonizar e produzir infecções envolve fatores ligados ao hospedeiro e de virulência bacteriana, mediados por toxinas, invasividade e resistência a antibióticos, de origem cromossômica ou plasmidial (Arbuthnott et al. 1990; Bannerman 2003; Le Loir et al. 2003). Dentre os fatores de virulência extracelulares estão toxinas que lesam a membrana citoplasmática ( $\alpha$ -toxina,  $\beta$ -toxina,  $\delta$ -toxina e leucocidina), toxinas epidermolíticas, toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1), enterotoxinas, exotoxina pirogênica e exoenzimas como a coagulase, estafiloquinase, proteases, lipase, fosfolipase, DNase, hialuronidase e fosfatase que estão relacionadas ao arsenal patogênico do microrganismo (Arbuthnott et al. 1990; Dinges et al. 2000; Csukas et al. 2001; Shittu & Lin 2006).

A maioria dos *S. aureus* atua como patógeno oportunista, que pode colonizar um indivíduo, sem a presença de sintomas, por períodos curtos ou longos, causando doença

quando há algum comprometimento do sistema imunológico. Nenhum outro patógeno humano possui tanta versatilidade de estratégias de patogenicidade, fatores de virulência e capacidade de sobrevivência e multiplicação em uma diversidade de ambientes (Oliveira et al. 2002; Styers et al. 2006). Por essa extrema capacidade de disseminação é que a identificação dos portadores saudáveis adquire relevada importância. Comprovadamente os portadores nasais de *S. aureus* assumem papel importante na patogênese e epidemiologia da infecção por representarem fator de risco e fonte potencial de disseminação, tanto nosocomial como comunitária (Kluytmans et al. 1997).

*S. aureus* pode causar processos infecciosos variando de infecções cutâneas, doenças toxigênicas e infecções sistêmicas potencialmente fatais. Dentre as infecções agudas, destacam-se aquelas localizadas na pele e em tecidos moles (furúnculos, abscessos, foliculites, piodermites e impetigo), além de pneumonias graves, meningites, osteomielites, bacteremias, infecções cirúrgicas, artrite, endocardite e septicemia. Ainda, tem sido causa freqüente de impetigo em crianças (Miyake et al. 1991; Lowy 1998; Jarraud et al. 2002). Em relação às síndromes causadas por toxinas, destacam-se a da pele escaldada, do choque tóxico e intoxicações alimentares (Le Loir et al. 2003; Dauwalder et al. 2006).

Cinco estágios podem ser observados na patogênese das infecções causadas por *S. aureus*: (1) colonização, (2) infecção local, (3) disseminação sistêmica e/ou sepse, (4) infecção secundária, e (5) toxinose (Archer 1998). A gravidade das enfermidades dependerá da virulência da cepa, do inóculo e do sistema imunológico do hospedeiro. A manifestação clínica resulta da atividade direta das toxinas ou proliferação no organismo com formação de abscesso e destruição tecidual pela sua habilidade em aderir aos tecidos epiteliais, invadir o sistema vascular e se espalhar nos tecidos moles (Murray et al. 1999; Santos 2000). O imenso repertório genético dessa bactéria, para adaptação a mudanças em ambientes hostis, foi demonstrado pelo surgimento de cepas que manifestaram mecanismos de resistência aos antimicrobianos ao longo da introdução das drogas na prática clínica (Oliveira et al. 2002).

### **2.2.1. Resistência a antimicrobianos**

O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes químicos entre os microrganismos data do início da era antimicrobiana, com a introdução das primeiras

substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica. O início do uso clínico dos antimicrobianos, nas décadas de 1940 e 1950, trouxe para todo o mundo a equivocada ilusão de que os antibióticos seriam substâncias capazes de controlar todas as doenças infecciosas até então responsáveis por milhares de mortes (Moreillon 1995; Tavares 2000; Coates 2002). Pacientes bacterêmicos por *S. aureus* apresentavam uma mortalidade que excedia 80,0%, na era pré-antibiótica, com 70,0% destes pacientes desenvolvendo infecções disseminadas, com pequenas chances de sobrevivência (Skinner & Keefer 1941).

Devido à frequência de infecções causadas por *S. aureus*, muitos antibióticos foram introduzidos para uso terapêutico nas últimas décadas. Os principais grupos destes antibióticos são, entre outros, as penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos e carbapenemas. Entretanto, cepas resistentes à penicilina, estreptomicina, eritromicina e tetraciclina têm emergido. A partir de 1960, a meticilina e a oxacilina têm sido usadas no controle das infecções estafilocócicas, porém a frequência de *S. aureus* apresentando resistência a essas drogas tem aumentado em várias regiões do mundo (Tsen et al. 1998).

Tão rápido quanto a introdução das drogas na prática médica foi a comprovação de microrganismos apresentando resistência a elas. No geral, a resistência para a maioria das classes de antibióticos ou agentes antibacterianos tipicamente tem sido identificada em um período de até quatro anos após a aprovação do agente pelo FDA (*Food and Drug Administration*). O Quadro 4 mostra que, em muitos casos, algumas bactérias apresentavam uma resistência intrínseca que já havia sido relatada antes mesmo da aprovação da droga para uso clínico. Uma exceção foi observada quanto à vancomicina, uma droga glicopeptídica introduzida clinicamente em 1972 e restritamente utilizada no âmbito hospitalar, como última opção terapêutica para o tratamento de pacientes com estafilococos resistentes à meticilina, até a emergência, em 1987, de cepas denominadas VISA (*vancomycin intermediate S. aureus*) apresentando resistência intermediária a esta droga (Srinivasan et al. 2002; Bush 2004a e b).

A crescente evolução da resistência antimicrobiana provém de um cenário multifatorial que inclui a utilização excessiva e/ou inadequada dos antibióticos no ambiente hospitalar, na comunidade, nas indústrias alimentícias e veterinárias, bem como a relativa facilidade com que os microrganismos resistentes ultrapassam as barreiras geográficas (Tavares 2000; Hosein et al. 2002; Sefton 2002).

**Quadro 4** – Data de aprovação de agentes antimicrobianos, detecção de resistência microbiana e mecanismos envolvidos.

<i>Agente</i>	<i>Aprovação pelo FDA</i>	<i>Relato de resistência</i>	<b>Mecanismo de Resistência</b>
Penicilina G	1943	1940	Produção de penicilinase
Estreptomicina	1947	1947	Mutação na proteína ribossomal 12S
Tetraciclina	1952	1952	Bomba de efluxo
Meticilina	1960	1961	Gene <i>mecA</i> - alteração da PBP2 <sup>1</sup>
Ácido nalidíxico	1964	1966	Mutação na topoisomerase
Gentamicina	1967	1969	Enzima modificadora do aminoglicosídeo
Vancomicina	1972	1987	Gene <i>vanA</i> – alteração no terminal D-alanil-D-alanina
Cefotaxima	1981	1981	<i>AmpC</i> β-lactamase
		1983	ESBL <sup>2</sup>
Linezolida	2000	1999	Mutação na proteína ribossomal 23S

<sup>1</sup> *Penicillins Binding Protein*; <sup>2</sup> β-lactamase de espectro estendido (Fonte: Bush 2004a e b)

O aumento na frequência de linhagens com elevada resistência aos antimicrobianos foi, e provavelmente continuará a ser, um dos grandes problemas da medicina, porque é causado pelo que há de mais natural e essencial para a origem e evolução, não só das bactérias, mas de todos os seres vivos: “mutação espontânea e recombinação de genes”, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagens aos mais aptos. Os antimicrobianos atuam como agentes seletivos, favorecendo as bactérias resistentes presentes em uma população (Souza 1998; Crisóstomo et al. 2001).

A resistência bacteriana pode ser advinda de uma variedade de mecanismos: (i) a presença de uma enzima que inativa o agente antimicrobiano; (ii) a produção de uma enzima modificada, sem prejuízo da função, para substituir a enzima que é inibida pela droga; (iii) a mutação no gene que codifica o alvo para determinado agente antimicrobiano, com redução da afinidade pela droga; (iv) alteração postrancricional do alvo; (v) redução na absorção do antimicrobiano; (vi) bomba de efluxo para eliminação da droga; e (vii) superprodução do alvo. Além disso, a resistência pode ser causada por mecanismos ainda não esclarecidos,

como acontece com alguns genes que não são expressos *in vitro*, mas somente *in vivo* (Fluit et al. 2001).

Os mecanismos de aquisição de resistência em *S. aureus* são classificados em duas categorias: mutação de gene cromossômico bacteriano e aquisição de gene de resistência de outros microrganismos por troca genética (conjugação, transdução ou transformação). No caso de resistência adquirida, genes exógenos de resistência a antimicrobianos são encontrados em elementos genéticos móveis como plasmídeos, seqüências de inserção e ilhas genômicas (Lyon & Skurray 1987; Ito et al. 2003).

*S. aureus* é o patógeno de maior preocupação devido à virulência intrínseca, diversidade de infecções potencialmente fatais e capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais. Os primeiros relatos de estafilococos resistentes surgiram após a introdução de penicilina como antibioticoterapia, no ano de 1940 (Rammelkamp & Maxon 1942). Essas bactérias caracterizavam-se pela produção de enzimas  $\beta$ -lactamases que quebram o anel  $\beta$ -lactâmico desta substância, inativando-a. Entretanto, mesmo após o desenvolvimento de antibióticos semi-sintéticos resistentes às  $\beta$ -lactamases, como meticilina e oxacilina, estes microrganismos continuaram apresentando resistência crescente aos antimicrobianos disponíveis. São reconhecidos como MRSA – *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (Chambers 1997).

### **2.2.2. *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA)**

O advento da antibioticoterapia trouxe o fenômeno da resistência, *S. aureus* resistentes à meticilina apresentam uma virulência intrínseca, ampla capacidade de disseminação e multirresistência, sendo considerados problemas mundiais de saúde pública, tanto no âmbito hospitalar quanto no comunitário (Bukharie et al. 2001; Chambers 2001; Debbia et al. 2001).

A meticilina (2-6 dimetoxifenilpenicilina) foi introduzida na prática médica em 1960 como a primeira penicilina semi-sintética produzida que não era hidrolizada pelas  $\beta$ -lactamases estafilocócicas, sendo utilizada no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes à penicilina. Posteriormente, outros compostos resistentes à ação das  $\beta$ -lactamases foram desenvolvidos, como a oxacilina e nafcilina. Todavia, esta descoberta não solucionou o problema, pois logo após sua introdução foi relatado o primeiro caso de *S. aureus* resistente

à meticilina em 1961, em paciente de um hospital britânico (Jevons 1961; Fluit et al. 2001; Hisata 2005). Seguindo este relato, taxas crescentes de infecções ou surtos relacionados a clones de MRSA foram descritos na Europa, Japão, Austrália e EUA (Barret et al. 1968; Jessen et al. 1969; Enright et al. 2002).

As proteínas ligadoras de penicilina - PBP (*penicillins binding protein*) são responsáveis pela etapa final da síntese da parede celular bacteriana e consideradas o sítio de ligação das penicilinas, apresentando elevada afinidade pelos compostos  $\beta$ -lactâmicos, análogos estruturais de seu substrato. A resistência intrínseca à meticilina nos estafilococos é determinada pela aquisição de um cassete cromossomal estafilocócico *mec* (*staphylococcal chromosome cassette mec* – SCC*mec*), um elemento genético móvel de 20-60 Kb, compreendendo o gene *mecA* e os elementos regulatórios de sua transcrição, gene *mecI* e *mecRI*. O *S. aureus* apresenta quatro PBP (1, 2, 3 e 4), sendo o produto do gene *mecA*, uma PBP adicional denominada PBP2a ou PBP2', que apresenta baixa afinidade para ligação das penicilinas anti-estafilocócicas (meticilina, oxacilina, nafcilina) e para todos os outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, sem prejuízos à síntese da parede celular (Matthews et al. 1987; Chambers 1988; Chambers 1997; Santos 2000; Couto et al. 2003; Pérez-Roth et al. 2004). A estrutura do cassete cromossomal estafilocócico possui uma região hipervariável que pode conter elementos genéticos como plasmídeos e/ou transposons, abrigando genes que codificam resistência a diferentes classes antimicrobianas, conferindo um fenótipo multirresistente ao isolado (Lindsay & Holden 2004).

Nos últimos anos, foram identificados sítios no genoma bacteriano chamados fatores de expressão de genes meticilino-resistentes (*fem*). Até o momento, foram descritos uma série de genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF*. Estes fatores não são responsáveis pela resistência bacteriana, mas parecem auxiliar o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Marangoni 1996; Chambers 1997). Towner et al. (1998) descrevem que o gene *fem* está ausente em estafilococos coagulase-negativa.

A resistência dos estafilococos não se limita somente aos  $\beta$ -lactâmicos. Cepas multirresistentes, incluindo resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas têm sido comuns em grandes hospitais de todo o mundo, limitando as opções terapêuticas aos antibióticos glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina (Levy 1996; Tavares 2000). Assim, esta resistência cruzada do MRSA aos  $\beta$ -lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos o torna

um microrganismo relevante e de difícil controle no ambiente hospitalar, necessitando de um tratamento prolongado e de alto custo (Santos et al. 1999; Tavares 2000; Sieradzki 2003).

A aquisição de MRSA hospitalar – HA-MRSA (*hospital acquired-* MRSA) está frequentemente relacionada com fatores de risco predisponentes que incluem: idade avançada, hospitalização prolongada, uso de dispositivos invasivos como cateter venoso central, internação em unidade de terapia intensiva (UTI), tratamento de queimaduras, procedimentos cirúrgicos, inter-transferências de pacientes, proximidade a pacientes ou profissionais colonizados/infectados por MRSA e, universalmente, uso prévio de antibióticos, especialmente os de amplo espectro (Boyce 1992; Asensio et al. 1996; Lowy 1998; Safdar & Maki 2002).

A maioria das infecções causadas por HA-MRSA está associada com um número relativamente pequeno de clones epidêmicos, assim considerados pela habilidade em causar infecções, persistir e disseminar por regiões geográficas distintas, inclusive entre continentes. Tais clones epidêmicos foram classificados, por técnicas moleculares como: Brasileiro/Húngaro (SCCmec tipo IIIA/III); Ibérico (SCCmec I); Nova Iorque/Japonês (SCCmec II) e o clone pediátrico (SCCmec IV) (da Silva et al. 2003; Ribeiro et al. 2005).

Embora previamente considerado um patógeno nosocomial puro, recuperado somente de pacientes hospitalizados, a epidemiologia do MRSA vem mudando nos últimos anos (Boyce 1998). *S. aureus* resistentes à meticilina adquiridos na comunidade CA-MRSA (*community-acquired* MRSA) foram primeiramente descritos na década de 80, em grupos minoritários como usuários de drogas, presidiários, praticantes de luta livre e futebol, crianças, militares, nativos americanos, pessoas de baixo poder sócio-econômico e posteriormente disseminando para a população geral (Chambers 2001; CDC 2003; Cardoso 2005; Wijaya et al. 2006).

Dos anos 90 até o momento atual, CA-MRSA tem emergido como patógeno em adultos e crianças sem fatores de risco tradicionais para aquisição de MRSA (Groom et al. 2001; Hisata et al. 2005; Zetola et al. 2005), mas alguns autores têm relacionado a aquisição de CA-MRSA a fatores de risco que incluem transmissão intrafamiliar, uso frequente de antibióticos, visitas e/ou atendimento em instituições de saúde e contato estrito com profissionais da área da saúde (Shahin et al. 1999; Dietrich et al. 2004; Wylie & Nowicki 2005). A emergência e disseminação dos CA-MRSA representam um novo desafio à

medicina devido a gravidade das infecções e elevadas taxas de morbidade e mortalidade (Bolyard et al. 1998; Cristino et al. 1999; Tavares 2000; Buescher 2005).

A literatura tem relatado que os CA-MRSA possuem características singulares que os diferenciam dos MRSA nosocomiais. Acredita-se que existam dois tipos de MRSA isolados na comunidade; o multirresistente e o não multirresistente. O primeiro parece ter sido transmitido das instituições de saúde por profissionais da área ou por pacientes para as pessoas mais próximas, enquanto o último, isolado de indivíduos sem fatores de risco predisponentes, tem sido considerado o “verdadeiro” CA-MRSA (Salgado et al. 2003; Cardoso 2005).

A habilidade de CA-MRSA em causar infecções fatais foi inicialmente constatada entre 1997 e 1999 quando uma clone hipervirulento (cepa protótipo MW2) causou a morte de quatro pacientes pediátricos nos estados americanos de Minesota e Dakota do Norte. Esses pacientes não apresentavam fatores de risco para a aquisição de MRSA. Desde então, muitos estudos incluindo dados da sequência genômica completa do MW2 têm sido conduzidos com o objetivo de determinar os traços genéticos que fazem do CA-MRSA um patógeno tão virulento (CDC 1999; Shukla 2005).

Com o crescente aumento da prevalência das infecções estafilocócicas resistentes à oxacilina, a utilização da vancomicina aumentou de sobremaneira, e como consequência, casos de MRSA com sensibilidade diminuída à vancomicina, um dos antibacterianos de maior eficácia contra infecções causadas por esse agente, foram inicialmente relatados no Japão, EUA e atualmente apresentam uma ampla distribuição mundial (Kim et al. 2002; Liu & Chambers 2003).

O crescente nível de resistência dos MRSA aos glicopeptídeos e a transferência experimental dos genes *van* presentes nas cepas de enterococos resistentes à vancomicina para os MRSA, além da detecção de cepas de estafilococos resistentes à vancomicina, denominadas VRSA (*vancomycin-resistant S. aureus*), desponta para um quadro alarmante: o aparecimento de estafilococos resistentes a todo o arsenal antimicrobiano disponível na atualidade e isso, provavelmente, significará um retrocesso à era pré-antibiótica (Souza 1998; Watson et al. 2003).

O mecanismo de resistência à vancomicina está associado à aquisição, por conjugação, de um plasmídeo contendo o gene *vanA*, proveniente do *Enterococcus faecalis*. Este mecanismo de resistência promove a substituição do peptídeo final do terminal D-alanil-D-



alanina para D-alanil-D-lactato, cuja afinidade reduzida à vancomicina não traz prejuízos para a síntese da parede celular bacteriana e propicia uma estrutura química não usual ao microrganismo (Johnson et al. 1990; Chang et al. 2003; Cardoso 2005; Inoue et al. 2006). As alternativas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por VRSA são a quinupristina/dalfopristina (estreptograminas) e a linezolida (oxazolidinonas), recentemente disponíveis para uso clínico, com atividade potencial similar à vancomicina. Novos compostos encontram-se em fase de triagem clínica, o que pode representar novas opções terapêuticas frente às infecções provocadas por estes microrganismos, em face da atual antibioticoterapia limitada (Betriu et al. 2001; Wang et al. 2006).

### **2.3. Seleção de novas drogas**

A partir de 1960 começou a ser questionada a necessidade clínica de novos antibióticos, decorrente da seleção de microrganismos resistentes às drogas disponíveis, ocasionando um aumento na frequência das infecções hospitalares e comunitárias, principalmente entre crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos. A partir daí as indústrias farmacêuticas, até então preocupadas apenas com a modificação e melhoria das drogas já existentes, mudam sua ênfase, da simples produção em larga-escala reinicia-se a área, ainda com baixa prioridade, para pesquisa de novos e melhores agentes antimicrobianos (Donadio et al. 2002a; Overbye & Barret 2005). Desde então, novos programas de seleção de alvos têm sido estabelecidos para maximizar o isolamento de cepas de actinomicetos com habilidade em produzir substâncias naturais antibióticas e minimizar os testes de cepas produtoras já conhecidas (Okami & Hotta 1988).

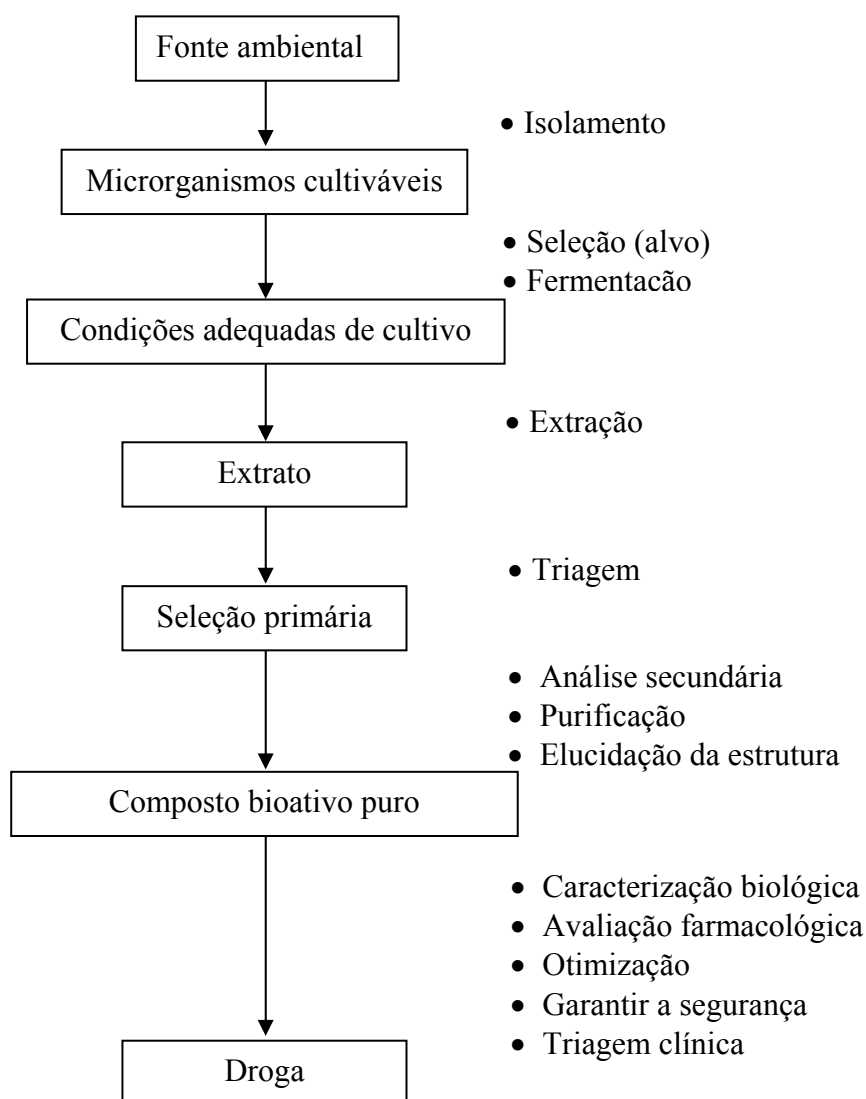
Os produtos naturais apresentam grande diversidade estrutural, variando de muito simples a altamente complexos. Estes produtos têm sido historicamente os guias de grande progresso na descoberta e pesquisa, levando a avanços consideráveis no processo de desenvolvimento de drogas. Além disto, a manipulação destes produtos pode gerar novos compostos com melhores propriedades, apresentando-se como as mais promissoras fontes de futuros antibióticos (Nicolaou & Snyder 2004; Walsh 2004). Stonard & Wideman (1995) relataram que dentre as características desejáveis a uma substância natural é essencial que seja biodegradável, apresente toxicidade seletiva e tenha mecanismo de ação específico a processos fisiológicos e/ou metabólicos do patógeno de interesse.

O êxito para a obtenção de substâncias bioativas, a partir de microrganismos, depende de um sistema efetivo de triagem. Nestes sistemas, geralmente são utilizadas grandes coleções de diversas moléculas químicas (definidas como bibliotecas), empregando testes designados para se detectar relevantes alvos moduladores (Omura 1986; Donadio et al. 2002b). O sucesso de uma triagem biológica depende de alguns passos, que incluem: (i) uso de material biológico apropriado como bactérias, células animais, enzimas e outros, que funcionem como alvo para a detecção da atividade desejada; (ii) habilidade para análise rápida e detalhada de uma pequena quantidade da substância produzida; (iii) capacidade para diversificar as condições de cultivo para o isolamento dos microrganismos; e (iiii) uso de tecnologias que permitam a caracterização química e identificação das substâncias desejadas, como esquematizado na Figura 5 (Omura 1986; Okami & Hotta 1988; Peláez 2006).

Para ser efetivo, um programa de triagem para a descoberta de novos antibióticos deve basear-se em mais de um teste de atividade. O teste inicial possibilita a detecção de todas as amostras atuando nos alvos desejados. Após a seleção das amostras promissoras, novos testes devem ser realizados para a confirmação efetiva desta ação. Esses testes podem variar desde testes de atividade *in vitro* até experimentos em animais. A aplicabilidade e a validade dos testes, a escolha e a caracterização dos alvos para as drogas; além do caráter subjetivo e intuitivo do pesquisador, devem ser considerados antes dos programas de triagem serem empreendidos (Donadio et al. 2002a).

Uma vez que uma fonte biológica de antibióticos é encontrada, esta normalmente produz um complexo de substâncias as quais devem ser fracionadas em componentes e compostos bioativos (Duke et al. 2000). O fracionamento geralmente consiste inicialmente em separar os extratos de uma fonte biológica identificada entre solventes polares e não polares. Alíquotas são testadas para a atividade biológica desejada, e o fracionamento continua na porção que demonstrar bioatividade (Choudhary & Rahman 1997; Pezzuto et al. 1998).

Na busca por novos compostos o objetivo é identificar uma molécula com o efeito desejado, estabelecer sua segurança e eficiência no tratamento de pacientes (Kraljevic et al. 2004). Um fator a se considerar é que a partir do entendimento da fisiologia bacteriana pode-se desenvolver uma relação entre atividade antibiótica-estrutura bacteriana, que muitas vezes é utilizada para direcionar modificações químicas em antibióticos, resultando em melhorias na sua atividade, com atuação frente a bactérias que anteriormente apresentavam-se resistentes à droga (Gootz 1990).



**Figura 5** – Processo de descoberta e produção de antibióticos a partir de produtos naturais microbianos (Fonte: Peláez 2006)

A avaliação de novas drogas trilha longas fases, que incluem estudos com animais e humanos (Projan 2003). As pesquisas baseadas em animais, requeridas para suportar a proposta de uma nova droga, são denominadas de estudos pré-clínicos e aquelas realizadas com seres humanos são os estudos clínicos. Os objetivos dos estudos pré-clínicos são caracterizar os efeitos tóxicos e determinar a relação dose-resposta de um novo composto, portanto avaliam os efeitos farmacológicos sobre estruturas não-alvo, características farmacocinéticas, efeitos genéticos, agudos, crônicos e toxicológicos da droga (ICH 1997). Na triagem clínica os objetivos são demonstrar a segurança da droga em humanos saudáveis

(Fase I), e a segurança e eficiência em pacientes (Fase II e III) (Gad & Chengelis 1995; Meyer & Svendsen 2003).

Atualmente existe uma tendência em utilizar-se de metodologias alternativas para a substituição do uso de animais para testes toxicológicos em laboratórios, especialmente devido ao custo e dificuldade de manutenção destes e para poupar o sofrimento e sacrifício daqueles animais submetidos às avaliações (Johnston & Rusche 1997; Yajes 1997). Diante disso e tendo em vista que a avaliação da citotoxicidade dos extratos é indispensável quando se deseja considerar seguro um determinado metabólito secundário, o teste de citotoxicidade utilizando *Artemia salina* tem sido bastante empregado para a determinação da capacidade citotóxica de diferentes substâncias, incluindo extratos vegetais (Arias et al. 1995; Addae-Keyereme et al. 2001; Jiménez et al. 2001; Moreno-Murillo et al. 2001), substâncias químicas (Vismara 1998; Hartl & Humpf 2000) e substâncias antineoplásicas (Badawey & Kappe 1997).

De acordo com o FDA, para uma droga experimental ser colocada no mercado o processo demora, em média, 12 anos e cada nova droga tem um custo aproximado de 800 milhões de dólares, valor que dobra a cada cinco anos. Além dos custos, barreiras administrativas têm se tornado problemáticas. Atualmente, de cada 5.000 compostos que entram em fase pré-clínica, somente cinco são testados em humanos e somente um recebe aprovação para uso terapêutico. Esta tendência – aumento dos custos para o desenvolvimento de drogas e a grande minúcia para aprovação – cria um crescente problema para as indústrias farmacêuticas e pacientes que esperam por novos medicamentos para tratar suas enfermidades (Gilbert 1987; Snodin 2002; Michelson & Joho 2000).

Embora novos antimicrobianos irão chegar ao mercado nas próximas décadas, este esforço irá dificilmente compensar o problema da emergência de microrganismos resistentes, causada em parte pelo uso de quase 50,0% dos antimicrobianos para propósitos diferentes do tratamento de doenças, pelo uso incorreto e/ou indiscriminado de antimicrobianos na terapia, e pelo fato de que novas classes de antibióticos demoraram um longo período de 37 anos para serem produzidas, como no caso do ácido nalidíxico em 1.962 até a linezolida em 2.000, gerando uma defasagem no ataque a novos alvos microbianos (Bax et al. 1998; Coates et al. 2002; Moellering 2003; Shlaes et al. 2004; Koehn & Carter 2006). Somente as estreptograminas dalfopristina/quinupristina (Synercid®), linezolida (Zyvox®) e mais recentemente o lipopeptídeo daptomicina (Cubicin®) podem ser considerados como novas classes de antibióticos lançadas ao mercado nos últimos 20 anos (Bush & Macielag 2000;

Coates et al. 2002; Overbye & Barrett 2005). Destes antimicrobianos anteriormente citados é importante mencionar que somente a linezolida é uma droga puramente sintética, os demais são derivados de produtos naturais (Nathwani 2005).

Segundo Newman et al. (2003), técnicas multidisciplinares para a descoberta de novas drogas, envolvendo a geração de diversidade molecular proveniente de fontes naturais, combinadas com uma metodologia totalmente sintética, incluindo a manipulação de vias metabólicas, fornecerão a solução para esta atual crise de produtividade que acomete a comunidade científica envolvida na descoberta e desenvolvimento de novas drogas.

Diante da comprovada eficácia de vários antibióticos produzidos a partir do cultivo de actinomicetos, a busca por novos compostos pode representar uma alternativa para a produção de drogas com atuação sobre patógenos multirresistentes e/ou neoplasias. Desse modo, actinomicetos obtidos a partir de solos de Cerrado e Mata Atlântica foram investigados *in vitro* quanto a sua ação: antibacteriana sobre isolados de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes, citotóxica pela metodologia que emprega náupios de *Artemia salina* e antitumoral pela capacidade de intercalar na molécula de DNA.

### **3.OBJETIVOS**

### **3. Objetivos**

- Isolar e caracterizar actinomicetos a partir de amostras de solos de Cerrado e Mata Atlântica;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos isolados frente a *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA);
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos crus dos actinomicetos frente a *Artemia salina*;
- Verificar o potencial antitumoral dos extratos crus pela capacidade de intercalação na molécula de DNA.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS



## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Isolamento dos actinomicetos**

No período de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2006 coletou-se, a uma profundidade de 0-10cm, amostras de solo em áreas de Cerrado (Bosque Rudyard Kipling-GO; Parque Ecológico de Goiânia-GO; Departamento de Estradas e Rodagem do Município e Companhia Municipal de Pavimentação DERMU COMPAV-GO e Chácara da Associação dos Docentes da Universidade Federal de Goiás ADUFG-GO) e Mata Atlântica (Cachoeiro de Itapemirim-ES; Cafezal Timbó-ES; Costão do Santinho-SC e Canavial Marataízes-ES). Para cada área, as coletas foram realizadas em quatro pontos distintos e posteriormente homogeneizadas, obtendo-se uma amostra única de cada solo. A escolha destas regiões se justifica por tratar-se de solos ricos em matéria orgânica em decomposição.

Para cada região de coleta as amostras receberam uma identificação e desta forma obteve-se amostras denominadas RK (Bosque Rudyard Kipling), PEG (Parque Ecológico de Goiânia), DCP (DERMU COMPAV), ADU (Associação dos Docentes da Universidade Federal), CIT (Cachoeiro do Itapemirim), OCT (Cafezal Timbó), CSSC (Costão do Santinho) e MES (Canavial Marataízes).

Cada amostra de solo foi submetida a um pré-tratamento de dessecação por 16 horas à temperatura ambiente e os actinomicetos foram isolados pelo método quimiotático (Anexo I-A) segundo Palleroni (1980). Para o adequado isolamento e purificação foi utilizado o ágar amido-caseína (AC) sugerido por Waksman (1961) e para a esporulação foram avaliados os ágaros AC e ISP-2 sugerido por Shirling e Gottlieb (1966) no *International Streptomyces Project*, cujas composições químicas estão descritas no Anexo II.

Duas câmaras de isolamento (Palleroni 1976a), cada uma possuindo dois compartimentos interligados por uma conexão, foram previamente desinfetadas com álcool etílico 70,0% e expostas à luz ultravioleta por uma hora para eliminar possíveis contaminantes.

Após o pré-tratamento, 0,5g de solo foi adicionado a cada compartimento de ambas as câmaras. Acrescentou-se água esterilizada a cada compartimento até um nível de 2,0mm

acima do canal de conexão. Este conjunto foi incubado a 28-30°C por uma hora a fim de que ocorresse a indução da mobilidade e a liberação dos esporos dos *Actinoplanetes* presentes.

Após este período em uma das câmaras foi colocado, no canal de conexão, um tubo capilar esterilizado contendo KCl 10,0mM em tampão fosfato 10,0mM, e na outra câmara colocou-se um tubo capilar esterilizado contendo xilose 10,0mM com o intuito de verificar a qual substância os actinomicetos apresentam maior afinidade (Hayakawa et al. 1991). Este conjunto foi incubado novamente por uma hora sob as mesmas condições. Posteriormente, os tubos capilares, de ambas as câmaras, foram removidos e lavados externamente com água esterilizada e o conteúdo de cada capilar vertido em um microtubo contendo 1,0mL de água esterilizada.

Alíquotas de 100µL de cada suspensão, previamente identificadas, foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar AC. As placas foram incubadas a 30°C, por 7 a 14 dias até o desenvolvimento de colônias características de actinomicetos. Cada colônia foi retirada e transferida para uma nova placa contendo ágar AC e novamente incubada a 30°C até a esporulação. Esse processo foi repetido por três vezes para certificar-se da pureza dos microrganismos isolados. As colônias características foram retiradas e re-semeadas em placas de Petri contendo ágar AC e ágar ISP-2 e novamente incubadas a 30°C até a esporulação e formação de um tapete de crescimento em toda a superfície do ágar.

Os isolados que foram obtidos por afinidade somente pela xilose receberam a letra X no final da denominação, aqueles que apresentaram afinidade somente pelo KCl em tampão fosfato receberam a letra F e aqueles que demonstraram afinidade por ambas as substâncias químicas não foram acrescidos de letras e contados uma única vez para evitar a duplicidade de amostras.

As colônias purificadas foram analisadas quanto à forma, afinidade tintorial, e separadas as que se apresentavam com características de actinomicetos. Tais características são relatadas como colônias lisas, brilhantes ou enrugadas, com a coloração variando do amarelo, alaranjado, vermelho, azul, verde, ocre, púrpura, marrom ou preto.

A metodologia e os meios de cultivo empregados tiveram como meta favorecer o isolamento de actinomicetos pertencentes ao gênero *Actinoplanes*, que são actinomicetos ditos “raros” que apresentam esporos móveis e são considerados como fontes promissoras de novas moléculas com atividade antimicrobiana (Palleroni 1980).

## 4.2. Identificação e susceptibilidade dos MRSA

### 4.2.1. População pediátrica

Os *S. aureus* meticilino-resistentes (n=7) recuperados de população pediátrica foram isolados da nasofaringe de crianças (2 meses a 5 anos de idade) com infecção do trato respiratório (suspeita de pneumonia ou meningite) adquirida na comunidade - Projeto de Vigilância Populacional de Pneumonias e Meningites Bacterianas - realizado no município de Goiânia e desenvolvido no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás no período de 2000 a 2003 sob a coordenação da Profa. Dra. Ana Lúcia S. S. de Andrade (Cardoso 2005).

O projeto inicial foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, recebendo parecer favorável e as crianças submetidas à coleta somente após preenchimento de questionário e consentimento informado por escrito dos pais ou responsável.

Os isolados tiveram sua identificação realizada de forma manual e automatizada, esta última, realizada no Laboratório de Análises da Saúde da Universidade Católica de Goiás (LAS-UCG), pelo sistema MicroScan<sup>®</sup> (Dade Behring –West Sacramento, Califórnia, USA) com o leitor automático autoSCAN4<sup>®</sup>. Para a identificação automatizada utilizou-se o painel Pos Combo21, que avalia: desenvolvimento na presença de baixas concentrações de cristal violeta, produção de glicosidases, fosfatase alcalina, fosfatase indoxil, pirrolidonase, urease, hemolisinas, redução do nitrato, produção de acetoina (Voges-Proskauer), bile esculina, fermentação de carboidratos (rafinose, lactose, trealose, sorbitol, arabinose, manose, manitol, inulina e ribose); descarboxilação da arginina, utilização de piruvato, tolerância à 6,5% de NaCl, suscetibilidade à optoquina e bacitracina, produção de  $\beta$ -lactamases e concomitantemente determina o perfil de suscetibilidade do microrganismo frente a 19 antimicrobianos.

A suscetibilidade dos isolados foi determinada pela medida da concentração inibitória mínima (CIM) e os resultados reportados como sensível, resistência intermediária ou resistente ao antimicrobiano, com base na interpretação dos *breakpoints*, segundo as recomendações do *National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (NCCLS 2003), recentemente denominada *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

#### **4.2.2. População hospitalar**

Os *S. aureus* meticilino-resistentes ( $n = 3$ ) provenientes de população hospitalar foram isolados de pacientes que estavam fazendo uso de antimicrobianos e se encontravam, no momento da coleta, internados em um Hospital-Escola de Goiânia-GO. Em todos os casos, o microrganismo recuperado dos pacientes era resultante de infecção de origem hospitalar.

No Laboratório de Microbiologia do referido Hospital-Escola os microrganismos foram identificados de forma automatizada pelo equipamento MicroScan® e as provas realizadas foram as mesmas constantes do item anterior (4.2.1).

Os *S. aureus* meticilino-resistentes foram armazenados em placas de ágar manitol salgado e enviados ao laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), onde foram reativados e submetidos a provas manuais confirmatórias da espécie e do perfil de resistência.

O presente projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Goiás, conforme estabelecido pela Resolução 196 de 10/10/1996, recebendo parecer favorável (Anexo III). Todos os participantes/responsáveis foram informados a respeito do estudo e aqueles que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento (Anexo IV).

Os microrganismos somente foram utilizados para esta pesquisa após preenchimento de questionário e consentimento informado por escrito do paciente ou responsável.

#### **4.2.3. Procedimentos manuais de identificação e teste de difusão de disco**

Os *S. aureus* meticilino-resistentes provenientes da população pediátrica e hospitalar, foram reativados em caldo BHI e cultivados a 37°C por 24 horas. Posteriormente foram isolados em ágar manitol salgado com incubação a 37° C por 24 horas. As colônias características (lisas, redondas, cremosas, coloração variando de acinzentada a amarelada) foram submetidas à coloração pela técnica de Gram. Pela observação microscópica de cocos gram-positivos, isolados ou em cachos, as amostras foram submetidas às provas bioquímicas de identificação, que incluíram: catalase, coagulase em tubo, lecitinase, urease, fermentação de carboidratos (manitol, glicose, sacarose, lactose e trealose), DNase, produção de acetoina (Voges-Proskauer), redução do nitrato e suscetibilidade à bacitracina.

O perfil de suscetibilidade dos isolados foi realizado pelo método de difusão de disco (antibiograma), de acordo com as recomendações do NCCLS (2003). Os *S. aureus* meticilino-resistentes (MRSA) foram repicados em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente o inóculo foi preparado em comparação com a metade da turbidez da escala nº1 de MacFarland, no qual 50,0µL do caldo foram diluídos em 5,0mL de salina esterilizada. O inóculo foi distribuído na superfície do ágar Müller-Hinton com *swab* esterilizado.

Os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) avaliados foram a oxacilina, cefoxitina, vancomicina, teicoplanina, linezolida, sulfametoxazol-trimetoprim, penicilina, rifampicina, ciprofloxacina, amicacina, eritromicina, clindamicina e azitromicina. Os discos contendo estas substâncias foram distribuídos na superfície do ágar Müller Hinton, com a ajuda de pinças esterilizadas. As placas foram incubadas a 37°C e após 24 horas realizada a observação e medição dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos. A cepa de *S. aureus* ATCC 29737 foi utilizada como controle de qualidade.

A interpretação dos resultados em sensível ou resistente aos antimicrobianos foi feita pela comparação com os da tabela de halos padronizada pelo NCCLS (2003).

#### **4.2.4. Extração do DNA e detecção dos genes *mecA* e *femB* por PCR**

A extração do DNA cromossomal dos MRSA foi realizada no Laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e seguiu o protocolo adaptado de van Soolingen et al. (1994) – Anexo I-B. Para tal as culturas bacterianas foram cultivadas em caldo LB por 16 horas e após esse período procedeu-se a centrifugação de 1,5mL em 6000 g a 10°C.

O sedimento foi ressuspenso em 400µL de tampão TE contendo lisozima (1,0 mg/mL) e incubado por uma hora a 37°C. Na sequência adicionou-se ao sistema de digestão 70,0µL de SDS a 10,0% e 6,0µL de proteinase K a 10,0 mg/mL, incubando a 56°C por 10 minutos. Após incubação, adicionou-se 100µL de NaCl a 5,0M seguidos de 80,0µL de solução CTAB/NaCl, agitando até se tornar leitosa, seguindo de incubação por mais 10 minutos a 65°C.

Adicionou-se um volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) e agitou-se por 30 segundos, seguindo uma centrifugação por 5 minutos a 12.000g. Posteriormente

precipitou-se a fase superior da extração pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e incubou-se a -20°C por 30 minutos. O DNA foi coletado por centrifugação a 12.000g por 20 minutos, e sofreu posterior lavagem com 1,0mL de etanol a 70,0% gelado. Após um período de secagem o material foi ressuspenso em 40,0µL de tampão TE e analisado em gel de agarose.

Para detectar a presença dos genes *mecA* e *femB* nos *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os primers utilizados foram:

a) para a detecção do gene *mecA*:

*mec06* FWD 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3';

*mec07* REV 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3';

b) para a detecção do gene *femB*:

*fem*FWD 5'-TTACAGAGTTAACTGTTACC-3'

*fem*REV 5'-ATACAAATCCAGCACGCTCT- 3'.

A reação de amplificação foi realizada em um volume de 30,0µL usando 1U da enzima Taq DNA polimerase (ABGene, Surrey, United Kingdom) 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10ng de cada primer, 0,2mM de dNTPs e 1,0µL da extração de DNA de cada amostra. Os parâmetros de ciclagem foram 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos de 92°C por 50 segundos, anelamento a 50°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e extensão final com cinco minutos de incubação a 72°C. Após o término da reação, os produtos finais da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo brometo de etídeo (0,5µg/mL) e a análise foi realizada visualmente em transiluminador.

#### 4.3. Atividade antimicrobiana dos actinomicetos – Técnica dos Plugs

Uma triagem inicial da atividade antimicrobiana dos actinomicetos foi realizada com as seguintes cepas-padrão: *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Rhodococcus equi* ATCC6939, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Staphylococcus aureus* ATCC29737 (controle de qualidade),

*Agrobacterium tumefaciens* ATCC33970, *Enterobacter aerogenes* ATCC13048, *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Serratia marcescens* ATCC14756 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027. Essa triagem teve o intuito de verificar o espectro de ação dos actinomicetos frente às diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas. Todos os actinomicetos que inibiram o crescimento do *S. aureus* ATCC29737 foram avaliados frente aos MRSA.

Para a determinação da atividade antimicrobiana de cada actinomiceto foram utilizados os MRSA recuperados de população pediátrica e hospitalar mencionados nos item 4.2. Para tal, os actinomicetos isolados foram inoculados em ágar AC e ISP-2 e incubados a 28-30°C por 14 dias. Em seguida, a partir do crescimento em “tapete”, cilindros de 7,0mm de diâmetro foram cortados destes ágares (*plugs*) e colocados sobre placas de Petri contendo o ágar Müeller-Hinton, em cuja superfície foram previamente inoculados os MRSA indicadores, que foram diluídos para a metade da concentração do tubo nº 1 da escala de MacFarland (Anexo I-C). As placas de Petri foram incubadas a 37°C que é a temperatura ideal para o crescimento dos microrganismos indicadores. A leitura da atividade antimicrobiana foi realizada medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento (em milímetros) dos MRSA após 24 horas. Como os *plugs* mediam 7,0mm, consideramos que os actinomicetos que resultaram em um halo de inibição  $\geq 9,0\text{mm}$  caracterizaram isolados capazes de produzir substância bioativa com potencial para inibir o crescimento dos MRSA.

#### **4.4. Produção e extração da substância bioativa**

Para a extração das substâncias bioativas foram empregadas duas metodologias, uma a partir do crescimento dos isolados em meio sólido e outra a partir do crescimento em meio líquido.

##### **4.4.1. Extrato a partir do crescimento em meio sólido - ECS**

Os microrganismos foram inoculados em ágar AC ou ISP-2 (de acordo com o melhor resultado obtido na avaliação da atividade antimicrobiana) onde permaneceram a uma temperatura de 30°C por 14 dias até a esporulação. Decorrido este período o ágar contido na

placa foi fragmentado e colocado em um tubo onde foram acrescidos 15,0mL de etanol para a extração dos metabólitos presentes e solubilização da massa micelial (Anexo I-D).

Cada amostra foi agitada em vórtex por 15 minutos e colocada em repouso por igual período, repetindo-se o procedimento por três vezes. Ao final do processo, todo o conteúdo do tubo foi filtrado e armazenada somente a fase líquida contendo etanol e a substância bioativa.

No laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFG a fase líquida foi concentrada sob baixa temperatura (45°C) em rotavapor e o extrato final obtido (5,0mL) foi acrescido de 1,0mL de etanol absoluto, constituindo o extrato cru a partir do crescimento em meio sólido (ECS), que foi distribuído em tubos de polipropileno de 1,5mL e posteriormente armazenados em freezer a -20°C.

#### **4.4.2. Extrato a partir do crescimento em meio líquido - ECL**

Um pré-inóculo dos isolados de actinomicetos foi preparado em Erlenmeyer contendo 15,0mL do caldo AC ou ISP-2. O pré-inóculo foi incubado sob agitação constante em *shaker* a 180 rpm, 30°C por 48 horas. Decorrido este período, foram adicionados 50,0mL de caldo novo e todo o conteúdo do Erlenmeyer foi novamente incubado sob as mesmas condições anteriores, por 14 dias (Anexo I-D).

Após o término da fermentação, o conteúdo do Erlenmeyer (50,0mL) foi filtrado para que ocorresse a separação do micélio e do sobrenadante (extrato aquoso). O micélio foi pesado (5,0g) para o cálculo do volume total de solvente a ser acrescido (2,0mL de etanol para cada grama de micélio). A massa micelial com etanol absoluto foi triturada com pistilo em um almofariz durante cinco minutos, posteriormente, utilizando-se papel de filtro e funil, a massa micelial foi filtrada e a porção líquida (filtrado) reservada. O procedimento foi repetido por 3 vezes e as porções de filtrado foram reunidas, constituindo o extrato etanólico, que resultou em um volume final de 10,0 mL.

Ao extrato aquoso foram adicionados 10,0mL de acetato de etila, que após agitação em funil de separação, as fases obtidas foram separadas, preservando-se a porção superior, denominada fase orgânica (extrato de acetato de etila). O extrato aquoso foi tratado mais duas vezes com acetato de etila e as diferentes porções obtidas foram reunidas.



No Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia - UFG o extrato etanólico foi concentrado sob baixa temperatura (45°C) em um rotavapor. Ao resíduo obtido após a evaporação, foi adicionado o extrato de acetato de etila. Esta mistura foi novamente evaporada no rotavapor. O precipitado final obtido (5,0mL) foi ressuspensão em 1,0mL de etanol absoluto, constituindo o extrato cru obtido a partir do crescimento em meio líquido (ECL), que foi posteriormente colocado em microtubos de polipropileno e armazenados em freezer a -20°C.

#### **4.5. Atividade antimicrobiana dos extratos crus - Técnica de Difusão em Poço**

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos crus (ECS e ECL) foi realizada pela técnica de difusão em poço (NCCLS 2003), com modificações. Os MRSA (n = 10) foram inoculados em 5,0mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e cultivados a 37°C por 24 horas. Após esse período foram preparadas suspensões nas quais 50,0μL de caldo BHI eram adicionados a tubos contendo 5,0mL de salina esterilizada, obtendo uma turvação equivalente à metade da escala nº1 de MacFarland.

Os microrganismos indicadores foram semeados, com o auxílio de *swab* esterilizado, em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton. Posteriormente foram confeccionados orifícios de 7,0mm de diâmetro em pontos equidistantes do meio de cultura (Anexo I-E). Em cada orifício foram acrescentados 25,0μL do extrato cru e dos controles. Para as placas contendo os ECS foi confeccionado um orifício para avaliação do etanol (controle negativo) e nas placas contendo os ECL foram adicionados dois poços para avaliação do etanol e acetato de etila.

As placas foram pré-incubadas à temperatura ambiente por duas horas e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. Decorrido este período, as zonas de inibição foram mensuradas em termos de halo (diâmetro da área com ausência de desenvolvimento microbiano). Consideramos que um halo  $\geq 9,0$ mm caracterizou um isolado capaz de produzir substância bioativa com potencial para inibir o crescimento do microrganismo indicador.

#### 4.6. Atividade citotóxica dos extratos crus

A metodologia para a determinação da atividade citotóxica utilizando *Artemia salina* foi padronizada, para este trabalho, utilizando as metodologias descritas por Blizzard et al. (1989) e Takahashi et al. (1989). *Artemia salina* L. (*Artemiidae*) é um camarão de água salgada, invertebrado e componente da fauna de ambientes marinhos. Este crustáceo possui um importante papel no fluxo de energia da cadeia alimentar, apresenta uma grande sensibilidade às mais variadas substâncias (Sanchez-Fortun et al. 1995) e tem sido empregado em avaliações toxicológica pré-clínicas, para determinar os valores de dosagem letal média ( $DL_{50}$ ), sendo considerado um método de triagem alternativo para validação de toxinas e extratos crus, que podem vir a se tornar novas drogas (Meyer et al. 1982; Lewan et al. 1992).

Ovos de *Artemia salina* foram eclodidos em uma solução salina contendo 3,5% de sal marinho em água mineral. Os ovos foram incubados, sob iluminação e aeração constante, a 30°C por 48 horas. Os extratos crus foram adicionados, em diferentes volumes, a 10,0mL de solução salina, previamente preparada. As diluições inicialmente empregadas foram 20.000ppm, 10.000ppm, 5.000ppm e 2.500ppm (Quadro 5), diluições posteriores foram preparadas de acordo com a necessidade para o cálculo da  $DL_{50}$  de cada amostra (Anexo I-F).

**Quadro 5** – Diluição inicial dos extratos crus e suas respectivas concentrações em porcentagem.

<i>ppm</i>	<i>Diluição</i>	%
20.000	200,0μL + 10,0mL de água	2,0
10.000	100,0μL + 10,0mL de água	1,0
5.000	50,0μL + 10,0mL de água	0,5
2.500	25,0μL + 10,0mL de água	0,25

Aos tubos contendo 1,0mL das diluições foram adicionados 10 náupilos de *Artemia salina* (experimento realizado em triplicata). Um tubo como controle negativo, que consistia apenas de etanol absoluto nas mesmas condições do experimento, foi adicionado ao ensaio para verificar uma possível ação tóxica dessa substância sobre os náupilos. Os tubos foram

incubados sob iluminação a 30°C por 24 horas. Após este período, o número de náupilos mortos ou com perda de movimento foram contados para a determinação da porcentagem de mortalidade das larvas em cada concentração analisada.

$$\% \text{ Mortalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de mortos ou imóveis}}{\text{n}^\circ \text{ total de } \textit{Artemia salina}} \times 100$$

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da DL<sub>50</sub>, que é a dosagem que mata 50,0% dos animais experimentais. Essa dosagem foi calculada pela análise de regressão linear dos resultados obtidos. Para a análise de regressão linear adotamos X para as concentrações dos extratos e Y para o número de náupilos mortos em cada concentração. De posse de todas as concentrações analisadas e dos resultados de % de mortalidade dos náupilos, utilizamos a equação da reta para o cálculo da DL<sub>50</sub> para os extratos obtidos de cada actinomiceto:

$$\hat{Y} = \bar{Y} + b (X - \bar{X})$$

Na equação acima o valor encontrado para X corresponde à concentração que representa a dosagem letal para 50,0% dos animais experimentais (DL<sub>50</sub>)

Para o cálculo de b:

$$b = \frac{\sum X.Y - \frac{\sum X \cdot \sum Y}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

b = ângulo de inclinação da reta;

$\sum X$  = somatória das diferentes concentrações analisadas;

$\sum Y$  = somatória do número de náupilos de *Artemia salina* mortos;

n = número de concentrações utilizadas para o cálculo.

#### 4.7. Efeito dos extratos na mobilidade do DNA em gel submetido a eletroforese

Para análise do efeito dos extratos na mobilidade do DNA foi realizada a técnica de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), também denominada *Gel Shift* (Buratowski & Chodosh 1996) e utilizadas as condições padronizadas por Furlan (2002) para análise de intercalação de antibióticos antitumorais. Esta metodologia permite verificar se as substâncias antibióticas produzidas pelos actinomicetos apresentam intercalação na molécula de DNA, caracterizando também uma possível ação antitumoral da amostra.

##### 4.7.1. Preparação do plasmídeo pUC19

Seguindo metodologia descrita por Holmes & Quigley (1981) o plasmídeo pUC 19 (2,7 Kb) foi extraído de uma linhagem de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cultivada em 5,0mL de meio LB (*Luria Broth*) contendo ampicilina (100 $\mu$ g/mL) e incubada por 16 horas a 37°C. Após esse período uma alíquota de 3,0mL do meio LB foi centrifugada em tubo de polipropileno de 1,5mL a 5.000g por 10 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 150 $\mu$ L de solução STET e 6,0 $\mu$ L de lisozima (20,0mg/mL). Em seguida o material foi aquecido em banho maria a 90°C por 40 segundos e posteriormente o tubo foi colocado diretamente no gelo.

Novamente o conteúdo do tubo foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, onde acrescentou-se 150 $\mu$ L de isopropanol. Após homogeneizar e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente o material foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 0,5mL de etanol 70,0% (-20°C). O DNA passou por um processo de secagem e na sequência foi ressuspenso em 30,0 $\mu$ L de água bidestilada autoclavada.

O plasmídeo pUC19 foi linearizado com a enzima de digestão *EcoR*I (Invitrogen) para um volume final de reação de 140 $\mu$ L, durante três horas de incubação a 37°C. Uma alíquota de 2,0 $\mu$ L do material foi utilizada para a quantificação em gel de agarose a 1,0%.

#### 4.7.2. Capacidade de intercalação dos extratos na molécula de DNA

O ensaio para visualizar o efeito das substâncias antibióticas sobre a molécula de DNA consistiu na mistura do DNA plasmidial com os extratos crus produzidos a partir do crescimento dos actinomicetos nos meios de cultura sólido e líquido (Anexo I-G). Utilizou-se como controle positivo uma solução contendo o DNA plasmidial acrescido de brometo de etídeo diluído em água bidestilada autoclavada (1:75 $\mu$ L). O brometo de etídeo é um análogo de base que se intercala na molécula de DNA e emite fluorescência violeta quando excitado com luz ultravioleta (UV). Na sua presença acontece uma redução da motilidade do DNA, e esse retardo na corrida deve-se ao aumento no tamanho e na rigidez das formas linear e circular relaxada. O efeito intercalante é mais pronunciado no DNA relaxado, pois nesse tipo de conformação a presença do brometo induz à formação de super-enovelamento positivo (De-Souza 2003).

Os extratos crus (50,0 $\mu$ L) foram colocados em microtubos de polipropileno (1,5mL) e, em seguida, realizou-se a secagem completa do conteúdo, por aquecimento, para retirada do etanol e do acetato de etila, evitando que estas substâncias interferissem no resultado final. Posteriormente acrescentou-se 50,0 $\mu$ L de clorofórmio a cada microtubo, sendo então colocados em banho maria a 37°C por 15 minutos para eliminar as impurezas do extrato. Novamente todo o conteúdo passou por um processo de secagem e foi ressuspenso em 8,0 $\mu$ L de água miliQ e 2,0  $\mu$ L de DNA. A mistura foi incubada durante 15 minutos a 37°C em banho maria.

Aplicou-se o volume total da reação acrescido de 1,0 $\mu$ L de tampão de amostra em gel de agarose a 0,7% e foi colocado para correr em cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0,5X. Adicionou-se em um dos poços do gel o padrão de peso molecular *ladder* 1Kb plus (Gibco), em outro um controle negativo contendo somente o DNA e o tampão de amostra.

Após o término da corrida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídeo (10,0 $\mu$ g/mL). Uma diferença de migração na banda, em relação ao controle negativo indica uma intercalação do antibiótico na molécula de DNA e sugere uma atividade antitumoral.

A composição química dos meios de cultivo e dos reagentes utilizados nos ensaios encontram-se no Anexo II.

## **5. RESULTADOS**

## **5. Resultados**

### **5.1. Isolamento dos actinomicetos**

Neste estudo, um total de 50 morfoespécies de actinomicetos foram isoladas das oito amostras de solo processadas. Das morfoespécies, 26 (52,0%) foram obtidas a partir das amostras coletadas de solos de Cerrado e 24 (48,0%) de solos de Mata Atlântica. Dos isolados obtidos a partir de solo de Cerrado 11 (42,3%) apresentaram afinidade somente pela xilose, sete (27,0%) somente pelo KCl em tampão fosfato e oito (30,7%) apresentavam afinidade por ambos os quimioatraentes. Daqueles obtidos a partir de solo de Mata Atlântica 14 (58,3 %) apresentaram afinidade somente pela xilose, três (12,5 %) pelo KCl em tampão fosfato e sete (29,2%) por ambos (Tabela 1).

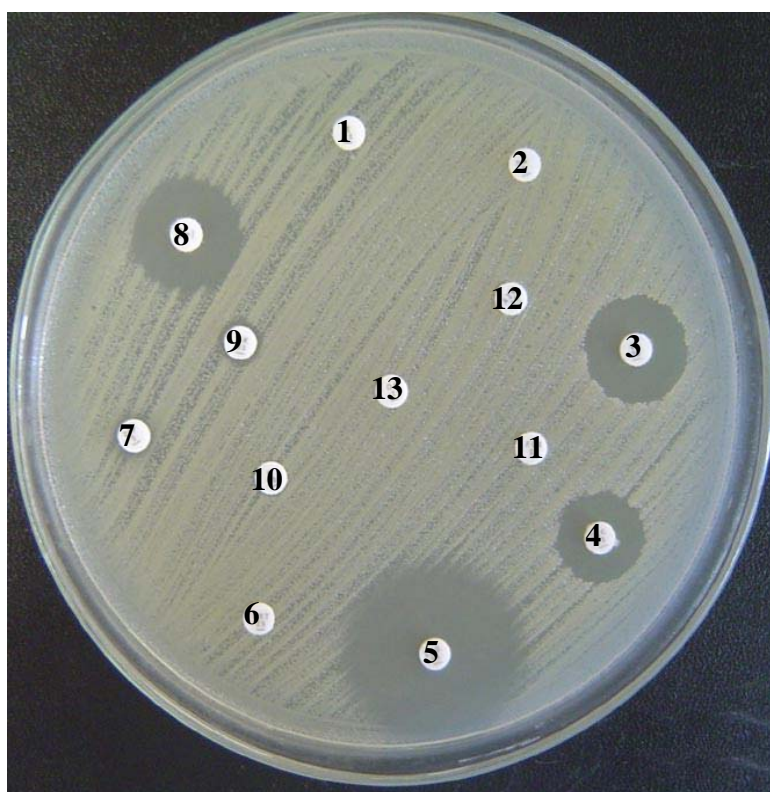
**Tabela 1** – Total de morfoespécies de actinomicetos por amostra de solo e afinidade química dos isolados

	Região	Nº Total de Isolados	Afinidade		
			Xilose	KCl	Ambos
Cerrado	Bosque Rudyard Kipling	13	9	4	-
	Parque Ecológico de Goiânia	3	-	-	3
	DERMU COMPAV	3	1	2	-
	Associação dos docentes UFG	7	1	1	5
	Subtotal	26 (52,0%)	11 (42,3%)	7 (27,0%)	8 (30,7%)
Mata Atlântica	Cachoeiro do Itapemirim	7	-	-	7
	Cafezal Timbó	5	5	-	-
	Costão do Santinho	6	6	-	-
	Canavial Marataízes	6	3	3	-
	Subtotal	24 (48,0%)	14 (58,3%)	3 (12,5%)	7 (29,2%)
Total		50 (100%)	25 (50,0%)	10 (20,0%)	15 (30,0%)

## 5.2. *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA)

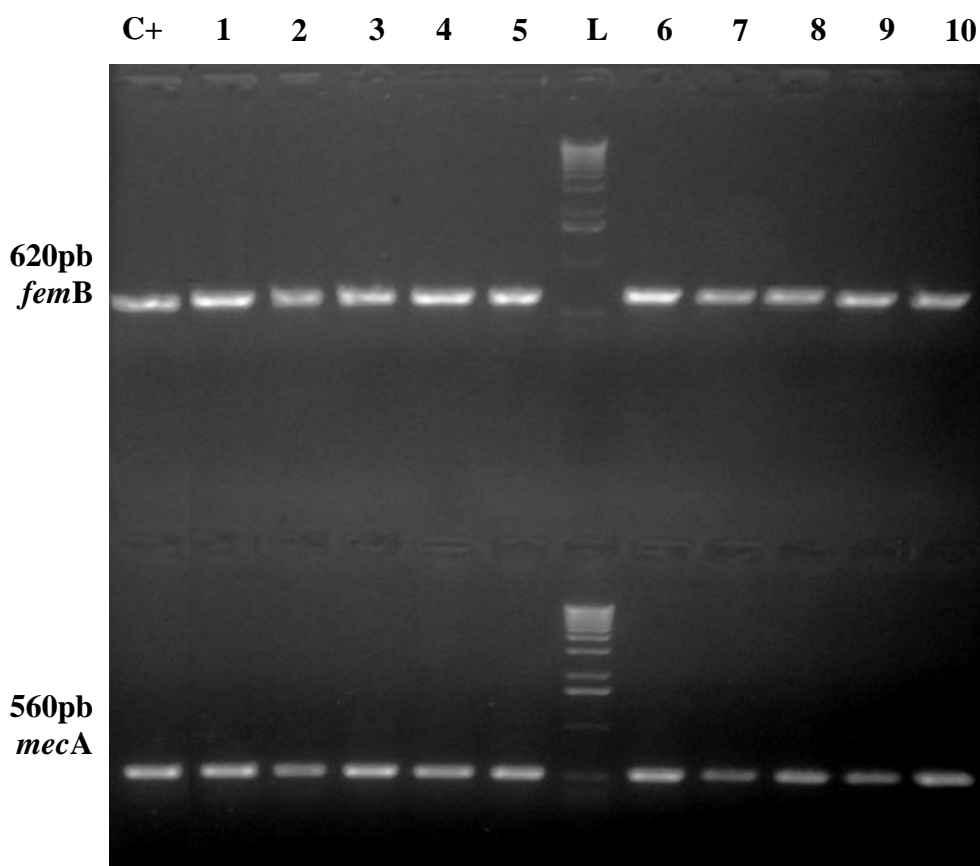
Todos os MRSA utilizados como microrganismos indicadores nesta pesquisa apresentaram resistência a maioria dos antimicrobianos avaliados, incluindo antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos e a oxacilina, sendo, portanto, confirmada a caracterização como MRSA, a multirresistência a antimicrobianos (Figura 6), bem como a presença dos genes *mecA* e *femB* pela técnica de PCR (Figura 7).

A Tabela 2 apresenta o perfil de suscetibilidade dos MRSA pelo método automatizado (MicroScan®), demonstrando que dos 19 antimicrobianos avaliados, estes microrganismos apresentaram sensibilidade somente à vancomicina, linezolida, rifampicina, sinercid e gatifloxacina.



**Figura 6** – Padrão de resistência do isolado CA-MRSA3 pelo método de difusão de disco. Discos contendo os antimicrobianos: 1 = eritromicina; 2 = clindamicina; 3 = vancomicina; 4 = teicoplanina; 5 = linezolida; 6 = sulfametoxazol-trimetoprim; 7 = ciprofloxacina; 8 = rifampicina; 9 = amicacina; 10 = penicilina G; 11 = cefoxitina; 12 = azitromicina; 13 = oxacilina.





**Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação dos genes *femB* e *mecA* pela técnica de PCR para os isolados MRSA. C+ = controle positivo *S. aureus* ATCC 49476; L = padrão de massa molecular (DNA lambda digerido com a enzima *Hind* III); Coluna 1 = CA-MRSA1; Coluna 2 = CA-MRSA2; Coluna 3 = CA-MRSA3; Coluna 4 = CA-MRSA4; Coluna 5 = CA-MRSA5; Coluna 6 = CA-MRSA6; Coluna 7 = CA-MRSA7; Coluna 8 = HA-MRSA1; Coluna 9 = HA-MRSA2; Coluna 10 = HA-MRSA3.

**Tabela 2** - Perfil de suscetibilidade dos isolados MRSA pelo método automatizado (MicroScan®)

Amostras	Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos																		
	Amx	AmS	Amp	Cfz	Ctx	Cip	Cli	Eri	Gat	Gen	Lev	Lin	Oxa	Pen	Rif	Sin	Tet	Smt	Van
CA-MRSA1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
CA-MRSA2	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	S	R	R	S	S	R	R	S
CA-MRSA3	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
CA-MRSA4	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	S	R	R	S	S	R	R	S
CA-MRSA5	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	S	R	R	S	S	R	R	S
CA-MRSA6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S
CA-MRSA7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
HA-MRSA1	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R	S	S	S	R	S
HA-MRSA2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
HA-MRSA3	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	R	R	S	S	R	R	S

Amx = amoxicilina + ácido clavulânico; AmS = ampicilina + sulbactam; Amp = ampicilina; Cfz = cefazolin; Ctx = ceftriaxona; Cip = ciprofloxacina; Cli = clindamicina; Eri = eritromicina; Gat = gatifloxacina; Gen = gentamicina; Lev = levofloxacina; Lin = linezolida; Oxa = oxacilina; Pen = penicilina; Rif = rifampicina; Sin = sinercid; Tet = tetraciclina; Smt = sulfametoxazol/trimetoprim; Van = vancomicina; R = resistência; I = resistência intermediária; S = sensibilidade à droga.

### 5.3. Atividade antimicrobiana dos actinomicetos

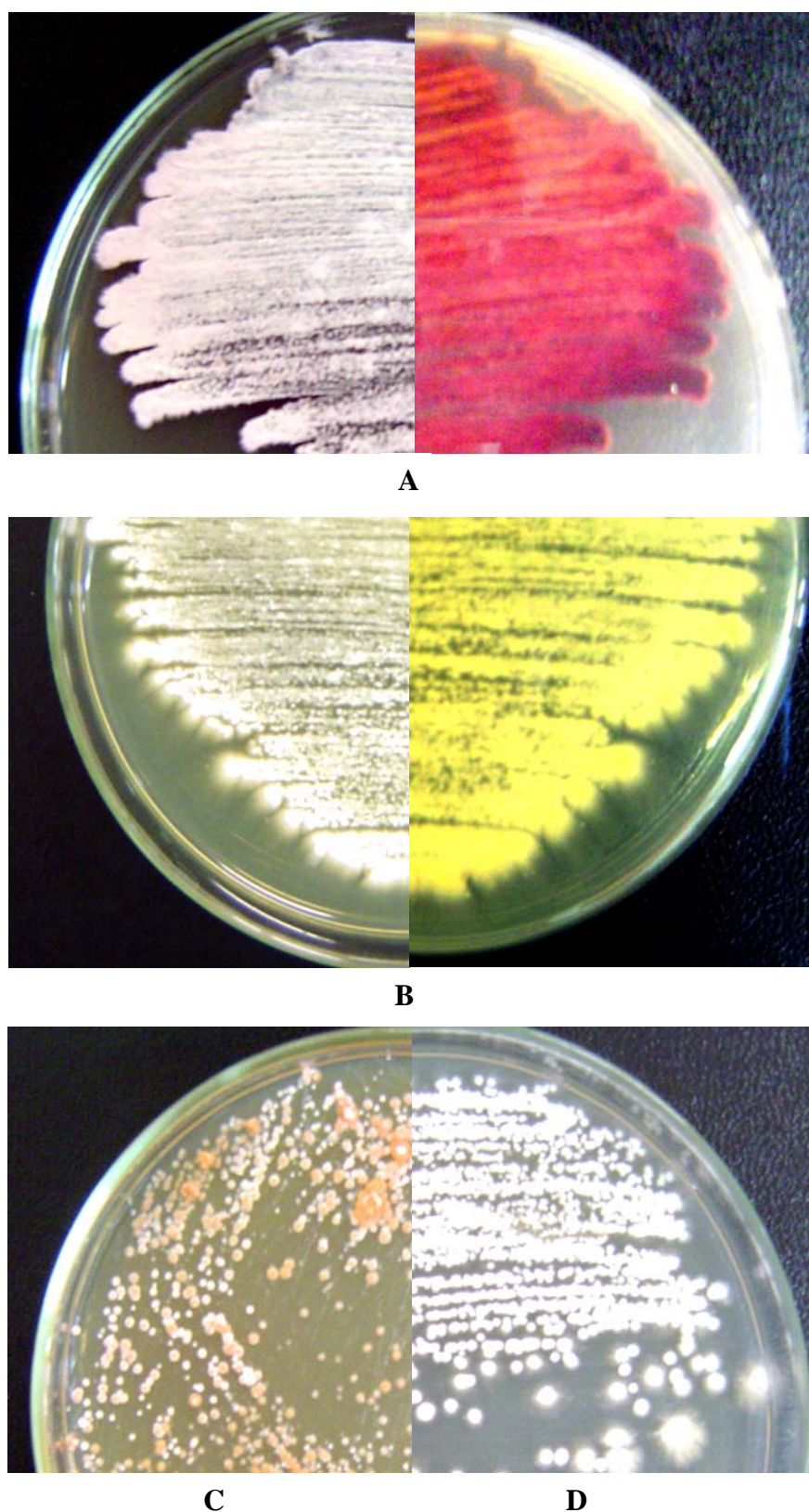
Todas as morfoespécies de actinomicetos tiveram sua atividade antimicrobiana *in vitro* avaliada inicialmente frente a cepas-padrão gram-positivas e gram-negativas. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o espectro de atividade destes actinomicetos foi maior frente a bactérias gram-positivas, sendo que do total de isolados, 11 (22,0%) inibiram o crescimento de pelo menos 2 microrganismos-padrão. Quanto aos gram-negativos, constatou-se que 6 (12,0%) isolados atuaram frente a *A. tumefaciens* e somente o RKX13 inibiu o crescimento da *E. coli*. Os actinomicetos que apresentaram atividade antimicrobiana sobre a cepa-padrão de *S. aureus* ATCC29737 (sensível à meticilina) prosseguiram nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana, sendo que dos 11, sete (63,3%) mantiveram o bom resultado quando seu produto metabólico foi avaliado frente aos MRSA.

As sete morfoespécies foram caracterizadas quanto a coloração dos micélios e produção de pigmento no meio de cultura onde apresentou os melhores resultados de produção de massa micelial e inibição dos MRSA indicadores. As características das colônias destes actinomicetos podem ser observadas na Tabela 3 e Figura 8. Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento dos MRSA gerados por cada actinomiceto em ágar AC e ISP-2 podem ser observados na Tabela 4. A Figura 9 mostra que os ágares AC e ISP-2, utilizados como controles-negativos, não influenciaram nos resultados.

**Tabela 3** – Características macroscópicas do cultivo dos actinomicetos que inibiram *in vitro* o crescimento dos MRSA indicadores.

Isolado	Procedência	Meio de Cultivo Ideal	Pigmento	Micélio de Substrato	Micélio Aéreo
OCTX4	Mata Atlântica	AC	-	Branco	Branco
PEG3	Cerrado	AC	Violeta	Violeta	Branco
RKX3	Cerrado	AC	Amarelo	Amarelo	Branco
RKX13	Cerrado	AC	-	Branco	Cinza
RKF3	Cerrado	AC	-	Branco	Branco
RKF7	Cerrado	ISP-2	Rosa	Rosa	Rosa
RKF8	Cerrado	ISP-2	-	Amarelo	Branco

AC = ágar amido-caseína; ISP-2 = ágar *International Streptomyces Project*.

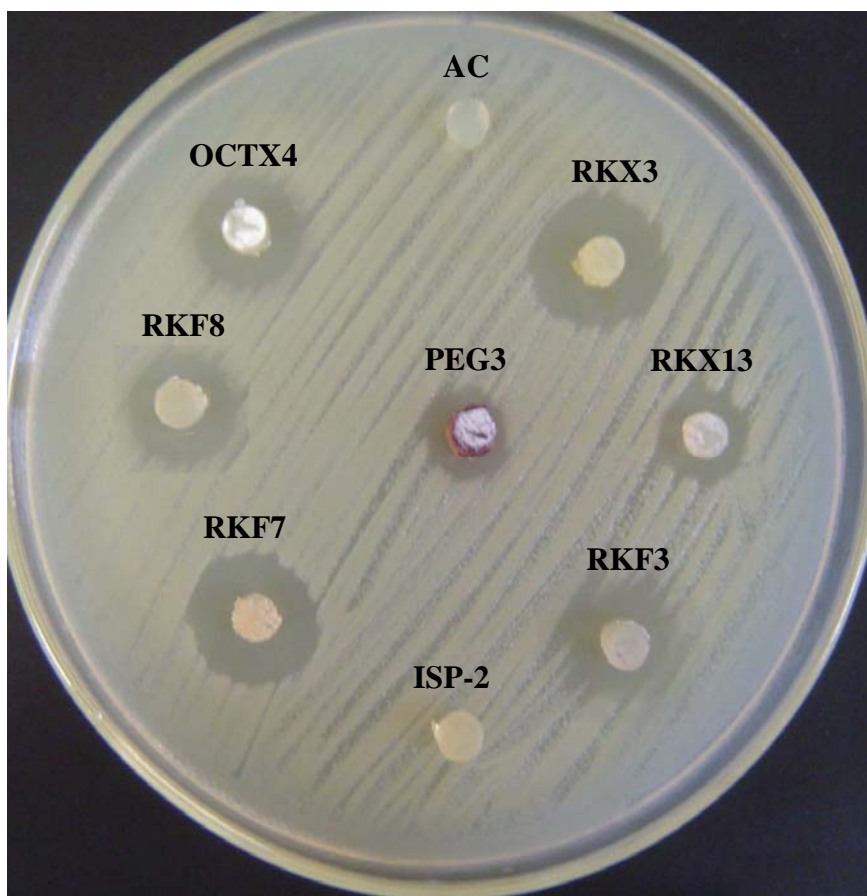


**Figura 8** – Características macroscópicas do cultivo de alguns actinomicetos isolados. A) **PEG3**: micélio aéreo e verso da colônia (ágar AC); B) **RKX3**: micélio aéreo e verso da colônia (ágar AC); C) **RKF7** micélio aéreo (ágar ISP-2) e D) **RKF3** micélio aéreo (ágar AC).

**Tabela 4** – Comparação do diâmetro dos halos de inibição do crescimento dos MRSA gerados pelo actinomicetos em ágar AC e ISP-2. Técnica de *Plugs*

Amostra	Diâmetro dos halos de inibição (mm) do crescimento dos MRSA																			
	CA1		CA2		CA3		CA4		CA5		CA6		CA7		HA1		HA2		HA3	
	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I	A	I
RKX3	<b>23</b>	22	<b>19</b>	18	<b>20</b>	17	<b>21</b>	16	<b>20</b>	17	<b>19</b>	17	19	19	<b>22</b>	21	20	20	<b>21</b>	20
RKX13	<b>17</b>	15	<b>20</b>	13	<b>18</b>	12	<b>20</b>	12	<b>19</b>	12	<b>18</b>	11	<b>18</b>	10	<b>15</b>	13	15	15	15	15
RKF3	<b>16</b>	12	<b>15</b>	13	<b>14</b>	12	<b>16</b>	13	<b>15</b>	13	<b>14</b>	11	<b>14</b>	12	<b>16</b>	11	11	<b>12</b>	12	<b>13</b>
RKF7	<b>21</b>	17	17	<b>18</b>	16	<b>22</b>	17	<b>22</b>	16	<b>21</b>	17	<b>22</b>	16	<b>21</b>	16	16	17	<b>18</b>	16	<b>17</b>
RKF8	15	15	13	<b>17</b>	12	<b>17</b>	13	<b>16</b>	12	<b>17</b>	13	<b>20</b>	12	<b>18</b>	<b>15</b>	13	<b>14</b>	13	<b>12</b>	10
OCTX4	<b>16</b>	15	<b>13</b>	12	<b>13</b>	12	<b>15</b>	13	<b>13</b>	12	<b>11</b>	11	12	12	<b>17</b>	15	<b>15</b>	13	15	15
PEG3	<b>15</b>	13	<b>11</b>	10	<b>13</b>	10	11	11	<b>12</b>	10	<b>12</b>	10	<b>13</b>	11	13	13	<b>13</b>	11	11	11
AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CA = CAMRSA; HA = HAMRSA; A = ágar AC; I = ágar ISP-2; AC = *plug* contendo somente o ágar amido-caseína (controle negativo); ISP-2 = *plug* contendo somente o ágar ISP-2 (controle negativo); – = ausência de atividade antimicrobiana.



**Figura 9** - Halos de inibição do crescimento do CA-MRSA5 produzido por cada actinomiceto (em seu meio de cultivo ideal) avaliado pela técnica de *plugs*. AC = controle negativo do ágar amido-caseína; ISP-2 = controle negativo do ágar ISP-2

#### 5.4. Atividade antimicrobiana dos extratos crus

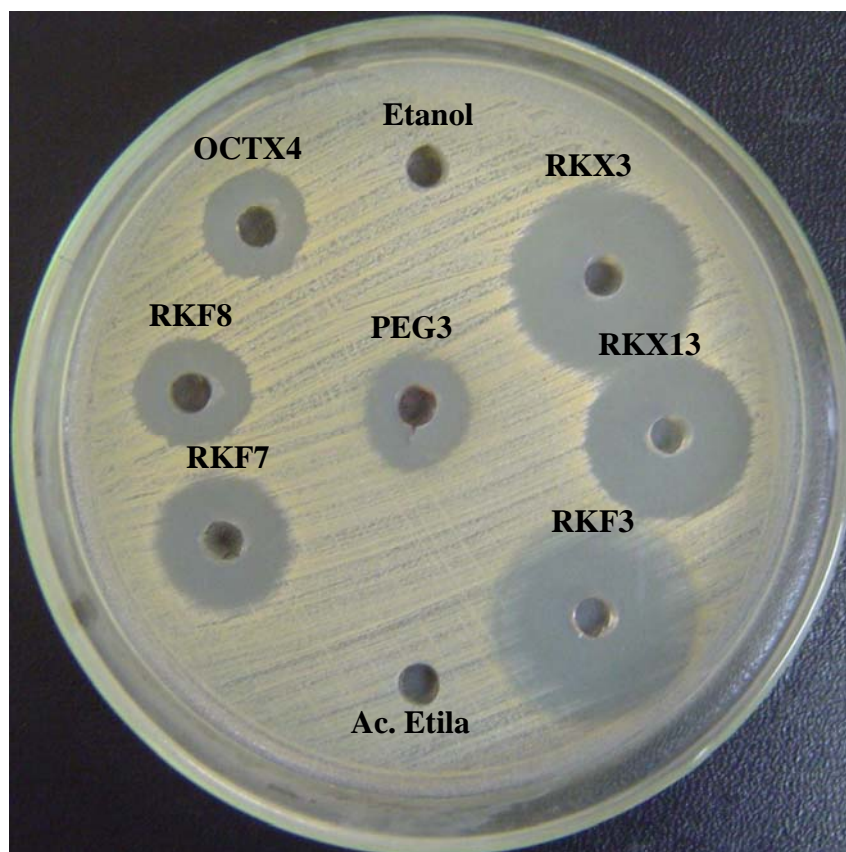
Neste estudo, os sete actinomicetos que apresentaram atividade antimicrobiana frente aos MRSA tiveram suas substâncias bioativas extraídas. Os extratos crus (ECS e ECL) foram obtidos a partir do crescimento dos isolados no meio de cultura em que apresentou os melhores resultados quanto à inibição dos microrganismos indicadores. Tal procedimento foi realizado com o objetivo de otimizar a produção de antibióticos pelos isolados. Desta forma tivemos RKX3, RKX13, RKF3, OCTX4 e PEG3 cultivados em ágar e caldo AC e os isolados RKF7 e RKF8 em ágar e caldo ISP-2.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos crus foi realizada pela técnica de difusão em poço, o que nos permitiu verificar que apenas RKF8 e OCTX4 apresentaram melhores resultados a partir do ECS, sendo que para os demais isolados o ECL produziu



maiores halos de inibição do crescimento dos MRSA tanto comunitários quanto hospitalares. Faz-se necessário enfatizar a superioridade da ação antibiótica dos extratos (ECS e ECL) quando comparados à atividade produzida pela técnica dos *plugs*. Tal fato pode ser comprovado analisando-se o diâmetro dos halos de inibição dos MRSA obtida em cada técnica (Tabela 4 e Tabela 5).

É importante mencionar que os solventes utilizados na produção dos extratos crus (etanol em ambos os extratos e acetato de etila no ECL) não mostraram interferência nos resultados (Figura 10).



**Figura 10** - Halos de inibição do crescimento do HA-MRSA2 produzidos pelos extratos crus (ECL) dos actinomicetos avaliados pela técnica de difusão em poço.

**Tabela 5** – Comparação do diâmetro dos halos de inibição do crescimento dos MRSA gerados pelos extratos crus obtidos do crescimento dos actinomicetos em meio sólido (ECS) e líquido (ECL). Técnica de Difusão em Poço.

Amostra	Diâmetro dos halos de inibição (mm) do crescimento dos MRSA																					
	CA1		CA2		CA3		CA4		CA5		CA6		CA7		HA1		HA2		HA3			
	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL	ECS	ECL
RKX3	27	30	26	29	27	28	26	30	27	30	27	27	25	30	22	26	21	28	21	30		
RKX13	22	27	23	25	23	25	21	26	23	27	20	25	22	28	22	25	21	25	23	27		
RKF3	24	27	22	25	24	25	22	25	24	26	24	27	21	26	21	22	20	25	21	24		
RKF7	20	19	19	20	21	20	20	21	21	20	20	23	19	21	22	20	17	17	19	20		
RKF8	23	18	21	19	23	18	19	15	23	16	22	18	20	13	22	18	15	14	19	17		
OCTX4	22	17	17	17	19	17	18	18	21	17	16	16	17	16	18	17	16	14	18	20		
PEG3	17	17	15	15	17	16	13	17	16	16	14	17	14	17	17	16	13	16	17	18		
Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
A. etila	¥	-	¥	-	¥	-	¥	-	¥	-	¥	-	¥	-	¥	-	¥	-	¥	-		

CA = CA-MRSA; HA = HA-MRSA; ECS = extrato obtido a partir do crescimento dos actinomicetos em meio sólido; ECL = extrato obtido a partir do crescimento dos actinomicetos em meio líquido; A. etila = acetato de etila; - = ausência de atividade antimicrobiana; ¥ = não avaliado.



### 5.5. Atividade citotóxica dos extratos crus

Os extratos crus produzidos pelos sete actinomicetos com atividade antimicrobiana foram avaliados quanto à atividade citotóxica utilizando a metodologia que emprega náupilos de *Artemia salina* como indicadores. Os valores de dosagem letal média (DL<sub>50</sub>) foram obtidos por análise de regressão dos resultados de porcentagem de mortalidade dos náupilos e estão apresentados na Tabela 6.

Dos extratos avaliados, somente aquele produzido pelo isolado PEG3 apresentou citotoxicidade em baixa concentração (DL<sub>50</sub> = 78,13ppm), os demais não se apresentaram citotóxicos por este método, com valores de DL<sub>50</sub> superiores a 1.000 ppm.

Foram observadas grandes variações nos valores de DL<sub>50</sub> para os extratos (ECS e ECL) obtidos do mesmo isolado.

**Tabela 6** – Valores de Dosagem Letal Média (DL<sub>50</sub>) para os extratos crus avaliados

<i>Actinomicetos</i>	<b>Dosagem Letal Média (DL<sub>50</sub>) em ppm*</b>	
	<b>ECS</b>	<b>ECL</b>
RKX3	1.500	<b>3.000</b> ¥
RKX13	1.500	<b>2.500</b> ¥
RKF3	4.500	<b>5.000</b> ¥
RKF7	<b>4.500</b> ¥	3.000
RKF8	4.000	<b>18.000</b> ¥
OCTX4	> <b>20.000</b> ¥	7.500
PEG3	<b>3.000</b> ¥	78,13

ECS = extrato obtido a partir do crescimento dos actinomicetos em meio sólido;

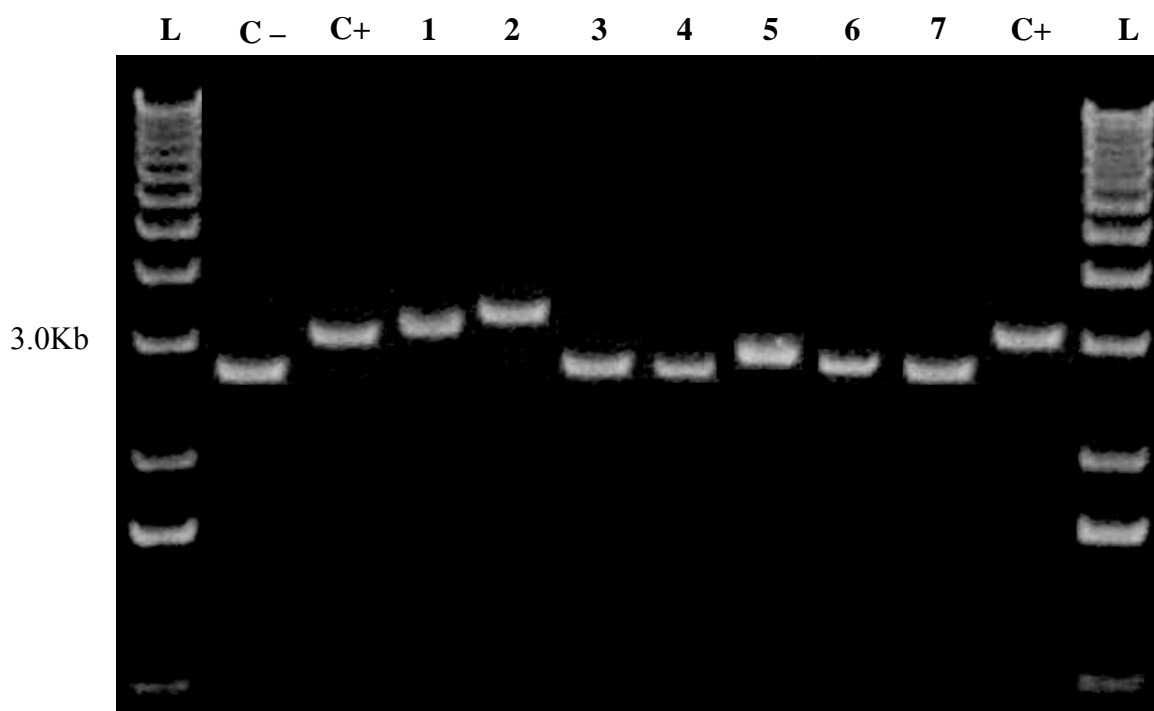
ECL = extrato obtido a partir do crescimento dos actinomicetos em meio líquido;

\* partes por milhão;

¥ = valor de DL<sub>50</sub> que representa a menor citotoxicidade.

### 5.6. Intercalação dos extratos crus na molécula de DNA

Todos os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foram avaliados pela técnica de gel *shift*. Os extratos crus (ECS e ECL) do isolado RKF8 apresentaram capacidade de intercalar na molécula de DNA, mas os melhores resultados foram observados para os extratos (ECS e ECL) obtidos dos isolados RKX3 e RKX13 que demonstraram intercalar na molécula de DNA, o que pode ser observado devido à diferença significativa de deslocamento do DNA quando associado aos extratos produzidos por ambos os isolados, em comparação aos controles (Figura 11).



**Figura 11** – Perfil de migração do DNA em gel de agarose 0,7% submetido à eletroforese utilizando amostras de extratos crus (ECL) obtidos dos actinomicetos que apresentaram atividade antimicrobiana frente aos MRSA indicadores. L = marcador de massa molecular (Ladder 1Kb); C - = controle negativo; C+ = controle positivo; Coluna 1 = RKX3; Coluna 2 = RKX13; Coluna 3 = RKF3; Coluna 4 = RKF7; Coluna 5 = RKF8; Coluna 6 = OCTX4; Coluna 7 = PEG3.

## **6. DISCUSSÃO**

## **6. Discussão**

### **6.1. Isolamento dos actinomicetos**

Neste estudo em que foi utilizado o método quimiotático para obtenção dos esporos de actinomicetos e o ágar amido-caseína (pH= 7,0) para o isolamento, observou-se um maior número de isolados obtidos a partir das amostras de solo de Cerrado (n=26) em comparação aos de Mata Atlântica (n=24), mas estes números não denotam uma diferença expressiva, possivelmente pelo fato de que todas as regiões de coleta apresentavam riqueza em matéria orgânica, apesar das diferenças nas condições ambientais, incluindo vegetação, características físico-químicas dos solo e período sazonal em que foram coletadas as amostras.

Poucos estudos sobre a quantificação de actinomicetos em solos têm sido desenvolvidos no Brasil. Coelho (1976) obteve 120 actinomicetos a partir de solos de Cerrado utilizando cinco meios de cultura distintos (ágar-amido, ágar amido-caseína, ágar glicose-asparagina, ágar albumina e ágar quitina), cada meio em dois pHs diferentes (5,5 e 6,5), na presença e ausência de antifúngico. Em um estudo mais recente Coelho et al. (1995) isolaram 84 actinomicetos, sendo 56 (66,7%) obtidos de solos de duas regiões de Cerrado e 28 (33,3%) de solo da Floresta da Tijuca. Na pesquisa os autores utilizaram quatro meios de cultivo (ágar amido, ágar amido-caseína, ágar peptona-glicerol e ágar nitrato-glicerol) para as amostras de solos de Cerrado e dois meios (ágar amido-caseína e ágar glicerol-asparagina) para a amostra de solo da Floresta da Tijuca e o pH 7,0 foi utilizado para todos os meios. Estes números de parecem contrastar com os de nosso estudo, mas a superioridade de isolados obtidos por Coelho deve-se, em parte, à metodologia empregada, que é de diluição seriada e esta técnica é considerada não seletiva quando comparada ao método quimiotático que é específico para os *Actinoplanetes*, além da maior variedade de meios e condições de cultivo utilizados pela autora.

Entretanto baixas taxas de isolamento já foram descritas por outros autores. Gonella (2003) utilizou o método quimiotático para obtenção dos esporos de *Actinoplanes* a partir de três diferentes solos brasileiros. A referida autora usou o ágar amido-caseína em pH 7,0 e obteve 11 isolados, sendo seis (54,54%) de solos de Cerrado, quatro (36,36%) de Mata Atlântica e um (9,0%) de região de Restinga. É importante mencionar o maior número de

isolados a partir de solos de Cerrado em comparação com os de Mata Atlântica, dados que concordam com aqueles encontrados em nosso estudo.

A literatura relata que taxas variáveis de crescimento são frequentemente vistas em populações microbianas de diferentes solos e a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais deve-se em grande parte aos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório (Ranjard et al. 2000), uma vez que apenas uma pequena fração dos organismos na natureza (em torno de 0,1% do total da população) é cultivável pelo uso de técnicas microbiológicas de rotina (Torsvik et al. 1990; Amann et al. 1995). Os microrganismos geralmente apresentam diferentes requerimentos nutricionais, que muitas vezes não são supridos pelo meio de cultura. Portanto, uma amostragem representativa de microrganismos do solo é complexa, devido a grande diversidade de solos com diferentes propriedades físico-químicas e os resultados de distribuição e densidade de uma população microbiana, bem como produção de substâncias bioativas são diretamente afetados pela escolha do meio de cultivo (Hopkins et al. 1991; Pimm et al. 1995; Felske et al. 1997; Vieira & Nahas 2005).

Os resultados obtidos em nossa pesquisa sugerem que os isolados, tanto de regiões de Cerrado quanto de Mata Atlântica, apresentaram uma maior afinidade química pela xilose em comparação com o KCl em tampão fosfato. Observação semelhante foi obtida por Hayakawa et al. (1991) em um estudo que utilizou o método quimiotático para avaliar diferentes substâncias químicas com potencial para atrair esporos de *Actinoplanes* e *Dactylosporangium*. Os autores verificaram que compostos orgânicos como aminoácidos, compostos aromáticos e açúcares, que são encontrados no solo, podem agir, da mesma forma que o KCl, como quimioatraentes para esporos móveis de actinomicetos. Nesse estudo a  $\gamma$ -colidina ( $10^{-1}\text{M}$ ) atraiu os zoósporos de todos os 10 (100,0%) actinomicetos avaliados, oito (80,0%) apresentaram quimiotaxia pela xilose ( $10^{-2}\text{M}$ ) e apenas cinco (50,0%) demonstraram afinidade pelo KCl ( $10^{-2}\text{M}$ ).

Este fato pode ser justificado levando-se em consideração que a xilose é um dos maiores componentes das pentosanas, sendo excretada pelas raízes dos vegetais, e foi sugerida por Parenti & Coronelli (1979) como sendo a fonte primária de energia na natureza, especialmente para os *Actinoplanes*, pelo fato de que estes microrganismos produzem a xilose isomerase de forma constitutiva, tendo, portanto, um papel fundamental na degradação de

resíduos de plantas e animais. Tais microrganismos, em seu ambiente natural, utilizam a afinidade química pela xilose para se mover em direção a uma fonte potencial de alimento.

Palleroni (1976b) estudando a resposta quimiotática de 16 *Actinoplanes* verificou que sete (43,75%) destes microrganismos eram atraídos pelos íons cloreto. Os achados deste trabalho serviram como base para o método de isolamento desenvolvido para os actinomicetos do gênero *Actinoplanes* e *Dactylosporangium*. Entretanto, o mesmo autor observou que actinomicetos que ocorriam em desertos e solos áridos não utilizavam íons cloreto e não apresentavam afinidade pelo KCl, sugerindo que esta não era uma substância universal para todos os representantes do grupo e que as características físico-químicas do solo que o microrganismo é proveniente também devem ser consideradas para a escolha do quimioatraente (Palleroni 1980).

## **6.2. *Staphylococcus aureus* meticilino- resistentes (MRSA)**

Os CA-MRSA e HA-MRSA utilizados neste estudo apresentaram uma multirresistência e foram caracterizados como detentores dos genes *femB* e *mecA*. Estes genes têm sido detectados em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina/oxacilina por meio de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da enzima polimerase – PCR (Michel & Gutmann 1997). Senna et al. (1996) relataram que este método oferece maior eficácia e segurança quando comparados com os métodos tradicionais de identificação bacteriana utilizados na rotina laboratorial. Além disso, com a técnica de PCR é possível identificar MRSA em cerca de 18 horas, apresentando-se assim, como uma alternativa, quando necessária, de identificação mais rápida.

*Staphylococcus aureus* apresentando resistência à meticilina foi escolhido como microrganismo indicador para esta pesquisa devido aos vários atributos patogênicos que possui, o que lhe confere enorme relevância no cenário clínico atual. A emergência de MRSA com progressiva multirresistência representa um novo desafio no tratamento de doenças infecciosas e, portanto um problema de saúde pública, tendo em vista a gravidade das infecções, as elevadas taxas de morbimortalidade, o arsenal toxigênico único, a maior virulência e ampla capacidade de disseminação destes microrganismos, o que demanda um maior controle e vigilância para o uso racional dos antimicrobianos atualmente em uso, bem

como a busca por novas opções terapêuticas em face da atual antibioticoterapia limitada (Lowy 1998; Betriu et al. 2000; Bukharie et al. 2001; Chambers 2001; Buescher 2005).

### **6.3. Atividade antimicrobiana dos actinomicetos**

Dos 50 actinomicetos isolados 11 (22,0%) apresentaram a capacidade de inibir o crescimento da cepa-padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 (sensível à meticilina) e destes, 7 (63,3%) mantiveram a atividade quando avaliados frente aos MRSA. Tais resultados sugerem que, possivelmente, os actinomicetos que não mantiveram os resultados de atividade antibacteriana (n=4) produzem uma substância antibiótica para a qual a cepa-padrão apresenta sensibilidade, mas os MRSA já possuem resistência. Para os demais isolados (n=7) supõe-se que sejam produtores de moléculas bioativas com potencial para o desenvolvimento como novos antibióticos, ou de antibióticos já descobertos, mas para os quais os MRSA ainda não desenvolveram resistência.

Verificou-se que dos sete actinomicetos que apresentaram atividade antibacteriana frente aos MRSA, apenas um é proveniente de solo de Mata Atlântica, demonstrando que apesar de ambos os solos apresentaram número semelhante de isolados, os solos de Cerrado forneceram um número maior de microrganismos com as características desejadas nesta pesquisa, o que caracteriza os solos deste bioma como uma promissora fonte para a pesquisa de novas e variadas moléculas, especialmente com características farmacológicas.

Observou-se que os actinomicetos isolados nesta pesquisa apresentaram crescimento abundante com maior quantidade de massa micelial e maior expressão de atividade antimicrobiana quando previamente cultivados em ágar AC. Tal fato justifica-se pelos diferentes constituintes presentes nos meios de cultura, o que pode influenciar tanto no desenvolvimento do microrganismo quanto na produção das moléculas bioativas (Piret & Demain 1988).

O ágar AC utilizado neste estudo possui o amido e a caseína como constituintes principais e Küster & Williams (1964) mencionam que os melhores meios que permitem um bom desenvolvimento dos actinomicetos, enquanto suprimem o crescimento de outras bactérias, são aqueles contendo amido ou glicerol como fonte de carbono e caseína, arginina ou nitrato como fonte de nitrogênio. De acordo com Korn-Wendish & Kutzner (1992), o

amido é degradado por muitos, se não todos, os actinomicetos, servindo como uma fonte seletiva de carbono. A combinação de amido com nitrato, que é utilizado por muitos actinomicetos como fonte de nitrogênio, é especialmente favorável para o isolamento destes organismos.

He et al. (1995) analisando a produção de armentomicina por *Streptomyces armentosus*, também observaram que a produção deste antibiótico foi influenciada pela concentração de amido presente no meio (diferentes relações carbono/nitrogênio). Em contrapartida, Lyra et al. (1968) demonstraram que a glicose foi a melhor fonte de carbono para a produção de rentamicina por *Streptomyces olindensis*. Vale ressaltar que o ágar ISP-2 utilizado em nossa pesquisa apresenta a glicose como principal componente e os isolados RKF7 e RKF8 demonstraram melhores resultados de produção de antibiótico quando cultivados neste meio.

A literatura apresenta vários estudos demonstrando o fenômeno de repressão na produção de antibióticos quando são utilizados diferentes meios de cultura. Tal repressão pode ser consequência da presença de uma fonte de carbono facilmente assimilada. A glicose tem sido comumente aplicada como uma excelente fonte de carbono para o crescimento dos actinomicetos (Sujata et al. 2005), mas, em alguns casos, pode interferir negativamente na produção de metabólitos secundários (Furlan 1997; Furlan 2002), tendo sido reportada como repressora momentânea da produção de eritromicina por *Saccharopolyspora erythrae* e atuando na repressão da síntese de actinomicina por *Streptomyces antibioticus* (Doull & Vining 1990).

Uma observação que merece ser mencionada é que todos os MRSA avaliados neste estudo mostraram-se sensíveis à ação das substâncias antibióticas produzidas pelos sete actinomicetos. Apesar das diferentes origens (comunidade e unidade hospitalar) os MRSA não apresentaram grandes diferenças quanto à susceptibilidade aos produtos do metabolismo secundário dos actinomicetos avaliados, o que sugere um grande potencial destes actinomicetos para a produção de substâncias antibióticas que inibem tanto o crescimento de CA-MRSA quanto de HA-MRSA.

Vários autores pesquisam a ação antimicrobiana de actinomicetos frente aos mais variados patógenos (Ouhdouch et al. 2001; Pandey et al. 2004; Sacramento et al. 2004; Boudemagh et al. 2005; Zitoune et al. 2005; El-Sersy & Abou-Elela 2006) e *Staphylococcus aureus* tem sido o microrganismo indicador em inúmeras pesquisas, mas o percentual de actinomicetos apresentando produção de antibiótico frente a este microrganismo tem sido



bastante heterogêneo, sendo que taxas de 10,0% (Oskay et al. 2004), 20,0% (Pandey et al. 2004) e 40,0% (Basílio et al. 2003) já foram descritas para as mais diferentes regiões geográficas.

Na busca por microrganismos produtores de antibióticos com atividade frente a MRSA, Wink et al. (2003) isolaram 3 actinomicetos de solos indianos. Estes microrganismos foram considerados produtores de antibióticos glicopeptídeos e a análise gênica do 16S rDNA demonstrou pertencerem ao gênero *Amycolatopsis*, sendo caracterizadas três novas espécies: *Amycolatopsis balhimycina* sp. nov., *A. tolypomycina* sp. nov., e *A. vancoresmycina* sp. nov. O antibiótico encontrado, denominado vancoresmicina, apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina (Hopmann et al. 2002). Semelhante ao isolado RKX3 obtido em nosso estudo, duas destas novas espécies (*Amycolatopsis balhimycina* sp. nov. e *A. vancoresmycina* sp. nov.) apresentaram micélio aéreo branco e micélio de substrato amarelo.

Uma pesquisa realizada por Kitouni et al. (2005) avaliou a produção de antibióticos por actinomicetos isolados de solos da região semi-áridas do Saara na Algéria. Nesta avaliação foram isolados 25 actinomicetos dos quais 8 (32,0%) apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* Mu50 resistente à vancomicina. O estudo conduzido pelo referido autor demonstrou que mesmo uma região considerada extrema, devido à elevada salinidade e natureza arenosa, pode possuir microrganismos com capacidades para a produção de antibióticos, tal qual os solos da região de Cerrado, que apesar de possuírem acidez generalizada, baixo teor de nutrientes minerais e elevado teor de alumínio, também apresentaram, em nossa pesquisa, um número significativo de microrganismos com capacidade antibiótica frente a MRSA multirresistentes.

Recentemente foi descoberto um novo antibiótico denominado platensimicina ( $C_{24}H_{27}NO_7$ ) produzido por *Streptomyces platensis* um actinomiceto isolado a partir de uma amostra de solo de região savânica da África do Sul. A platensimicina demonstrou forte atividade antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas, incluindo MRSA, *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) e *Enterococcus* sp. resistente à vancomicina. Este antibiótico apresentou como alvo a biossíntese de ácidos graxos, possuindo amplo espectro de atividade, eficiência *in vivo* e baixa toxicidade (Wang et al. 2006). A savana africana apresenta inúmeras similaridades com a nossa região de Cerrado e a descoberta de um novo antibiótico a partir de solos daquela região afirma que nossos achados sinalizam uma necessidade de estudos mais aprofundados sobre os microrganismos presentes em solos de

Cerrado, que em termos científicos ainda é pouco explorado e possivelmente alberga microrganismos com desconhecidas potencialidades farmacológicas.

#### **6.4. Atividade antimicrobiana dos extratos crus**

Neste estudo foi observada uma maior atividade antimicrobiana do ECL em detrimento do ECS, o que pode ser justificado levando-se em consideração que o crescimento em meio de cultura líquido ocorreu em *shaker* a uma aeração constante, fato que pode ter potencializado a produção de metabólitos secundários pelos isolados. Alguns autores consideram que além dos constituintes, o pH, a temperatura, o teor de oxigênio e o estado físico (sólido ou líquido) do meio de cultura também interferem no crescimento e produção de metabólitos secundários (Omoto et al. 1979; Shomura et al. 1979; Orduña & Theobald 2000).

Leitão et al. (1997) verificaram que o suprimento e a concentração de oxigênio são variáveis críticas para a produção da cefamicina C e cefalosporina C por *Nocardia lactamdurans*. Os pesquisadores concluíram que a redução dos níveis de oxigênio levou ao acúmulo de intermediários, indicando a baixa eficiência da conversão destes no produto final, com queda significativa no rendimento do processo.

Faz-se necessário enfatizar a superioridade da ação antibiótica dos extratos crus (ECS e ECL) quando comparados à atividade produzida pela técnica dos *plugs*. Os halos de inibição do crescimento dos MRSA a partir da ação dos extratos foram bem maiores, fenômeno que pode ser explicado levando-se em consideração dois fatores: a) o estado físico do extrato, que é líquido, permitindo uma maior difusão da substância bioativa, ao contrário dos *plugs*, que encontravam-se em estado solidificado (Omoto et al. 1979; Shomura et al. 1979); b) os extratos foram produzidos em rotavapor, portanto, considerando inicialmente o ECL, tem-se que os 50,0mL do caldo após o crescimento dos actinomicetos resultaram em 5,0mL, o que nos remete a uma concentração do extrato em 10 vezes após a rotoevaporação, e no caso do ECS os 15,0mL iniciais da diluição da massa micelial em etanol resultaram em 5,0mL, ou seja, um extrato três vezes concentrado. Esta concentração não ocorre na técnica que envolve a confecção dos *plugs*, onde a substância bioativa está menos concentrada (Omoto et al. 1979; Orduña & Theobald 2000).

Diante dos resultados obtidos ficou caracterizada a produção de substâncias naturais pelos actinomicetos com ação antibiótica frente aos MRSA provenientes da comunidade e de ambiente hospitalar. Vale mencionar que a busca por antibióticos efetivos frente a bactérias patogênicas multirresistentes tem atualmente direcionado uma importante área da pesquisa. (Sujatha et al. 2005). Além disso, a atividade antibiótica é de valor extraordinário no combate e controle de uma variedade de doenças infecciosas, conseqüentemente, aqueles metabólitos secundários identificados como antibióticos têm sido considerados detentores de um papel interessante no âmbito da saúde pública, por apresentar perspectivas de reduzir as taxas de morbidade da população, e na natureza, por exemplo, proporcionando um crescimento seletivo ao organismo, para que este possa competir com outros em ambientes particulares (Kitouni et al. 2005; Boudejella et al. 2006).

#### **6.5. Atividade citotóxica dos extratos crus**

Considerando-se os valores de dosagem letal média ( $DL_{50}$ ) encontrados neste estudo, constatamos que somente o extrato (ECL) obtido do isolado PEG3 apresentou citotoxicidade em baixa concentração, o que inviabiliza o seu uso como antibiótico, porém sugere que este extrato possua substâncias com potencial atividade antineoplásica.

As variações nos valores obtidos de  $DL_{50}$  para ambos os extratos crus (ECL e ECS) obtidos dos mesmos microrganismos pode ser justificada considerando-se as diferentes metodologias de cultivo para obtenção dos extratos, além do fato de que estes extratos encontram-se em um estado ainda não purificado e as substâncias, ainda não identificadas, presentes nestes extratos podem estar influenciando nestes resultados.

Confrontando os dados obtidos para ambos os extratos crus (ECL e ECS) constata-se que o ECL dos isolados RKX3, RKX13 e RKF3 foram os que apresentam melhores resultados com maior atividade antimicrobiana, bem como uma baixa citotoxicidade. Estes dados são bastante promissores nesta etapa preliminar de busca de substâncias antibióticas, tendo em vista que, pelo princípio de toxicidade seletiva, um antimicrobiano ideal deve ser tóxico para o patógeno, sem, contudo, ser tóxico para a célula hospedeira (Amato Neto et al. 2000).

A metodologia que utiliza *Artemia salina* para determinar os efeitos citotóxicos de extratos tem sido bastante utilizada nos mais diversos campos de pesquisa como método alternativo para uso de animais de laboratório. Parra et al. (2001) realizaram um estudo para comparar os valores de dosagem letal (DL<sub>50</sub>) obtidos pela metodologia utilizando *A. salina*, com as concentrações letais (CL<sub>50</sub>) encontradas ao utilizar animais de laboratório. Na pesquisa os autores determinaram os valores de citotoxicidade para extratos de 20 plantas diferentes, encontrando uma boa correlação entre os dados fornecidos pelas duas metodologias ( $r=0.85$   $p<0,05$ ) e sugerem *A. salina* como uma importante ferramenta, cuja metodologia é rápida, simples e prática, além de apresentar um baixo custo e permitir a avaliação de um grande número de amostras ao mesmo tempo. Todavia esta metodologia não permite uma elucidação do mecanismo de ação da substância bioativa e nem fornece informações sobre as estruturas afetadas pela molécula bioativa, funcionando apenas como uma triagem citotóxica inicial (Krishnaraju et al. 2005).

Apesar das dificuldades enfrentadas pelos projetos de pesquisa que visam a descoberta de novos produtos naturais, atualmente a pressão por novas moléculas com diferentes mecanismos de ação e baixa toxicidade justifica esforços científicos no sentido de se identificar microrganismos potenciais produtores de antibióticos. Estes microrganismos no futuro poderão ser estudados de forma detalhada e seus compostos isolados, purificados, caracterizados e sintetizados.

## **6.6. Intercalação dos extratos na molécula de DNA**

A atividade antimicrobiana é muito utilizada nos laboratórios como um dos testes primários dentro de programas de triagem de novas moléculas antitumorais. Porém, estes ensaios não reproduzem a real atividade biológica destas moléculas como antitumorais, o que levou à criação do método de gel *shift* que avalia alterações na migração de uma amostra de DNA no gel de agarose. A técnica é extremamente útil, rápida, de baixo-custo e apresenta uma grande confiabilidade (Furlan 2002).

Em nosso estudo os extratos crus obtidos dos isolados RKX3 e RKX13 apresentaram capacidade de intercalação, o que pode ser observado devido à diferença significativa de deslocamento do DNA quando associado ao antibiótico produzido por ambos os isolados, em

comparação aos controles. O isolado RKF8 também apresentou capacidade de intercalar-se na molécula de DNA, mas o resultado não foi tão expressivo como o observado para RKX3 e RKX13, além do fato de que RKF8 apresentou uma grande instabilidade genética quanto ao seu crescimento e produção de metabólitos secundários.

Os resultados obtidos para os isolados RKX3 e RKX13 são vistos com bastante entusiasmo já que caracterizam os microrganismos como produtores de moléculas antibióticas, com baixa citotoxicidade, elevado potencial como agentes antitumorais e excelentes candidatos para testes futuros sobre atividade antineoplásica utilizando culturas de tecidos. Estes isolados serão identificados utilizando o sequenciamento do DNA ribossomal 16S para caracterizar a espécie.

O isolado PEG3, apesar dos resultados prévios da elevada citotoxicidade, não demonstrou intercalar-se na molécula de DNA. Tais informações sugerem que este isolado deve apresentar outro mecanismo de ação de atividade antitumoral que não a intercalação na molécula de DNA.

No Brasil, pesquisas quanto à produção e otimização de antineoplásicos a partir de actinomicetos vêm sendo desenvolvidas desde o ano de 1960, quando a equipe do departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco isolou várias linhagens de *Streptomyces* produtoras de antibióticos antracíclicos. Dentre elas, a linhagem *S. olindensis* DAUFPE 5622 destacou-se pela produção do antibiótico retamicina, uma nova molécula de antraciclina com atividade antimicrobiana e elevado potencial como agente antitumoral (Gonçalves de Lima et al. 1969). Este microrganismo vem sendo exaustivamente analisado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, de onde foi obtido um mutante denominado So20 que apresenta maior estabilidade e aumento na produção do antibiótico. A partir desta linhagem mutante a equipe está desenvolvendo estudos sobre os genes de biossíntese da retamicina, os fatores que influenciam a produção do antibiótico, a purificação do metabólito e o modo de ação das moléculas (Furlan 2002).

Tendo em vista o número restrito de produtos disponíveis no mercado e de pesquisas desenvolvidas, além da detecção de resistência apresentada por linhagens celulares a alguns quimioterápicos faz-se necessário um grande investimento na promoção de saúde e de pesquisas para ampliar as opções terapêuticas no campo de antineoplásicos. Segundo Strohl et al. (1997) cerca de 2.000 drogas já foram isoladas, mas poucas são comercializadas. Diante disso, é possível considerar que a busca por moléculas antitumorais é um campo promissor,

seja por triagem de novos produtores e/ou através de modificações químicas ou por técnicas de biologia molecular combinando genes biossintéticos de diferentes organismos produtores. Os esforços em conseguir essas novas drogas estão concentrados na procura de moléculas que apresentem estruturas químicas com baixa toxicidade às células normais e, que, as células tumorais não sejam capazes de desenvolver resistência.

Não podemos nos esquecer que a era antimicrobiana iniciou-se há somente 60 anos, e que existe toda uma história de sucesso envolvendo a descoberta de novas substâncias provenientes de uma rica fonte de diversidade biológica advinda do meio ambiente. Os microrganismos e nossas próprias células desafiam a medicina todos os dias, seja promovendo infecção ou gerando neoplasias, portanto a pesquisa constante por novas moléculas é necessária para não deixarmos obsoleto o nosso arsenal de possibilidades frente aos desafios biológicos.

## **7. CONCLUSÕES**

## **7. Conclusões**

- ✓ Neste estudo ficou caracterizada a presença de actinomicetos nas amostras de solos de Cerrado e Mata Atlântica analisadas, sendo que de um total de 50 isolados, 7 (14,0%) apresentaram atividade antimicrobiana frente a MRSA, de forma que os melhores resultados de inibição foram observados para RKX3, RKX13 e RKF3;
- ✓ Os solos de Cerrado apresentaram um considerável número de isolados, bem como maior número de actinomicetos com atividade antimicrobiana com atuação frente aos MRSA;
- ✓ O ágar AC apresentou-se como o melhor meio de cultivo que potencializou uma maior quantidade de massa micelial, bem como uma maior produção de metabólitos secundários, resultando em uma melhor atividade antimicrobiana pela maioria dos isolados;
- ✓ Apenas o produto de fermentação (extrato cru) do isolado PEG3 apresentou citotoxicidade em baixa concentração, o que torna este isolado inviável para a produção de antibióticos, mas para os demais, não foi observada atividade citotóxica por este método;
- ✓ Os isolados RKX3 e RKX13 apresentaram-se como microrganismos promissores, tendo em vista uma grande atividade antibiótica frente aos MRSA, baixa citotoxicidade, bem como uma provável atividade antitumoral, devido à comprovada ação intercalante no DNA.



## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## **8. Referências Bibliográficas** \*

1. Addae-Kyereme J, Croft SL, Kendrick H, Wright CW 2001. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*: *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *J Ethnoph* 76: 99-103.
2. Alexander M 1961. *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley and Sons (eds.), New York, 472 pp.
3. Alexander M 1977. Microbial ecology. In John Wiley and Sons (eds.), *Introduction to Soil Microbiology*, Krieger Pub Co, New York. p. 36-51.
4. Amann RI, Ludwig W, Schneider KH 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *FEMS Microbiol Rev* 59: 143-169.
5. Amato Neto V, Levi GC, Lopes HV, Mendonça JS, Baldy JLS 2000. *Antibióticos na Prática Médica*, 5ª ed., Editora Roca, São Paulo, 304 pp.
6. Anazawa TA, Manfio GP 1997. *Quimiotaxonomia de actinomicetos. Protocolos de prática*. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, 17 pp.
7. Arbutnott JP, Coleman DC, Azevedo JS 1990. Staphylococcal toxins in human disease. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 19: 101S-107S.
8. Archer GL 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. *Clin Infect Dis* 26: 1179-1181.
9. Arias AR, Ferro E, Inchausti A, Ascura M, Ascota N, Rodrigues E, Fournet A 1995. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan *Asteraceae*. *J Entomoph* 45: 35-41.
10. Asensio A, Guerrero A, Quereda C, Lizian M, Martinez-Ferrer M 1996. Colonization and infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: associated factors and eradication. *Infect Control Hosp Epidemiol* 17: 20-20.
11. Badawey S, Kappe T 1997. Potencial antineoplásticos. Synthesis and cytotoxicity of certain 4-chloro-3-(2-chloroethyl)-2-methylquinolines and related derivatives. *Eu J Med Chem* 32: 815-822.
12. Bannerman TL 2003. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray PM, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds.), *Manual of clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> ed., ASM Press, Washington D.C. p. 384-404.
13. Barret FF, McGehee RF, Finland M 1968. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital - bacteriologic and epidemiologic observations. *N Engl J Med* 279: 441- 448.

---

\* As referências foram transcritas de acordo com as normas adotadas pelo periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/mioc/pinstruc.htm>

14. Basílio A, González I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, González A, Genilloud O 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95: 814-823.
15. Bax RP, Anderson R, Crew J, Fletcher P, Johnson T, Kaplan E, Knaus B, Dristinsson K, Malek M, Strandberg L 1998. Antibiotic resistance – what can we do? *Nat Med* 4: 545-546.
16. Beaman BL 1984. Actinomycete pathogenesis. In Goodfellow M, Mordarski M and Williams ST (eds.), *The Biology of the Actinomycetes*, Academic Press, London. p. 457-459.
17. Bentley SD, Parkhill J 2004. Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu Rev Genet* 38: 771-791.
18. Betriu C, Redondo M, Boloix A, Gómez M, Culebras E, Picazo JJ 2001. Comparative activity of linezolid and other new agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and teicoplanin-intermediate coagulase-negative staphylococci. *J Ant Chem* 48: 911-913.
19. Bibb M 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142: 1335-1344.
20. Bland CE, Couch JN 1981. The family Actinoplanaceae. In Starr MP (ed.), *The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, vol. 2, Springer-Verlag, New York, p. 2004- 2010.
21. Blizzard TA, Ruby CL, Mrozik H, Preizer FA, Fisher MH 1989. Brine shrimp (*Artemia salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. *J Antibiot* 62: 1304-1307.
22. Bolyard EA, Tablan OC, Williams WW, Pearson ML, Shapiro CN, Deitchman SD 1998. Guideline for infection control in healthcare personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 19: 410-468.
23. Boudejella H, Bouti K, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res* 161: 288-298.
24. Boudemagh A, Kitouni M, Boughachiche F, Hamdiken H, Oulmi L, Reghioia S, Zerizer H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P 2005. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, El-oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Mycol Med* 15: 39-44.
25. Boyce JM 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology and preventive measures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 13: 725-737.
26. Boyce JM 1998. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? *JAMA* 279: 623-624.
27. Bryder L 2002. Pioneers in medicine and their impact on tuberculosis. *Med His* 46: 294-295.

28. Buescher ES 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatrics. *Curr Opin Pediatr* 17: 67-70.
29. Bukharie HA, Abdelhadi MS, Saeed IA, Rubaish AM, Larbi EB 2001. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 40: 1-4.
30. Bull AT, Goodfellow M, Slater JH 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Ann Rev Microbiol* 46: 219-252.
31. Bull AT, Ward AC, Goodfellow 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 573-606.
32. Buratowski S, Chodosh LA 1996. 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.), New York. p. 12.2.1-12.2.8.
33. Burman NP 1973. The occurrence and significance of actinomycetes in water supply. In Sykes G and Skinner FA (eds.), *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*, Academic Press, London. p. 219-229.
34. Bush K 2004a. Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clin Microbiol Infect* 10: 10-17.
35. Bush K 2004b. Why it is important to continue antibacterial drug discovery. *ASM News* 70: 282-286.
36. Bush K, Macielag M 2000. New approaches in the treatment of bacterial infections. *Curr Opin Cehm Biol* 4: 433-439.
37. Bystrikh LV, Fernandez-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L 1996. Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 178: 2238-2244.
38. Cameron RE 1971. Antarctic soil microbial and ecological investigations. In Quam LO and Porter HD (eds.), *Research in the Antarctic*, American Association for the Advancement of Science, Washington. p. 137-190.
39. Caporale LH 1995. Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 75-82.
40. Cardoso JL 2005. Prevalência e Tipagem Molecular de *Staphylococcus aureus* Isolados da Nasofaringe de Crianças no Município de Goiânia-GO, Dissertação de Mestrado, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 137pp.
41. CDC – Centers for Disease Control and Prevention 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48: 707-710.
42. CDC – Centers for Disease Control and Prevention 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection among competitive sports participants – Colorado, Indiana, Pennsylvania and Los Angeles County 2000-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 22: 793-795.

43. Chambers HF 1988. Methicillin-resistant Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 1: 173-186.
44. Chambers HF 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10: 781-791.
45. Chambers HF 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emer Infect Dis* 7: 178-182.
46. Chambers HF 2003. Antimicrobianos. In Gilman AG, Hardman JG e Limbird LE (eds.), *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, McGraw-Hill, Rio de Janeiro. p. 859-876.
47. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistant gene. *N Engl J Med* 348: 1342-1347.
48. Chater KF 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet* 5: 372-377.
49. Chater KF 1992. Genetic regulation of secondary metabolic pathways in *Streptomyces*. In Chadwick DJ, Whelan J (eds.), *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, John Wiley & Sons, (Ciba Found Symp 171), Chichester. p. 144-162.
50. Chater KF 2001. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol* 4: 667-673.
51. Choudhary MI, Rahman AU 1997. Bioactivity-guided Phytochemicals from Medicinal Plants. *R Soc Chem Spec Publ* 200: 41-52.
52. Coates A, Hu Y, Bax R, Page C 2002. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov* 1: 895-910.
53. Coelho RRR 1976. *Ocorrência de Actinomicetos em Solos de Cerrado, Capazes de Utilizar Compostos Aromáticos*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Microbiologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 111 pp.
54. Coelho RRR, Drozdowicz AG 1978. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. *Rev Ecol Biol Sol* 15: 459-473.
55. Coelho RRR, Lopes A, Semêdo LTAS, Cruz FS 1995. Culture filtrates of actinomycetes isolated from tropical soils inhibit *Trypanosoma cruzi* replication *in vitro*. *Rev Microbiol* 26: 307-313.
56. Cohen ML 1986. *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr* 108: 796-799.
57. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente 1999. Diretrizes para a política de conservação e desenvolvimento sustentável da Mata Atlântica, CONAMA/MMA, Brasília, 43 pp.
58. Connell ND 2001. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr Opin Biotechnol* 12: 446-449.
59. Cooper EL 2004. Drug discovery, CAM and natural products. *Evid Based Complement Alternat Med* 1: 215-217.

60. Costa JPO 2006. *A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica*. Disponível em: <http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/meioamb/arprot/tombadas/resbiosf/index.htm>. Acesso em 04 de setembro de 2006.
61. Couto I, Wu SW, Tomasz A, Lencastre H 2003. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. *J Bacteriol* 185: 645-653.
62. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9865-9870.
63. Cristino JM, Fernandes ML, Garcia T, Serrano N, Salgado MJ 1999. Diversidade de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados num hospital de Lisboa num período de quatro anos. *Acta Med Port* 12: 169-176.
64. Czukas Z, Toro K, Jankovics I, Rozgonyi F, Sotonyi P 2001. Detection and toxin production of *Staphylococcus aureus* in sudden infant death cases in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 48: 129-141.
65. da Silva CMV, Silva-Carvalho MC, Wisplinghoff H, Hall GO, Tallent S, Wallace S, Edmond MB, Figueiredo AM, Wenzel RP 2003. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of United States. *J Hosp Infect* 53: 103-110.
66. Dauwalder O, Thomas D, Ferry T, Debard AL, Badiou C, VAndenesch F, Etienne J, Lina G, Monneret G 2006. Comparative inflammatory properties of staphylococcal superantigenic enterotoxins SEA and SEG: implications for septic shock. *J Leukoc Biol* 80: 1-6.
67. Davies FL, Williams ST 1970. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. I - The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biol Biochem* 2: 227-238
68. Davis J 1992. Introduction. In Chadwick DJ, Whelan J (eds.), *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, John Wiley & Sons, (Ciba Found Symp 171), Chichester. p. 1-2
69. Debia EA, Schito GC, Zoratti A, Gualco L, Tonoli E, Marchese A 2001. Epidemiology of major respiratory pathogens. *J Chemoter* 1: 205-210.
70. Demain AL 1989. Functions of secondary metabolites. In Hershberger CL, Queener SW and Hegeman G (eds), *Genetic and Molecular Biology of industrial microorganisms*, American Society for Microbiology, Washington. p. 1-11.
71. Demain AL 1992. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In Chadwick DJ, Whelan J (eds.), *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, John Wiley & Sons, (Ciba Found Symp 171), Chichester. p. 3-23.
72. Demain AL 1995. Why do microorganisms produce antimicrobials? Fifty years of antimicrobials: past, perspectives and future trends. Hunter PA, Darby GK and Russell NJ

- (eds), Society of General Microbiology, Cambridge University Press, New York. p. 205-228.
73. Demain AL 2002. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. *Nat Biotechnol* 20: 331.
  74. Demain AL, Fang A 1995. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetol* 9: 98-117.
  75. Demain AL, Fang A 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 69: 1-39.
  76. De-Souza MT 2003. 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.
  77. Dietrich DW, Auld DB, Mermel LA 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southern New England children. *Pediatr* 113: 347-352.
  78. Dietz A, Mathews J 1971. Classification of *Streptomyces* spore surface into five groups. *Appl Microbiol* 21:527-533.
  79. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13: 16-34.
  80. Donadio S, Carrano L, Brandi L, Serina S, Soffientini A, Raimondi E, Montanini N, Sosio M, Gualerzi CO 2002a. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. *J of Biotechnol* 99: 175-185.
  81. Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Sosio M, Publia AM 2002b. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J Biotechnol* 99: 187-198.
  82. Doull JL, Vining LC 1990. Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some underlying control mechanisms. *Biotech Adv* 8: 141-158.
  83. Duangmal K, Ward AC, Goodfellow M 2005. Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceoruber* clade from soil. *FEMS Microbiol Lett* 245: 321-327.
  84. Duke SO, Dayan FE, Romagni JG, Rimando AM 2000. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Res* 40: 99-111.
  85. Duke SO, Dayan FF, Rimando AM, Schracker KK, Aliota G, Oliva A, Romagni JG 2002. Chemicals from nature for weed management. *Weed Sci* 50: 138-151.
  86. El-Sersy NA, Abou-Elela GM 2006. Antagonistic effect of marine *Nocardia brasiliensis* against the fish pathogen *Vibrio damsela*. *Int J Oceans Oceanograph* 1: 141-150.
  87. El-Tarabily KA, Sivasithamparam K 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* 38: 1505-1520.
  88. Embley TM, Stackebrandt E 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 48: 257-289.

89. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7687-7692.
90. Ensign JC 1978. Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Ann Rev Microbiol* 32: 185-219.
91. Euzéby JP 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int J Syst Bacteriol* 47: 590-592.
92. Felske A, Rheims H, Wolternick A, Strackebrandt E, Akkermans AD 1997. Ribosome analysis reveals proeminent activity of an uncultured member of class *Actinobacteria* in grassland soils. *Microbiology* 143: 2983-2989.
93. Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ 2003. *Antibiotic and Chemotherapy: Anti-infective Agents and Their Use in the Therapy*, 8<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 1000 pp.
94. Flint EA, Di Menna ME, Stout JD 1973. The microbiology of eight soils sampled on an transect from the west to east in north Chile. *Rev Ecol Biol Sol* 10:475-493.
95. Fluit ADC, Visser MR, Schmitz FJ 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 14: 836-871.
96. Fundação SOS Mata Atlântica 2006. *Atlas Mata Atlântica*. Disponível em: <http://www.sosmataatlantica.org.br/?secao=atlas>. Acesso em 25 de outubro de 2006.
97. Furlan RLA 1997. *Obtenção e Estudo de Mutantes com Produção Alterada do Antibiótico Retamicina sintetizado por Streptomyces olindensis DAUFPE5622*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 76 pp.
98. Furlan RLA 2002. *O Antitumoral Retamicina: Produção e Efeitos Biológicos*. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 102 pp.
99. Gad SC, Chengelis CP 1995. Human health products: drugs and medical devices. In Chengelis CP, Holson JF and Gad SC (eds.), *Regulatory Toxicology*, Raven Press Ltd, New York. p. 9-49.
100. Gerber NN, Lechevalier HA 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl Microbiol* 13: 935-938.
101. Gilbert DN 1987. Guidelines for evaluating new antimicrobial agents. *J Infect Dis* 156: 934-941.
102. Gomes RC, Semedo LTAS, Soares RMA, Linhares LF, Ulhoa CJ, Alviano CS, Coelho RRR 2001. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *J Appl Microbiol* 90: 653-661.
103. Gonçalves de Lima O, Lyra FDA, Albuquerque MMF, Maciel GM, Coelho JSB 1969. Primeiras observações sobre o complexo antibiótico antitumoral – retamicina – produzido pelo *Streptomyces olindensis* nov. sp. IAUPE. *Rev Inst Antib* 9: 27-38.



104. Gonella ALPF 2003. *Bioatividade de Substâncias Produzidas por Actinoplanetes sp. Isolados de três Biomas Brasileiros*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 40 pp.
105. Goodfellow M, Cross T 1984. Classification. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *The Biology of the Actinomycetes*, Academic Press, London. p. 7-164.
106. Goodfellow M, Williams ST 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 37: 189-216.
107. Goodfellow M, Williams ST, Mordaski M 1984. Introduction to and importance of actinomycetes. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, London. p. 1-6.
108. Goodfellow M, Williams ST, Mordaski M 1988. *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), Academic Press, London, 578 pp.
109. Gootz TD 1990. Discovery and development of new antimicrobial agent. *Clin Microbiol Rev* 3: 13-31.
110. Gottlieb D 1973. General considerations and implications of the *Actinomycetales*. In Sykes G and Skinner FA (eds.), *Actinomycetales: characteristics and practical importance*, Academic Press, London. p. 1-9.
111. Gottlieb D 1976. The production and role of antibiotics in soil. *J Antibiot* 29: 887-1000.
112. Gould D, Chamberlaine A 1995. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. *J Clin Nurs* 4: 4-12.
113. Granozzi C, Bileta R, Passantino R, Sollazzo M, Puglia AM 1990. A breakdown in macromolecular synthesis preseding differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* 136: 713-716.
114. Grigorevski-Lima AL, Silva-Filho RG, Linhares LF, Coelho RRR 2006. Occurrence of actinomycetes in indoor air in Rio de Janeiro, Brazil. *Build Environ* 41: 1540-1543.
115. Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS 2001. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA* 286: 1201-1205.
116. Gutiérrez-Lugo MT, Essayang RM 2003. El género *Actinomadura* como una fuente de principios biodinâmicos de interes medicinal y agroquímico. Disponível em [http:// biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap14](http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap14). Acesso em 27 de agosto de 2006.
117. Hackl E, Pfeffer M, Donat C, Bachmann G, Zechmeister-Boltenstern S 2005. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil Biol Biochem* 37: 661-671.
118. Hackl E, Zechmeister-Boltenstern S, Bodrossy L, Sessitsch A 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl Environ Microbiol* 70: 5057-5065.
119. Hagedorn C 1976. Influence of soil acidity on *Streptomyces* population inhabiting forest soils. *Appl Environ Microbiol* 32: 368-375.

120. Hamaki T, Suzuki M, Fudou R, Jojima Y, Kajiura T, Tabuchi A, Sen K, Shibai H 2005. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng* 5: 485-492.
121. Hare R 1983. The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of penicillin. *Med His* 27: 347-372.
122. Hartl M, Humpf HU 2000. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food Chem Toxicol* 38: 1097-1102.
123. Harvey AL 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today* 5: 294-300.
124. Harvey AL, Best AM, Chambliss WG 2002. Natural product pharmaceuticals: a diverse approach to drug discovery. *J Biomol Screen* 7: 303.
125. Hayakawa M, Tamura T, Nonomura H 1991. Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using  $\gamma$ -collidine as the chemoattractant. *J Ferment Bioeng* 72: 426-432.
126. He JY, Vining LC, White RL, Horton KL, Doull JL 1995. Nutrients effects on growth and armentomycin production in cultures of *Streptomyces armentosus*. *Can J Microbiol* 41: 186-193.
127. Heatley NG 1984. Alexander Fleming: The man and the myth. *Med Hist* 28: 453:455.
128. Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* 63: 3233-3241.
129. Higgins ML 1967. Releasing of sporangiospores by a strain of *Actinoplanes*. *J Bacteriol* 94: 495-498.
130. Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamanoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, Baba T, Terasawa M, Sotozono C, Kinoshita S, Yamashiro Y, Hiramatsu K 2005. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy japanese children. *J Clin Microbiol* 43: 3364-3372.
131. Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Flett F, Oliver SG 1990. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and influence of nutrients. *J Gen Microbiol* 136: 2291-2296.
132. Höfling E 2006. Floresta Atlântica. Disponível em: <http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/meioamb/ecossist/atlantic/indexhtm>. Acesso em 15 de agosto de 2006.
133. Hollick G 1995. Isolation and identification of aerobic actinomycetes. *Clin Microbiol Newslett* 17: 25-29.
134. Holmalahti J, Von Wright A, Raatikainen O 1994. Variation in the spectra of biological activities of actinomycetes isolated from different soils. *Lett Appl Microbiol* 18: 144-146.

135. Holmes DS, Quigley M 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.
136. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed., Williams and Wilkins (eds.), Baltimore, 2418 pp.
137. Hopkins DW, Macnaughton SJ, O'donnell AG 1991. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. *Soil Biol Biochem* 23: 217-225.
138. Hopmann C, Kurz M, Brönstrup M, Wink J, LeBeller D 2002. Isolation and structure elucidation of vancoremycin – a new antibiotic from *Amycolaptosis* sp. ST 101170. *Tetrahedron Lett* 23: 435-438.
139. Hopwood DA, Merrick MJ 1977. Genetics of antibiotic production. *Bacteriol Rev* 41: 595-635.
140. Hopwood DA, Sherman DH 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acids biosynthesis. *Annu Rev Genet* 24: 37-66.
141. Hortobágyi GN 1997. Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs* 54: 1-7.
142. Hosein IK, Hill DW, Jenkins LE, Magee JT 2002. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 31: 90S-97S.
143. Hungria M, Vargas MAT 1997. *Biologia dos Solos do Cerrado*. Embrapa – CPAC, Planaltina, 524 pp.
144. Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV 1997. *Manual of Environmental Microbiology*, 1<sup>st</sup> ed., ASM Press, Washington D.C, 1464 pp.
145. Hutchinson CR, Fujii I 1995. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 49: 201-238.
146. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2004. Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias /noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias /noticia_visualiza.php?id_noticia=169&id_pagina=1). Acesso em 13 de outubro de 2006.
147. ICH – International Conference on Harmonization 1997. *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 06 de dezembro de 2006.
148. INCA – Instituto Nacional do Câncer 2006. *A situação do câncer no Brasil*. Mendonça GAS, Noronha CP, Almeida LM (orgs.), 116p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos>. Acesso em 07 de dezembro de 2006.
149. Inoue M, Suzuki T, Fujita Y, Oda M, Matsumoto N, Yamase T 2006. Enhancement of antibacterial activity of  $\beta$ -lactam antibiotics by  $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ ,  $[SiMo_{12}O_{40}]^{4-}$ , and  $[PTi_2W_{10}O_{40}]^{7-}$  against methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Inorg Biochem* 100: 1225-1233.
150. Ishizawa S, Araragi M, Suzuki T 1968. Actinomycete flora of japanese soils. *Trans. 9<sup>th</sup> Internat Cong Soil Sci.*, Adelaide, 3: 465-472.

151. Ishizawa S, Araragi M, Suzuki T 1969. Actinomicete flora of japanese soils. II – Seasonal change of actinomycete flora. On the basis of morphological and cultural characteres. *Soil Sci Plant Nutrit* 15: 56-66.
152. Ishizawa S, Araragi M, Suzuki T 1971. Actinomycete flora of japanese soils. V – Vertical change of actinomycete flora. On the basis of morphological, cultural & biochemical characters. *Soil Sci Plant Nutri* 17: 68-74.
153. Ito T, Okuma Y, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updates* 6: 41-52.
154. Iwai Y, Takahashi Y 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In Omura S (ed.), *The search for bioactive compounds from microorganisms*, Springer-Verlag, New York. p. 281-302.
155. James PDA, Edwards C 1989. The effects of temperature and growth and production of the antibiotic granticin by a thermotolerant streptomycete. *J Gen Microbiol* 135: 1997-2003.
156. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 70: 631-641.
157. Jessen O, Rosendal K, Bulow P, Faber V, Eriksen KR 1969. Changing staphylococci and staphylococcal infections. A ten-year study of bacteria and cases of bacteremia. *N Eng J Med* 281: 627-635.
158. Jevons MP 1961. Celbenin-resistant staphylococci. *British Med J* 1: 124-125.
159. Jiménez G, Hasegawa M, Rodriguez M, Estrada O, Mendes J, Castillo A, Gonzales-Mujica F, Motta N, Vásquez J, Romero-Vecchione E 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *J Ethnoph* 77: 77-83.
160. Johnson AP, Uttley AHC, Woodford N, George RC 1990. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin Microbiol Rev* 3: 280-291.
161. Johnston NE, Rusche B 1997. *Ethics committees: how do they contribute to the Three Rs?* Synopsis of the workshop: Animal Alternative, Welfare and Ethics. Van Zutphen LFM and M Balls (eds.), Elsevier Developments in animal and Veterinary Sciences, p. 391-395.
162. Jung HM, Kin SY, Hyun HH, Lee JK 2002.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  supplementation augments vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*. *Biotechnol Lett* 24: 293-296.
163. Jurbeg C, Gouveia ME, Belisário C 2006. Na mira do câncer: o papel da mídia brasileira. *Rev Bras Cancerol* 52: 139-146.
164. Keast D, Rowe P, Sanfelieu L, Shannahan J, Bowra B, Skates S, Stapley EO, Woodruff HB 1984. Use of a computer to group actinomycetes for studies on the ecology of soil microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 48: 791-796.
165. Khan MR, Willians ST 1975. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VIII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil Biol Biochem* 7: 345-348.

166. Kim MN, Hwang SH, Pyo YJ, Mun PCH 2002. Clonal spread of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a university hospital in Korea. *J Clin Microbiol* 40: 1376-1380.
167. Kinashi H, Shimaji-Murayama M 1991. Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J of Bacteriol* 173: 1523-1529.
168. Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioua S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark sample of the north-east of Algeria. *J Mycol Med* 15: 45-51.
169. Kloss WE 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In Crossley KB and Archer GL (eds.), *The staphylococci in human disease*, Churchill Livingstone, New York. p. 113-138.
170. Kloss WE, Bannerman TL 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover RH (eds.), *Manual of Clinical Microbiology* 7<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington. p. 264-282.
171. Kluytmans A, Belkum A, Verbrugh H 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10: 505-520.
172. Koehn FE, Carter GT 2006. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature* 4: 206-220.
173. Koifman S, Koifman R 2003. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutation Research* 544: 305-311.
174. Korn-Wendisch F, Kutzner HJ 1992. The family *Streptomycetaceae*. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W and Schliefer KH (eds.), *The Prokaryotes*, vol 1, 2<sup>nd</sup> ed., Springer-Verlag. p. 921-995.
175. Korn-Wendisch F, Schneider J 1992. Phage typing – a useful tool in actinomycete systematics. *Gene* 115: 243-247.
176. Kowalski LP, Franco EL 1991. Epidemiologia do câncer no Brasil e no mundo. In Schwartzmann G (ed.), *Oncologia Clínica: Princípios e Práticas*, Artes Médicas, Porto Alegre. p. 19-30.
177. Kraljevic S, Stambrook PJ, Pavelic K 2004. Accelerating drug discovery. *EMBO Rep* 5: 837-842.
178. Krishnaraju AV, Rao TVN, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay HS, Subbaraju G 2005. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Int J Appl Sci Eng* 3: 125-134.
179. Kurylowicz W, Gauze GF, Parzlewicz A, Proebrazhenskaya TP, Wogewodzka I, Maximova TS, Voznicka W, Brzosko W, Malinowski K, Williams ST 1971. *Atlas of spore of selected genera and species of Streptomycetaceae*, University Park Press, Baltimore, 112pp.
180. Küster E 1967. The Actinomycetes. In Burges A and Raw F (eds.), *Soil Biology*, Academic Press, London. p. 111-124.

181. Küster E, Williams ST 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* 202: 928-929.
182. Labeda DP 1992. DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. *Gene* 115: 249-253.
183. Labeda DP, Shearer MC 1990. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In Labeda DP (ed.), *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*, McGraw-Hill Publishing Company, New York. p. 1-19.
184. Lacey 1973. Actinomycetes in soils, composts and fodders. In Sykes G and Skinner FA (eds.), *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*, Academic Press, London. p. 231-246.
185. Lacey J 1988. Actinomycetes as biodeteriogens and pollutants of the environment. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London. p. 359-432.
186. Langham CD, Williams ST, Sneath PHA, Mortimer AM 1989. New probability matrices for identification of *Streptomyces*. *J Gen Microbiol* 135: 121-133.
187. Le Loir Y, Baron F, Gautier M 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen Mol Res* 2: 63-76.
188. Le Roes M, Meyers PR 2005. *Streptomyces pharetrae* sp. nov., isolated from soil from the semi-arid Karoo region. *Syst Appl Microbiol* 28: 488-493.
189. Leblond P, Decaris B 1994. New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 123: 223-232.
190. Leblond P, Redenbach M, Cullum J 1993. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 175: 3422-3429.
191. Lechevalier HA 1989. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In Williams ST, Sharpe ME and Holt JG (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4, Williams and Wilkins, Baltimore. p. 2344-2347.
192. Lechevalier HA, Lechevalier MP 1967. Biology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 21: 71-100.
193. Lechevalier HA, Lechevalier MP 1981. Introduction of the order *Actinomicetales*. In Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balow A and Schlegel HG (eds.), *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, vol. 2, Springer-Verlag, Berlin. p. 1915-2123.
194. Leitão AL, Enguita FJ, Martín JF 1997. Improved oxygen transfer in cultures of *Nocardia lactamdurans* maintains the cephamycin biosynthetic proteins for prolonged time and enhances the conversion of deacetylcephalosporin into cephamycin C. *J Biotechnol* 58: 39-50.
195. Levy CE 1996. Aspectos microbiológicos. In Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Alves Filho M, Grinbaum RS e Richman R (eds.), *Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle*, Editora Sarvier, São Paulo. p. 91-98.

196. Lewan L, Andersson M, Morales-Gomez P 1992. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *Altern Lab Anim* 20: 297-301.
197. Liesack W, Stackenbrandt E 1992. Occurrence of novel groups of the domain as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol* 174: 5072-5078.
198. Lilienfein JW, Vilela L, Ayarza MA, Lima S, Zech W 2003. Soil fertility under native Cerrado and Pasture in the Brazilian Savanna. *Soil Scien Societ* 67: 1195-1205.
199. Lindsay JA, Holden MTG 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol* 12: 378-385.
200. Liu C, Chambers HF 2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3040-3045.
201. Lloyd AB 1969. Dispersal of streptomycetes in air. *J Gen Microbiol* 57: 35-40.
202. Lowy FD 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Eng J MED* 339: 520-532.
203. Lowy FD 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111: 1265-1273.
204. Lyon BR, Skurray R 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* 51: 88-134.
205. Lyra FDA, Araújo JM, Lima OG, Andrade AL, Schumacker IE 1968. Estudos taxonômicos de três cepas de *Streptomyces*, produtoras de antibióticos do grupo das antraciclinas, portadoras de ação antitumoral. *Rev Inst Antib* 10: 560-562.
206. MacDonald RM 1986a. Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms by elutriation. *Soil Biol Biochem* 18: 399-406.
207. MacDonald RM 1986b. Sampling soil microfloras: optimization of density gradient centrifugation in Percoll to separate microorganisms from soil suspensions. *Soil Biol Biochem* 18: 407-410.
208. Malik VS 1980. Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem Sci* 5: 68-72.
209. Malik VS 1982. Genetics and biochemistry of secondary metabolism. *Adv Appl Microbiol* 28: 27-115.
210. Manfio GP 1995. Towards minimal standards for the description of *Streptomyces* species. Phd Thesis. Department of Microbiology, University of New Castle upon Tyne, United Kingdom, 468 pp.
211. Maplestone R, Stone MJ, Williams DH 1992. The evolutionary role of secondary metabolites – a review. *Gene* 115: 151-154.
212. Marangoni DV 1996. *Staphylococcus aureus*. In E. A. C. Rodrigues, J. S. Mendonça, J. M. B. Amarante, M. B. Alves Filho, R. S. Grinbaum & R. Richtmann (eds.), *Infecções Hospitalares – Prevenção e Controle*, Editora Sarvier, São Paulo. p. 573-591.

213. Martin JF, Demain AL 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* 44: 230-251.
214. Matthews PR, Reed KC, Stewart PR 1987. The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* 133: 1919-1929.
215. McCarthy AJ, Williams ST 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene* 115: 189-192.
216. McNeil MM, Bown JM 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 7: 357-417.
217. Melin P, Schnürer J, Wagner GH 1999. Changes in *Aspergillus nidulans* gene expression induced by bafilomycin, a *Streptomyces*-produced antibiotic. *Microbiology* 145: 1115-1122.
218. Mendes C, Salas JA 2001. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res Microbiol* 152: 341-350.
219. Mendes JF, dos Santos HL, Sans LMA, Bahia Filho AFC, Viana AC 1973. Informações sobre solos sob cerrado. *Cerrado* 5: 4-6.
220. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45: 31-34.
221. Meyer O, Svendsen O 2003. Animal models in pharmacology and toxicology. In Hau J and van Hoosier GL (eds.), *Handbook of Laboratory Animal Science*, 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press, Washington D.C. p. 11-37.
222. Michel M, Gutmann L 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. *Lancet* 349: 1901-1906.
223. Michelson S, Joho K 2000. Drug discovery, drug development and the emerging world of pharmacogenomics: prospecting for information in a data-rich landscape. *Curr Opin Mol Ther* 2: 651-654.
224. Minnikin DE, O'Donnell AG 1984. Actinomycete envelope lipid and peptidoglycan composition. In Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (eds.), *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, London. p. 337-387.
225. Miyake Y, Iwai T, Sugai M, Miura K, Suginaka H, Nagasaka N 1991. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children. *J Dent Res* 70: 1045-1047.
226. MMA - Ministério do Meio Ambiente 2001. *Agenda 21 Brasileira. Ações Prioritárias. Comissão de Políticas de Desenvolvimento Sustentável*, Brasília, 138 pp.
227. MMA - Ministério do Meio Ambiente 2002. *Política Nacional da Biodiversidade: Projeto Estratégia Nacional de Biodiversidade*, Brasília, 52 pp. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/reuniao/dir281/item5.doc>. Acesso em 14 de novembro de 2006.



228. MMA - Ministério do Meio Ambiente 2003. *Caderno de Debate e Sustentabilidade – Agenda 21. Mata Atlântica: o futuro é agora*, Brasília, 16 pp. Disponível em: <http://www.mma.gov.Br/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=18&idConteudo=604> Acesso em 13 de outubro de 2006.
229. MMA - Ministério do Meio Ambiente 2006. *Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado – Programa Cerrado Sustentável*. Núcleo dos Biomas Cerrado e Pantanal, Brasília, 56 pp.
230. Moellering RC 2003. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Ann Intern Med* 138: 135-142.
231. Moir DT, Karen JS, Hare RS, Vovis GF 1999. Genomics and antimicrobial drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 439-446.
232. Montelli CA, Sadatsune T 2001. *Antibioticoterapia para o clínico*. Sociedade Brasileira de Microbiologia SBM, Rio de Janeiro, 56pp.
233. Moraes MF 1997. *Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil*. Revista Brasileira de Cancerologia. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_43/v03/editorial.html](http://www.inca.gov.br/rbc/n_43/v03/editorial.html). Acesso em 07 de dezembro de 2006.
234. Moreillon P 1995. Bacterial resistance to antibiotics. *Schweiz Med Wochenschr* 125: 1151-1161.
235. Moreira FMS, Siqueira JO 2002. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Editora UFLA, Lavras, 262 pp.
236. Moreno-Murillo B, Fajardo VM, Suarez M 2001. Cytotoxic screening of some South American Solanaceae. *Fitoterapia* 72: 680-685.
237. Muller G, Forster I, Hickisch B 1971. On microbial activities at different adaphic factors. *Trans Inst Symp Humus et Planta V*, Prague 1: 137-146.
238. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH 1999. *Manual of Clinical Microbiology* 7<sup>th</sup> ed., American Society for Microbiology, Washington D.C. 1773 pp.
239. Nathwani D 2005. Tigecycline: clinical evidence and formulary positioning. *Int J Antimicrob Agents* 25: 185-192.
240. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards 2003. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests Approved Standards*. M2-A8. 8<sup>th</sup> ed.. Wayne, 31p.
241. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037.
242. Nicolaou KC, Snyder SA 2004. The essence of total synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11929-11936.
243. Nolan RD, Cross T 1988. Isolation and screening of actinomycetes. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London. p. 1-32.

244. O'Donnell AG 1988. Recognition of novel actinomycetes. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London. p. 69-85.
245. Okami Y, Hotta K 1988. Search and discovery of new antibiotics. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London. p. 33-58.
246. Oliveira DC, Tomasz A, De Lancastre H 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2: 180-189.
247. Omoto S, Shomura T, Suzuki K, Inouye S 1979. 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.
248. Omura S 1986. Philosophy of new drug discovery. *Microbiol Rev* 50: 259-279.
249. Orduña RM, Theobald U 2000. Intracellular glucose 6-phosphate content in *Streptomyces coelicolor* upon environmental changes in a defined medium. *J Biotechnol* 77: 209-218.
250. Oskay M, Tamer U, Azeri C 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol* 3: 441-446.
251. Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur J Soil Biol* 37: 69-74.
252. Overbye KM, Barret JF 2005. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov Today* 10: 45-52.
253. Palleroni NJ 1976a. Chamber for bacterial chemotaxis experiments. *Appl Environ Microbiol* 32: 729-730.
254. Palleroni NJ 1976b. Chemotaxis in *Actinoplanes*. *Arch Microbiol* 110:13-18.
255. Palleroni NJ 1980. A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*. *Arch Microbiol* 128: 53-55.
256. Pandey B, Prakash G, Agrawal VP 2004. 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.
257. Parenti F, Coronelli C 1979. Members of the genus *Actinoplanes* and their antibiotics. *Ann Rev Microbiol* 33: 389-411.
258. Parra AL, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8: 395-400.
259. Paul EA, Clark FE 1996. Components of the soil biota. In Paul EA and Clark FE (eds.), *Soil Microbiology and Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, San Diego. p. 69-107.
260. Peláez F 2006. The historical delievery of antibiotics from microbial natural products – can history repeat? *Biochem Pharmacol* 71: 981-990.

261. Pereira JC, Neves MCP, Drozdowicz A 1999a. Dinâmica das populações bacterianas em solos de Cerrados. *Pes Agropec Bras* 34:801-811.
262. Pereira JC, Neves MCP, Drozdowicz A 1999b. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. *Pesq Agropec Bras* 34: 99-108.
263. Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez-Álvarez S 2004. Tracking methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones during a 5-year period (1998 to 2002) in a Spanish hospital. *J Clin Microbiol* 42: 4649-4656.
264. Perkins JE 1965. The conquest of tuberculosis. *AM J Public Health Nations Health* 55: 2049.
265. Pezzuto JM, Beecher CWW, Fong HHS 1998. Recent studies on biologically active natural products. In Rahman AU, Choudhary MI (eds), *New trends in natural products chemistry*, Hardwod Acad Publ, Netherlands. p. 94-107.
266. Pimm SL, Russell GJ, Gittleman JL, Brooks TM 1995. The future of biodiversity. *Science* 269: 347-350.
267. Piret JM, Demain AL 1988. Actinomycetes in biotechnology: an overview. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London. p. 461-481.
268. Pollak FC, Berger RG 1996. Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. *Appl Environ Microbiol* 62: 1295-1299.
269. Pridham TG, Hesseltine CW, Benedict RG 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to selects groups. Placement of strains in morphological sections. *Appl Microbiol* 6: 52-79.
270. Projan SJ 2003. Why is big pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr Opin Microbiol* 6: 427-43.
271. Ramírez-Durán N, Ramírez-Saad H, Melgoza-Contreras LM, Sandoval H 2006. Amplification of the specific insertion in the rRNA 23S gene, as an criterion of purity in preparation of actinomycetes DNA. *J Medical Mycology* 16: 26-29.
272. Rammelkamp CH, Maxon T 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Royal Soc Exper Biol Med* 51: 386-389.
273. Ramsey AJ 1984. Extration of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonications as indicated by direct counts and autordiography. *Soil Biol Biochem* 16: 475-481.
274. Ranjard L, Poly F, Nazaret S 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol* 151: 167-177.
275. Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho C, Berquó L, Ferreira FA, Santos RNS, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. *J Clin Microbiol* 43: 1985-1988.

276. Richardson AD, Ireland CM 2004. A profile of the *in vitro* antitumor activity of lissoclinolide. *Toxicol Appl Pharmacol* 195: 55-61.
277. Rolf D 2004. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotechnol* 15: 199-204.
278. Ryotaro T, Selemmer M, Karki S, Wipple A, Levine Z 2006. *A microbial biorealm page on the genus Streptomyces*. Disponível em <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptomyces>. Acesso em 27 de agosto de 2006.
279. Sacramento DR, Coelho RRR, Wigg MD, Linhares LFTL, Santos, MGM, Sêmedo LTAS, Silva AJR 2004. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 225-229.
280. Safdar MDN, Maki DG 2002. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, Gram-negative bacilli, *Clostridium difficile* and *Candida*. *Ann Inter Med* 136: 834-844.
281. Sakula A 1991. Launching the antibiotic era: personal accounts of the discovery and use of the first antibiotics. *J R Soc Med* 84: 573-574.
282. Salas JA, Mendez C 1998. Genetic manipulation of antitumor-agent biosynthesis to produce novel drugs. *Trends Biotechnol* 16: 475-482.
283. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 37: 1313-1319.
284. Sanches-Fortun S, San-Barrera F, Barahona-Gomariz MV 1995. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. *Bull Environ Contam Toxicol* 54: 76-82.
285. Sanglier JJ, Haag H, Hucck TA, Fehr T 1993a. Novel bioactive compounds from actinomycetes (1988-1992). *Res Microbiol* 144: 633-642.
286. Sanglier JJ, Wellington EMH, Behal V, Fiedler HP, Ellouz GR, Finance C, Hacene M, Kamoun A, Kelly C, Mercer DK, Prinzis S, Trigo C 1993b. Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Res Microbiol* 144: 661-663.
287. Sanglier JJ, Whitehead D, Saddler GS, Ferguson EV, Goodfellow M 1992. Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. *Gene* 115: 235-242.
288. Sano SM, Almeida SP 1988. *Cerrado: Ambiente e Flora Planaltina*. Embrapa, Planaltina, 556 pp.
289. Santos AAM 2000. *Infecções por Gram-positivos: Tendências no Brasil e América Latina*. Simpósio Oxazolidinonas: uma nova classe de antibióticos após 35 anos. III Congresso Pan-Americano, VIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecções e Epidemiologia Hospitalar, p. 5-6.
290. Santos KRN, Teixeira LM, Leal GS, Fonseca LS, Filho PPG 1999. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factor associated with

- nosocomial acquisition in two Brazilian University hospitals. *J Med Microbiol* 48: 17-23.
291. Schwartzmann G, Moraes Filho MA, Silver R 1991. Princípios da quimioterapia antineoplásica. In Schwartzmann G (ed.), *Oncologia Clínica: Princípios e Prática*, Artes Médicas, Porto Alegre. p. 106-132.
  292. Sefton AM 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millenium. *Drugs* 62: 557-566.
  293. Senna JPM, Sukiennik TCT, Gottardo IR, de David SMM, Santos DS 1996. Identificação dos genes *mecA* e *femA* em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina/oxacilina isolados de pacientes da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. In: *V Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar*. Programa e Resumos. Associação Brasileira dos Profissionais em Controle de Infecções e Epidemiologia Hospitalar, Rio de Janeiro, p. 85.
  294. Serina S, Radice F, Maffioli S, Donadio S, Sosio M 2004. Glycopeptide resistance determinants from the teicoplanin producer *Actinoplanes teichomyceticus*. *FEMS Microbiol Lett* 240: 69-74.
  295. Shahin R, Johnson IL, Jamieson F, McGeer A, token J, Ford-Jones EL 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a child care center following a case of disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153: 864-868.
  296. Shirling EB, Gottlieb D 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313-340.
  297. Shittu AO, Lin J 2006. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect Dis* 6: 125.
  298. Shlaes DM, Projan SJ, Edwards-Jr JE 2004. Antibiotic discovery: state of the state. *ASM News* 70: 275-281.
  299. Shomura T, Yoshida J, Amano S, Inouye S, Niida T 1979. 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.
  300. Shukla SK 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its emerging virulence. *Clin Med Res* 3: 57-60.
  301. Sieradzki K, Leski T, Dick J, Borio LT 2003. Evolution of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain *in vivo*: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S. aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. *J Clin Microbiol* 41: 1687-1693.
  302. Skinner D, Keefer CS 1941. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med* 68: 851-875.
  303. Snodin DJ 2002. An EU perspective on the use of *in vitro* methods in regulatory pharmaceutical toxicology. *Toxicol Lett* 127: 161-168.
  304. Souza EC 1998. Bactérias ultra-resistentes. *Ciência hoje* 23: 27-35.

305. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM 2002. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 15: 430-438.
306. Steward CD, Stocker SA, Swenson JM, O'Hara CM, Edwards JR, Gaynes RP, McGowan Jr JE, Tenover FC 1999. Comparison of agar dilution, disk diffusion, MicroScan, and Vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluoroquinolone-resistant isolates of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 37: 544-547.
307. Stonard RJ, Wideman M 1995. Herbicides and plant growth regulators. In Godfrey CRA (ed.), *Agrochemicals from Natural Products*, Marcel Dekker Ltd., New York. p. 285-310.
308. Strohl WR, Dickens ML, Rajgarhia VB, Woo AJ, Priestley ND 1997. Antracyclines. In Strohl WR and Dekker M. (eds.), *Biotechnology of antibiotics*, Marcel Dekker Ltd., New York. p. 577-657.
309. Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF 2006. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 2-11.
310. Sujatha P, Bapi-Raju KVVS, Ramana T 2005. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* 160: 119-126.
311. Suput J, Lechevalier MP, Lechevalier HA 1967. Chemical composition of variants of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol* 15: 1356-1361.
312. Takahashi A, Kurasaw S, Ikeda D, Okami Y, Takeuchi T 1989. Altemicin, a new acaricidal and antitumor substance. *J Antibiot* 52: 1556-1561.
313. Takahashi Y, Matsumoto A, Senio A, Iwai Y, Omura S 1996. Rare actinomycetes isolated from desert soils. *Actinomycetol* 10: 91-97.
314. Takahashi Y, Omura S 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol* 49: 141-154.
315. Tavares W 2000. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 281-301.
316. Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56: 782-787.
317. Towner KJ, Talbot DCS, Curran R, Webster CA, Humphreys H 1998. Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 47: 607-613.
318. Trejo WH 1970. *Evaluation of some concepts and criteria used in the speciation of streptomycetes*. *Trans NY Acad Sci* 32: 989-997.
319. Tresner HD, Davies MC, Backus EJ 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J Bacteriol* 81: 70-80.
320. Tsen HY, Yu GK, Wang KC, Wang SJ, Chang MY, Lin LY 1998. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic syndrome toxin I (TSS-1) strains and antibiotic

- susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiol* 15: 33-41.
321. Turner WB 1973. Secondary metabolism with special reference to *Actinomycetales*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 2: 209-217.
  322. Ueda K, Umeyama T, Beppu T, Horinouchi S 1996. The aerial mycelium – defective phenotype of *Streptomyces griseus* resulting from A-factor deficiency is suppressed by a Ser/Thr kinase of *S. coelicolor* A3(2). *Gene* 169: 91-95.
  323. Umezawa H 1967. *Index of Antibiotics from Actinomycetes*, v.1, University of Tokyo, Tokyo, 940 pp.
  324. Umezawa H 1988. Low-molecular-weight enzyme inhibitors and immunomodifiers. In Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M (eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London. p. 285-325.
  325. Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 235: 196-205.
  326. Vanderlinde PB, Fegan N, Mills L, Desmarchelier PM 1999. Use of pulsed field gel electrophoresis for the epidemiological characterization of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from meat workers and beef carcasses. *Int J Food Microbiol* 48: 81-85.
  327. Vieira FCS, Nahas E 2005. Comparison of microbial numbers in soil by using various culture media and temperatures. *Microbiol Res* 160: 197-202.
  328. Vining LC 1990. Functions of secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 44: 395-427.
  329. Vining LC 1992a. Role of secondary metabolites from microbes. In Chadwick DJ, Whelan J (eds.), *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, John Wiley & Sons, (Ciba Found Symp 171), Chichester. p. 184-195.
  330. Vining LC 1992b. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity. *Gene* 115: 135-140.
  331. Vismara C 1998. Effects of methanol, ethanol and N-propanol on development of *Artemia salina* cysts. *Chemosphere* 37: 3027-3034.
  332. Visser SA, Banage WB 1973. Microorganisms and nematodes from some Uganda soils. *Rev Ecol Biol Sol* 10: 55-70.
  333. Vobis G 1997. Morphology of actinomycetes. In Miyadoh S, Hamada M, Hotta K, Kudo T, Seino A, Vobis G and Yokata A (eds.), *Atlas of Actinomycetes*, The Society for Actinomycetes, Japan. p. 180-191.
  334. Volff JN, Vandewiele D, Sinomet JM, Decaris B 1993. Ultraviolet light, mitomycin C and nitrous acid induce genetic instability in *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Mutat Res* 287: 141-156.
  335. Waenwright M 1987. The history of the therapeutic use of crude penicillin. *Med His* 31: 41-50.
  336. Waksman SA 1961. *The actinomycetes. Classification, Identification and Description of Genera and Species*, vol. 2. Williams and Wilkins (ed.), Baltimore, 327 pp.

337. Walsh CT 2004. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* 303: 1805-1810.
338. Wang J, Soisson SM, Young K, Shoop W, Kodali S, Galgoci A, Painter R, Parthasarathy G, Tang YS, Cummings R, Ha S, Dorso K, Motyl M, Jayasuriya H, Ondeyka J, Herath K, Zhang C, Hernandez L, Allocco J, Basilio A, Tormo JR, Genilloud O, Vicente F, Pelaéz F, Colwell L, Lee SH, Michael B, Felcetto T, Gill C, Silver LL, Hermes JD, Bartizal K, Barrett J, Schmatz D, Becker JW, Cully D, Singh SB 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441: 358-361.
339. Wang Y, Zhang ZS, Ruan JS, Wang YM, Ali SM 1999. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23: 178-187.
340. Watson J, Givney R, Pegler MB, Rose B, Merlino J, Vickery A, Gottlieb T, Bradbury R, Harbour C 2003. Comparative analysis of multidrug-resistant, non-multidrug-resistant, and archaic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from central Sydney, Australia. *J Clin Microbiol* 41: 867-872.
341. Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176: 386-390.
342. Weber T, Welzel K, Pelzer S, Vente A, Wohlleben W 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J Biotechnol* 106: 221-232.
343. Wijaya L, Hsu LY, Jurup A 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview and local situation. *Ann Acad Med Singapore* 35: 479-486.
344. Williams ST, Davies FL 1965. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol* 38: 241-261.
345. Williams DH, Maplestone RA 1992. Why are secondary metabolites synthesized? In Chadwick DJ, Whelan J (eds.), *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, John Wiley & Sons, (Ciba Found Symp 171), Chichester. p. 45-59.
346. Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ 1983a. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol* 129: 1743-1813.
347. Williams ST, Goodfellow M, Wellington EMH, Vickers JC, Alderson G, Seath PHA, Sackin MJ, Mortimer AM 1983b. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J Gen Microbiol* 129: 1815-1830.
348. Wilson GC, Bushell ME 1995. The induction of antibiotic synthesis in *Sacchaeropolyspora erytraea* and *Streptomyces hygroscopicus* by growth rate decrease is accompanied by a down-regulation of protein synthesis rate: *FEMS Microbiol Lett* 129: 89-96.
349. Wink JM, Kroppenstedt RM, Ganguli BN, Nadkarni SR, Schumann P, Seibert G, Stackebrandt E 2003. Three new antibiotic producing species of the genus *Amycolatopsis*, *Amycolatopsis balhimycina* sp. nov., *A. tolypomycina* sp. nov., *A. vancoresmycina* sp. nov., and description of *Amycolatopsis keratiniphila* subsp.



- keratiniphila* subsp. nov. and *A. keratiniphila* subsp. *nogabecina* subsp. nov. *System Appl Microbiol* 26: 38-46.
350. Wishart DS, Knox C, Gard P, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Woolsey J 2006. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res* 34: D668-D672.
  351. Wösten HAB, Willey, JM 2000. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology* 146: 767-773.
  352. WWF - World Wildlife Fund 2006. *Cerrado*. Disponível em: [http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/biomas/bioma\\_cerrado/index.cfm](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/biomas/bioma_cerrado/index.cfm). Acesso em 12 de novembro de 2006.
  353. Wylie JL, Nowicki DL 2005. Molecular epidemiology of community – and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *J Clin Microbiol* 43: 2830-2836.
  354. Yajes R 1997. Animal ethics committees and the implementation of the Three Rs. Animal Alternatives, Synopsis of the workshop: Animal Alternative, Welfare and Ethics. Van Zutphen LFM and M Balls (eds.), Elsevier Developments in animal and Veterinary Sciences, p. 367-371.
  355. Young M, Cullum J 1987. A plausible mechanism for large-scale chromosomal DNA amplification in streptomycetes. *FEBS Lett* 212: 10-14.
  356. Yuan WM, Crawford DL 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl Environ Microbiol* 61: 3119-3128.
  357. Ywai Y, Omura S 1992. Cultural conditions for screening of new antibiotics. *J Antibiot* 34: 123-141
  358. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 5: 275-286.
  359. Zitouni A, BoudjellaH, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N 2005. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol* 156: 984-993.

# ANEXOS

# ANEXO I

## Composição dos meios de cultura e reagentes utilizados na pesquisa

**Ágar AC**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5g
Amido.....	10,0g
Caseína.....	1,0g
Ágar.....	15,0g
H <sub>2</sub> O.....	1.000mL
pH=7,0	

**Ágar ISP-2**

C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> .....	4,0g
Extrato de levedura.....	4,0g
Extrato de malte.....	10,0g
Ágar.....	20,0g
H <sub>2</sub> O.....	1.000mL
pH=7,0	

**Meio LB**

Peptona .....	10,0g
Extrato de levedura.....	5,0g
NaCl.....	5,0g
H <sub>2</sub> O.....	1.000mL

**Solução STET**

NaCl.....	0,1M
Tris HCl (pH=8,0).....	10,0mM
EDTA.....	1,0mM
Triton X-100.....	5,0%

**Tampão de Amostra**

Azul de bromofenol 10X.....	0,5%
Glicerol.....	50,0%
EDTA (pH=8,0).....	100mM

**Tampão TBE 0,5X**

Trizma base.....	10,0mM
Ácido bórico.....	90,0mM
EDTA.....	1,0mM

**Tampão TE**

Tris HCl.....	10,0mL
EDTA (pH=8,0).....	1,0mM

**CTAB/NaCl**

CTAB.....	10,0%
NaCl.....	0,73M

## ANEXO II



## ANEXO III



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA  
R: Delenda Rezende de Melo s/ nº Setor Universitário – CEP 74605-050 / Goiânia –GO Tel (62) 3209-6108

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone 3521-1075 ou 3521-1076

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

**Título do Projeto:** Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Determinação da Citotoxicidade de Actinomicetos frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA).

**Pesquisador Responsável :** Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

**Telefone para contato :** 3209-6108

**Pesquisadores participantes :** Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta, Prof. Dr. Cleomenes Reis, Biomédico Lindon Johnson A. Batista, Mestranda Daniella Vilela Lima e Graduando Gustavo Guilherme Queiroz de Arimatea.

**Telefones para contato:** 3209-6108/ 3281-7527/ 3269-8343

- ♦ Desde os primeiros relatos de resistência antimicrobiana até os dias atuais, a frequência de microrganismos multirresistentes vem aumentando em hospitais e instituições de saúde, constituindo falha terapêutica de consequências mórbidas. Tendo em vista a capacidade dos actinomicetos de produzir uma grande variedade de biomoléculas com enorme valor sócio-econômico, sendo os antibióticos os mais importantes metabólitos secundários produzidos por tais microrganismos, esta pesquisa se propõe a isolar, identificar e avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica de actinomicetos obtidos a partir de solos de Cerrado e Mata Atlântica frente a amostras de *Staphylococcus aureus* com um amplo perfil de resistência antimicrobiana, objetivando maximizar o isolamento de actinomicetos com potencialidade para produção de substâncias bioativas (antibióticos), que apresentem baixa toxicidade e que atuem sobre os *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos atualmente em uso.
- ♦ Não há riscos, prejuízos, lesão ou desconforto que possa ser provocado pela pesquisa, não havendo a necessidade de indenização ou ressarcimento de despesas, tendo em vista que nenhum tipo de medicamento será utilizado e não haverá realização de procedimento clínico.
- ♦ Não há benefícios pessoais decorrentes da participação da pesquisa. A participação apenas contribuirá enormemente para a detecção de actinomicetos que apresentem atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA), com possível isolamento de novos metabólitos que apresentem baixa toxicidade.



- ♦ A participação incluirá apenas a liberação da amostra e permissão do preenchimento do protocolo de pesquisa relacionado ao uso anterior/atual de antimicrobianos. Se o paciente/responsável concordar em participar do estudo, as informações clínicas e laboratoriais a ele relacionadas serão confidencialmente mantidas em sigilo, nem o nome ou mesmo iniciais irão constar em qualquer registro desta pesquisa, e fica garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

---

José Daniel Gonçalves Vieira  
Pesquisador Responsável

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_  
CPF \_\_\_\_\_ n.º de prontuário \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **“Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da citotoxicidade de actinomicetos frente a *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA)”**, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Daniella Vilela Lima sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Hospital das Clínicas-UFG, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2005.

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura (sujeito / responsável): \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

#### Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Observações complementares :

**MODELO DA FICHA CLÍNICA PARA PACIENTES**

**PROTOCOLO DE PESQUISA**

Nº da amostra: ..... Data: ...../...../.....

Nº do prontuário .....

Data de nascimento ...../...../..... Idade.....

Doença de origem .....

Uso de antimicrobianos rotineiramente? .....

Qual(is)? .....

Em uso de antimicrobianos nos últimos dias? .....

Qual(is)? .....

**OBSERVAÇÕES**

.....  
 .....  
 .....  
 .....

Goiânia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2005

\_\_\_\_\_  
 Médico responsável